



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



**FARKLI DİRENÇ FENOTİPLERİNE SAHİP PROSTAT
KANSERİ HÜCRE HATLARINDA APİGENİN VE FENETİL
İZOTİYOSİYANAT (PEITC) KOMBİNASYONU İLE
OLUŞTURULAN PROOKSİDAN KANSER TERAPİ MODELİ
ETKİNLİĞİNİN VE MOLEKÜLER HEDEFLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İŞİL EZGİ ERYILMAZ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2021





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



**FARKLI DİRENÇ FENOTİPLERİNE SAHİP PROSTAT KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA APİGENİN VE FENETİL İZOTİYOSİYANAT (PEITC)
KOMBİNASYONU İLE OLUŞTURULAN PROOKSİDAN KANSER
TERAPİ MODELİ ETKİNLİĞİNİN VE MOLEKÜLER HEDEFLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Işıl Ezgi ERYILMAZ

0000-0002-3316-316X

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Ünal EGELİ

**BUAP(T)-2015/4, DDP(T)-2019/1 – Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri (BAP) Birimi**

BURSA-2021

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“Farklı Direnç Fenotiplerine Sahip Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apigenin ve Fenetil İzotiyosiyanat (PEITC) Kombinasyonu ile Oluşturulan Prooksidan Kanser Terapi Modeli Etkinliğinin ve Moleküler Hedeflerinin Araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Işıl Ezgi ERYILMAZ
09.08.2021

Adı Soyadı: Işıl Ezgi ERYILMAZ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: Farklı Direnç Fenotiplerine Sahip Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apigenin ve Fenetil İzotiyosiyanat (PEITC) Kombinasyonu ile Oluşturulan Prooksidan Kanser Terapi Modeli Etkinliğinin ve Moleküler Hedeflerinin Araştırılması

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

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Ünal EGELİ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TÜRKÇE ÖZET.....	XIII
İNGİLİZCE ÖZET.....	XIV
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanser tanımı.....	5
2.2. Dünya’da ve Türkiye’de güncel kanser yükü istatistikleri.....	6
2.3. Kanser oluşumunu tetikleyen etmenler.....	8
2.3.1. Kanser oluşumunda etkili dış etmenler.....	9
2.3.1.1. Yaş.....	9
2.3.1.2. Aile öyküsü.....	9
2.3.1.3. Diyet ve obezite.....	9
2.3.1.4. Sigara ve alkol kullanımı.....	10
2.3.1.5. Kimyasal maruziyeti ve çevre kirliliği.....	10
2.3.1.6. Ultraviyole ışınlar ve iyonize radyasyon.....	11
2.3.1.7. Virüs ve bakteriler.....	11
2.3.2. Kanser oluşumunda etkili iç etmenler.....	12
2.3.2.1. Onkogen aktivasyonu.....	12
2.3.2.2. Tümör süpressör inaktivasyonu.....	13
2.3.2.3. Bağışıklık sisteminin zayıflaması ve immün sürveyans mekanizmasındaki bozukluklar.....	13
2.3.2.4. Kalıtsal dispozisyonlar.....	14
2.3.2.5. Aktifleştirici enzimler.....	14
2.4. Kanser hücrelerinin genel özellikleri.....	15
2.4.1. Otonom büyüme sinyallerinin varlığı ve anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık.....	16
2.4.2. Programlı hücre ölüm mekanizmalarından kaçış.....	17
2.4.3. Sınırsız replikatif potansiyel.....	21
2.4.4. Anjiyogenez yeteneği.....	22
2.4.5. İnvazyon ve metastaz yeteneği.....	22
2.4.6. Genomik instabilite.....	23
2.4.7. Enerji metabolizmasının yeniden programlanması.....	24
2.4.8. Tümör uyarıcı inflamasyon.....	25
2.4.9. İmmün sistemden kaçış.....	26
2.4.10. Stres adaptasyonu.....	27
2.5. Redoks sinyalizasyonu ve kanser biyolojisindeki rolü.....	28
2.5.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	28
2.5.2. ROS kaynakları ve hücrel redoks homeostazisi.....	29
2.5.3. Hücre içi sinyalizasyonun bir parçası olarak ROS.....	33
2.5.4. Karsinogenez sürecinde ROS’un etkileri.....	35
2.5.5. Kanser hücrelerinde değişen redoks homeostazisi.....	39
2.5.5.1. Kanser hücrelerinde redoks adaptasyon mekanizmaları ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri.....	40

2.5.5.1.1. Nrf2.....	43
2.5.5.1.2. NF-κB.....	46
2.5.5.1.3. Hif-α.....	48
2.5.6. Kanser hücrelerinde değişen redoks homeostazisinin kanser progresyonu ile ilişkisi.....	50
2.5.7. ROS'un tümör süpressör etkileri ve kanser hücrelerinde terapötik hedef olarak redoks adaptasyonu.....	51
2.5.8. Kanser terapide prooksidan özelliklere sahip bileşiklere genel bakış....	56
2.5.8.1. Prooksidan ajanlar olarak flavonoidler.....	58
2.5.8.1.1. Flavonoidlerin kanser terapisindeki rolleri.....	58
2.5.8.1.2. Flavonoidlerin kanser terapisinde redoks aracılı rolleri.....	59
2.5.8.1.2.1. Apigenin.....	63
2.5.8.2. GSH depleasyonu sağlayıcı ajan olarak fenetil izotiyosiyanat (PEITC).....	67
2.6. Prostat kanseri (PK).....	72
2.6.1. PK etiyolojisi.....	73
2.6.1.1. PK'nde aile öyküsü ve genetik yatkınlık.....	73
2.6.1.2. Batı tipi beslenme.....	74
2.6.2. PK epidemiyolojisi.....	75
2.6.3. Prostat bezi anatomisi ve histolojisi.....	76
2.6.4. PK histopatolojisi.....	78
2.6.4.1. Gleason skorum sistemi.....	78
2.6.5. PK patofizyolojisi ve hücresel düzeyde moleküler mekanizmalar.....	80
2.6.5.1. Lokalize PK'nin moleküler mekanizmaları.....	80
2.6.5.2. Lokal ileri ve metastatik PK'nin moleküler mekanizmaları.....	82
2.6.5.2.1. Metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK).....	82
2.6.5.2.1.1. Androjen reseptörü (AR) ve sinyalizasyonu.....	82
2.6.5.2.1.2. Metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK) ilişkili diğer moleküler değişimler.....	85
2.6.6. PK tedavisi ve klinik uygulamalar.....	86
2.6.6.1. Cabazitaxel.....	89
2.6.7. PK'nde redoks adaptasyonunun kanser progresyonuna ve agresifliğine etkileri.....	93
2.6.8. Apigenin ve PEITC'in AR aksisinde PK spesifik etki mekanizmaları...	94
2.7. Tez çalışmasının amacı.....	95
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	98
3.1. Gereç.....	98
3.1.1. Laboratuvar donanımı ve cihazlar.....	98
3.1.2. Kimyasallar ve sarf malzemeler.....	99
3.2. Yöntem.....	102
3.2.1. Hücre kültürü.....	102
3.2.1.1. Kullanılan hücre hatları.....	102
3.2.1.2. Hücre stoklarının açılması.....	103
3.2.1.3. Hücre kültürü koşulları.....	103
3.2.1.3.1. LNCaP hücre kültürü.....	103
3.2.1.3.2. C4-2 hücre kültürü.....	103
3.2.1.3.3. RWPE-1 hücre kültürü.....	104
3.2.1.4. Hücrelerin pasajlanması.....	104
3.2.1.5. Hücre stoklarının hazırlanması.....	104

3.2.1.6. Hücre sayısının belirlenmesi.....	104
3.2.2. Kullanılan ilaçların stok solüsyonlarının hazırlanması ve hücelere uygulanmak üzere uygun konsantrasyonlarda dilüe edilmesi.....	105
3.2.2.1. Cabazitaxel.....	105
3.2.2.2. Apigenin.....	106
3.2.2.3. Fenetil izotiyosiyanat (PEITC).....	106
3.2.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) dirençli LNCaP hücre hattı (LNCaP-HPR) eldesi.....	107
3.2.3.1. H ₂ O ₂ stok solüsyonunun hücelere uygulanmak üzere uygun konsantrasyonlarda dilüe edilmesi.....	107
3.2.3.2. LNCaP-HPR eldesi için direnç gruplarının oluşturulması ve uygulanan protokol.....	108
3.2.4. Sitotoksisite analizi.....	109
3.2.4.1. LNCaP-HPR hücrelerinde sitotoksisite analizi ile direnç katsayısının belirlenmesi.....	110
3.2.5. Apoptotik etkinin belirlenmesi.....	110
3.2.5.1. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için apoptotik etkinin belirlenmesi.....	111
3.2.6. Apigenin ve PEITC kombin doz gruplarının belirlenmesi.....	111
3.2.7. Hücre döngüsü üzerine etkilerin belirlenmesi.....	113
3.2.8. Oksidatif stresin belirlenmesi.....	114
3.2.8.1. Optimizasyon.....	114
3.2.8.2. Oksidatif stresin akış sitometrik yöntem ile belirlenmesi.....	114
3.2.8.3. Oksidatif stresin floresan mikroskop analizi.....	115
3.2.8.3.1. CM-H ₂ DCFDA boyama.....	116
3.2.8.3.2. DHE boyama.....	116
3.2.8.4. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için oksidatif stresin belirlenmesi.....	117
3.2.9. Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi.....	117
3.2.10. Total glutatyon (GSH) miktarının belirlenmesi.....	119
3.2.10.1. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için total glutatyon (GSH) miktarının belirlenmesi.....	120
3.2.11. Gen ekspresyonu analizleri.....	120
3.2.11.1. RNA izolasyonu.....	121
3.2.11.2. cDNA sentezi.....	121
3.2.11.3. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR).....	122
3.2.11.4. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için gerçekleştirilen gen ekspresyonu analizleri.....	123
3.2.12. Protein ekspresyonu analizleri.....	123
3.2.12.1. Sitoplazmik ve nükleer protein izolasyonları.....	124
3.2.12.2. Proteinlerin miktar tayini.....	125
3.2.12.3. Proteinlerin hazırlanması.....	125
3.2.12.4. Jel elektroforezi.....	125
3.2.12.5. Transfer aşaması.....	126
3.2.12.6. Bloklama.....	126
3.2.12.7. Primer antikor ile muamele.....	126
3.2.12.8. Sekonder antikor ile muamele.....	127
3.2.12.9. Görüntüleme.....	127

3.2.12.10. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için gerçekleştirilen protein ekspresyonu analizleri.....	127
3.2.13. Immünfloresan analizler.....	128
3.2.13.1. Fiksasyon.....	128
3.2.13.2. Permeabilizasyon.....	128
3.2.13.3. Bloklama.....	129
3.2.13.4. Primer antikor ile muamele.....	129
3.2.13.5. Sekonder antikor ile muamele.....	129
3.2.13.6. Görüntüleme.....	129
3.2.14. İstatistiksel analizler.....	130
4. BULGULAR.....	131
4.1. LNCaP-HPR hücre hattının eldesi ve direnç validasyonları.....	131
4.1.1. Sitotoksisite analizleri.....	131
4.1.2. Hücre ölümü analizleri.....	133
4.1.3. Oksidatif stres analizleri.....	134
4.1.3.1. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında oksidatif stresin akış sitometrik analizi.....	134
4.1.3.2. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında intrasellüler ROS miktarının görüntülenmesi.....	136
4.1.4. Total GSH miktarındaki değişimlerin belirlenmesi.....	139
4.1.5. Gen ekspresyonu analizleri.....	140
4.1.6. Protein ekspresyonu analizleri.....	141
4.2. Sitotoksisite analizleri.....	143
4.2.1. Cabazitaxel'in sitotoksik etkisi.....	143
4.2.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi.....	143
4.2.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi.....	144
4.2.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	145
4.2.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	145
4.2.2. Apigenin'in sitotoksik etkisi.....	146
4.2.2.1. Apigenin'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi.....	146
4.2.2.2. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi.....	147
4.2.2.3. Apigenin'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	147
4.2.2.4. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	148
4.2.3. PEITC'in sitotoksik etkisi.....	149
4.2.3.1. PEITC'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi.....	149
4.2.3.2. PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi.....	149
4.2.3.3. PEITC'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	150
4.2.3.4. PEITC'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	150
4.3. Apoptotik etkiler.....	151
4.3.1. Cabazitaxel'in apoptotik etkisi.....	151
4.3.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi.....	151
4.3.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi.....	152
4.3.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi.....	154
4.3.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi.....	155
4.3.2. Apigenin'in apoptotik etkisi.....	157
4.3.2.1. Apigenin'in LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi.....	157
4.3.2.2. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi.....	158
4.3.2.3. Apigenin'in C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi.....	160
4.3.2.4. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi.....	161

4.3.3. PEITC'in apoptotik etkisi.....	163
4.3.3.1. PEITC'in LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi.....	163
4.3.3.2. PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi.....	164
4.3.3.3. PEITC'in C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi.....	164
4.3.3.4. PEITC'in RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi.....	165
4.3.3.5. PEITC'in apoptotik etkisinin istatistiksel analizi.....	166
4.4. Cabazitaxel ile Apigenin ve PEITC kombinasyonu için uygun doz grupları ve uygulama sürelerinin seçimi.....	166
4.4.1. Ajanların uygun dozlarının ve uygulama sürelerinin belirlenmesi.....	166
4.4.1.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun sitotoksik etkisi.....	169
4.4.1.1.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi.....	169
4.4.1.1.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi.....	170
4.4.1.1.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	171
4.4.1.1.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi.....	172
4.4.1.1.5. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun sitotoksisite verilerine farmakolojik etkileşimleri.....	173
4.4.1.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun apoptotik etkisi.....	175
4.4.1.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi.....	175
4.4.1.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi.....	175
4.4.1.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi.....	176
4.4.1.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi.....	177
4.4.1.2.5. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun apoptotik etkisinin istatistiksel analizi.....	178
4.4.1.2. Sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenen kombin doz gruplarının etkinliği ile Cabazitaxel etkinliğinin hücre canlılığı açısından karşılaştırılması.....	179
4.4.2. Apigenin ve PEITC'in apoptotik etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması.....	180
4.5. Hücre döngüsü üzerine etkiler.....	181
4.5.1. Cabazitaxel'in hücre döngüsü üzerine etkisi.....	181
4.5.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi.....	181
4.5.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi.....	181
4.5.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi.....	182
4.5.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi.....	183
4.5.1.5. Cabazitaxel'in hücre döngüsü üzerine etkisinin istatistiksel analizi.....	183

4.5.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hücre döngüsü üzerine etkisi.....	184
4.5.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi.....	184
4.5.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi.....	186
4.5.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkileri.....	187
4.5.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkileri.....	189
4.5.3. Apigenin ve PEITC'in hücre döngüsü üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması.....	190
4.6. Oksidatif stres üzerine etkiler.....	190
4.6.1. Cabazitaxel'in oksidatif stres üzerine etkisi.....	190
4.6.1.1. Cabazitaxel'in oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	191
4.6.1.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	191
4.6.1.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	191
4.6.1.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	192
4.6.1.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	193
4.6.1.1.5. Cabazitaxel'in akış sitometrik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi.....	193
4.6.1.2. Cabazitaxel'in oksidatif stres üzerine etkilerinin mikroskopik analizi.....	194
4.6.1.2.1. Hidrojen peroksit birikiminin mikroskopik analizi.....	194
4.6.1.2.2. Süperoksit birikiminin mikroskopik analizi.....	197
4.6.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun oksidatif stres üzerine etkisi.....	200
4.6.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun oksidatif stres üzerine etkilerinin akış sitometrik analizi.....	200
4.6.2.1.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	200
4.6.2.1.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	202
4.6.2.1.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	203
4.6.2.1.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi.....	205
4.6.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun oksidatif stres üzerine etkilerinin mikroskopik analizi.....	206
4.6.2.2.1. Hidrojen peroksit birikiminin mikroskopik analizi.....	206
4.6.2.2.2. Süperoksit birikiminin mikroskopik analizi.....	212
4.6.3. Apigenin ve PEITC'in oksidatif stres üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması.....	217
4.7. Mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkiler.....	217

4.7.1. Cabazitaxel'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	217
4.7.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	217
4.7.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	218
4.7.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	219
4.7.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	220
4.7.1.5. Cabazitaxel'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi.....	221
4.7.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	222
4.7.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	222
4.7.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	224
4.7.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	226
4.7.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi.....	228
4.7.3. Apigenin ve PEITC'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması.....	230
4.8. Total GSH miktarı üzerine etkiler.....	230
4.8.1. Cabazitaxel'in total GSH miktarı üzerine etkisi.....	230
4.8.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun total GSH miktarı üzerine etkisi.....	231
4.8.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi.....	232
4.8.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi.....	233
4.8.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi.....	233
4.8.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi.....	234
4.8.3. Apigenin ve PEITC'in total GSH miktarı üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması.....	235
4.9. Gen ekspresyonu üzerine etkiler.....	235
4.9.1. Cabazitaxel'in gen ekspresyonu üzerine etkileri.....	235
4.9.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	236
4.9.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	236
4.9.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	237
4.9.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi.....	238
4.9.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun gen ekspresyonu üzerine etkileri.....	239

4.9.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri.....	239
4.9.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri.....	240
4.9.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri.....	241
4.9.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri.....	243
4.9.3. Apigenin ve PEITC'in gen ekspresyonu üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması.....	244
4.10. Protein ekspresyonu üzerine etkiler.....	245
4.10.1. Cabazitaxel'in protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	245
4.10.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	245
4.10.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	246
4.10.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	248
4.10.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	249
4.10.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	251
4.10.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	251
4.10.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	253
4.10.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	255
4.10.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri.....	257
4.10.3. Apigenin ve PEITC'in protein ekspresyonu üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması.....	258
4.11. İmmünfloresan analiz bulguları.....	259
4.11.1. Cabazitaxel'in immünfloresan analiz bulguları.....	259
4.11.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	259
4.11.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	262
4.11.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	263
4.11.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	265
4.11.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun immünfloresan analiz bulguları.....	268
4.11.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	270
4.11.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	270

4.11.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	277
4.11.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları.....	280
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	283
6. KAYNAKLAR.....	323
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	353
8. TEŞEKKÜR.....	357
9. ÖZGEÇMİŞ.....	358

TÜRKÇE ÖZET

Farklı Direnç Fenotiplerine Sahip Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apigenin ve Fenetil İzotiyosiyanat (PEITC) Kombinasyonu ile Oluşturulan Prooksidan Kanser Terapi Modeli Etkinliğinin ve Moleküler Hedeflerinin Araştırılması

Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerden farklı olarak artmış reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyi ve yüksek endojen oksidatif strese karşı geliştirdikleri redoks adaptasyonu ile karakterizedir. Bu karakteristik, eşlik eden pek çok onkogenik regülasyon ile hem hücre içinde hem de tümör mikroçevresinde kanser progresyonuna katkı sağlamakla birlikte kanser spesifitesi yüksek bir terapötik stratejinin de temelini oluşturmaktadır. Kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak endojen ROS düzeyinin yüksek olması, hücrelerde ROS artışıyla tetiklenen hücre ölümüne karşı kanser hücrelerini daha duyarlı hale getirmektedir. Prooksidan kanser terapi olarak adlandırılan bu tedavi modeli son yıllarda ilgi çeken çalışma konuları arasında bulunmaktadır. Bu kapsamda potansiyel prooksidan özellikleri nedeni ile bitkisel sekonder metabolitler olan flavonoidler dikkat çekmektedir.

Prostat kanseri (PK), erkeklerde sık rastlanan bir solid doku kanseri olup güncel tedavi protokollerine rağmen metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK)'nin tedavisinde hala klinik zorluklar yaşanmaktadır.

Mevcut tez çalışmasında redoks adaptasyonu açısından farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücre hatları (metastatik, hidrojen peroksit dirençli-metastatik ve mKDPK) ile prostatik epitel hücrelerinde bir flavonoid türü olan Apigenin ve antioksidan inhibisyon ajanı fenetil izotiyosiyanat (PEITC) kombinasyonu ile kanser hücreleri için arttırılmış redoks manipülasyonu sağlanarak PK'nde yenilikçi bir prooksidan kanser terapi modeli oluşturulmuş, modelin PK hücrelerindeki etkileri ile redoks ilişkili hedefleri ilk kez araştırılmış ve bulgular mKDPK'nın güncel tedavisinde kullanılan Cabazitaxel monoterapisinin prooksidan etkileriyle karşılaştırılmıştır. Redoks adaptasyonuna neden olan moleküler mekanizmalar belirlendikten sonra hücrelerde, terapilerin sitotoksik, apoptotik, oksidatif, mitokondriyal, anti-androjenik ve redoks adaptasyonu üzerindeki etkileri ve kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, redoks adaptasyonunu hedef aldığı belirlenen, kanser seçici prooksidan etkinliği daha yüksek, PK için anti-androjenik etkili alternatif bir terapi modeli oluşturulmuştur.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, Apigenin, PEITC, Cabazitaxel, prooksidan kanser terapi

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of Efficiency and Molecular Targets of Prooxidant Cancer Therapy Model Generated by Combination of Apigenin and Phenethyl Isothiocyanate (PEITC) in Prostate Cancer Cell Lines with Different Resistance Phenotypes

Unlike healthy cells, cancer cells are characterized by increased reactive oxygen species (ROS) levels and redox adaptation to high endogenous oxidative stress. While this characteristic contributes to cancer progression both in the cell and tumor microenvironment with many accompanying oncogenic regulations, it also forms the basis of a therapeutic strategy with high cancer specificity. The high level of endogenous ROS in cancer cells, unlike normal cells, makes cancer cells more sensitive to cell death triggered by increased ROS levels. This treatment model, called prooxidant cancer therapy, has been among the research fields of interest in recent years. In this context, flavonoids, secondary plant metabolites, draw attention due to their potential prooxidant properties.

Prostate cancer (PC) is a common solid tissue cancer in men. Despite the current treatment protocols, there have still been clinical challenges in treating metastatic castration-resistant PC (mCRPC).

In the current thesis, enhanced redox manipulation was supplied for PC cell lines with different resistance phenotypes in redox adaptation (metastatic, hydrogen peroxide resistant-metastatic, and mCRPC cells) using a flavonoid species, Apigenin, combined with phenethyl isothiocyanate (PEITC), an antioxidant inhibiting agent. With the study, an innovative prooxidant cancer therapy model was generated for PC. Its effect and redox-related targets were investigated on PC cells for the first time, and the findings were compared with the prooxidant effects of Cabazitaxel monotherapy, which is used in the current treatment of mCRPC. After determining the molecular mechanisms that lead to redox adaptation, the usability of the therapies and their effects, including cytotoxic, apoptotic, oxidative, mitochondrial, anti-androgenic, and redox-targeted manipulations, were evaluated in the cells. As a result, an alternative therapy model was established with anti-androgenic effects and higher cancer-selective prooxidant activity for PC, which was determined to target redox adaptation.

Keywords: Prostate cancer, Apigenin, PEITC, Cabazitaxel, prooxidant cancer therapy

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerde büyüme ve bölünme kontrolünün kaybı ile karakterize, hücresel düzeyde genetik temelleri bulunan, iç ve dış faktörlerin birlikte rol oynadığı, çok nedenli ve çok basamaklı ölümcül bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin genel özellikleri arasında otonom büyüme sinyallerinin varlığı, anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık, programlı hücre ölüm mekanizmalarından kaçış, sınırsız replikatif potansiyel, anjiyogenez, invazyon ve metastaz yeteneği yer almasına rağmen günümüz perspektifinde kanserin progresif özelliklerinden yalnızca kanser hücresinin içerisinde gerçekleşen değişimlerin sorumlu olmadığı, endojen faktörler kadar kanser hücrelerinin içerisinde buldukları mikroçevreyi ilgilendiren onkogenik faktörlerinde bu sürece katkı sunduğu açıktır. Bu nedenle kanser hücresini ilgilendirdiği kadar dış ortamla da bağlantı sağlayan ve onkogenik mekanizmaların aktifleşmesinde rolü bulunan genomik instabilite, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, tümör uyarıcı inflamasyon, immün sistemden kaçış ve stres adaptasyonu gibi özellikler de kanser hücresinin genel karakteristikleri arasına dahil edilmiştir (Fouad & Aanei, 2017; Hanahan & Weinberg, 2011; Meirson, Gil-Henn & Samson, 2020).

Stres adaptasyonu, kanser hücrelerinin hayatta kalmaları için pek çok koşula karşı geliştirdikleri veya yeniden düzenledikleri onkogenik süreçlerin bütününe ifade eden geniş bir tanımdır. Kanserde iyi tanımlanmış stres adaptasyonlarından biri kanser hücrelerinin endojen oksidatif stres artışına karşı geliştirdikleri redoks adaptasyonudur. Redoks adaptasyonu geliştirmiş bir kanser hücresi normal hücrelerden farklı olarak hücre içi artmış reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyi, endojen kronik oksidatif stres, artmış antioksidan kapasite ve gelişen redoks adaptasyonu sayesinde oksidatif stres direnci ile karakterizedir. Kanser hücrelerinde redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin (Nrf2, NF- κ B ve Hif- α) aktifleşmesi ile gelişen redoks adaptasyonu, hastalığın progresyonunu ilgilendiren iç ve dış pek çok sürecin başlamasına ve devam etmesine önemli katkılar sağlayan bir mekanizma olmasına ek olarak kanser hücrelerinin terapötik hedeflenebilirliği ile ilgili stratejik bir öneme sahiptir (Kim, Kim & Seo, 2019).

Redoks adaptasyonu sayesinde kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelerden farklı olarak artmış olan ROS düzeyi, redoks manipülasyonları ile kanser hücrelerinin toksik ROS düzeyine daha çabuk ulaşmasını ve böylece kanser seçiciliği yüksek bir terapi stratejisi ile hedeflenebileceklerini ortaya koymaktadır. Yani antikanser bir strateji olarak redoks manipülasyonlarında amaç primer terapötik hedef olan kanser hücrelerinde artmış olan ROS seviyesini toksik eşik değere çekmektir. Kanser tedavisinde redoks manipülasyonlarını içeren bu terapi modelleri genel olarak “prooksidan kanser terapi” olarak adlandırılmaktadır ve kanser hücrelerinin redoks adaptasyonunun bozulmasından daha çok etkilenmesi prooksidan kanser terapinin seçici toksisitesinin temelini oluşturmaktadır (Firczuk, Bajor, Graczyk-Jarzynka, Fidy, Goral & Zagodz, 2020; Ghoneum ve ark., 2020; Glasauer & Chandel, 2014; Kim ve ark., 2019; Trachootham ve ark., 2009).

Bu amaçla kanser hücrelerinde (i): direkt olarak oksidasyon yeteneğine (prooksidan etkiye) sahip bazı ajanlar kullanarak doğrudan ROS seviyesinin artışı sağlanabilmektedir. Böylece, kanser hücrelerinde ROS düzeyi toksik eşik düzeyin üzerine çıkarılarak stresle indüklenmiş programlı hücre ölümleri uyarılabilmektedir. Alternatif olarak (ii): hücrel antioksidan savunma sistemini bloke edebilme özelliğine sahip bazı ajanlar (Fenetil izotiyosiyanat, PEITC; buthionin sulfoksimin, BSO; imexon, sulforofan gibi) kullanılarak ROS’a karşı savunma mekanizmasını ortadan kaldırma yolu ile kanser hücrelerinin artmış olan ROS düzeyine karşı toleransı azaltılabilmektedir. Antioksidan inhibisyon yaklaşımında da, kanser hücrelerinde antioksidan savunma sisteminin bloke edilmesi ile hücrelerde artmış ROS düzeyinin toksik değere eşitlenmesi sağlanmaktadır. Son yıllarda iki yaklaşım kombinlenerek hem endojen ROS düzeyinin arttırılması hem de antioksidan savunma sistemi üzerinde inhibisyon sağlayıcı etkilerin sağlanması ile oluşturulan arttırılmış prooksidan terapiler de, kanser spesifitesi daha yüksek prooksidan terapi seçenekleri arasında yer almaktadır (Firczuk ve ark., 2020; Ghoneum ve ark., 2020).

Prostat kanseri (PK), erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci en sık rastlanan solid doku kanseri olup kansere bağlı ölümler arasında altıncı sırada bulunmaktadır. Son on yılda hastalığın tanı ve tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmesine rağmen metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK)’nin tedavisinde klinik başarı elde edilememektedir. Metastatik PK’nin güncel tedavisinde hastalığın

başlamasında ve ilerlemesinde majör role sahip onkogenik androjen reseptör (AR) sinyalizasyonunu hedef alan ve prostat spesifik antijen (PSA) düzeyini azaltmaya yönelik androjen deplesyon tedavileri ile sıklıkla taksan bazlı kemoterapötikler kullanılmaktadır. Yaşam süresi üzerine avantajı olduğu belirlenerek mKDPK'nin ikinci basamak kemoterapisinde kullanılmak üzere onaylanan son taksan türevi ise Cabazitaxel'dir. Ancak kanser hücrelerinde gelişen direnç mekanizmaları ve taksan bazlı kemoterapinin özellikle yaşlı hastalardaki yan etkileri ilacın kullanımını ve başarısını sınırlamaktadır. Bu nedenle mKDPK tedavisinde kullanılmak üzere güncel tedaviler iyileştirilmeye ve geliştirilmeye devam etmektedir (Gillessen ve ark., 2020; Rebello ve ark., 2021).

Bitkisel sekonder metabolitler, pek çok kanser türünde antikanser etki mekanizmalarının çok yönlü olması nedeni ile kanser tedavisinde umut vaat eden küçük doğal bileşiklerdir. Fenil benzopiran halka yapısına sahip, bitkisel sekonder metabolit grubuna dahil olan flavonoidler de bu kapsamda dikkat çeken bileşikler arasında bulunmaktadır. Çeşitli flavonoidlerin ise son yıllarda farklı kanser türlerinde prooksidan etki mekanizmaları araştırılmaktadır. Apigenin flavon sınıfına ait, açık sarı renkli bir flavonoid türüdür. Apigeninin lösemi, osteosarkoma, karaciğer, tiroid, pankreas, serviks kanseri, gastrik kanser, mesane kanseri, mezotelyoma, meme kanseri ve glioblastoma *in vitro* ve *in vivo* tümör modellerinde ROS artışına neden olarak programlı hücre ölümünü uyardığı tespit edilmiştir. Bileşiğin redoks adaptasyonunu hedef alan etkileri ise yalnızca karaciğer kanserinde belirlenmiş, tümör boyutunu azaltıcı etkileri Nrf2 inhibisyonu ile uyumlu bulunmuş ve kanserli hepatositlerde mitokondriyal hasara bağlı olarak selektif sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir (Gao, Zhang & Ke, 2017; Seydi, Rasekh, Salimi, Mohsenifar & Pourahmad, 2016). PK'nde ilişkili olabilecek kapsamda gerçekleştirilen tek çalışmada ise 22Rv1 PK hücre hattında ve *in vivo* tümör modelinde Apigeninin neden olduğu ROS aracılı mitokondriyal hasarın p53 bağımlı apoptotik aktivasyon ile ilişkisi incelenmiştir (Shukla & Gupta, 2008). Apigeninin ROS artışına bağlı apoptotik etkileri PK de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde doğrulanmış olmasına rağmen ajanın prooksidan kanser terapide kullanılabilecek seçici etkilere sahip potansiyelde bir kemoterapötik adayı olup olmadığı henüz aydınlatılmamış ve kanserde onkogenik redoks adaptasyon mekanizmaları üzerine etkileri detaylı tanımlanmamıştır.

Mevcut tez çalışmasında, kanser hücrelerinde ROS artışının Apigenin ile ve hücrel antioksidan inhibisyonunun ise PEITC ile sağlanması hedeflenerek iki doğal bileşimin kombinasyonu ile artırılmış prooksidan etkileri öngörülen yeni bir *in vitro* kanser terapi modeli oluşturulması; kombin terapisinin redoks adaptasyonu açısından farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücre hatlarında redoks adaptasyon mekanizması ile AR sinyalizasyonunu hedef alan moleküler mekanizmalar üzerine etkilerinin belirlenmesi ve ilgili mekanizmalar açısından Cabazitaxel monoterapi etkinliği ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda tez çalışması dahilinde metastatik PK hücre hattı (LNCaP), LNCaP hücrelerinden hidrojen peroksit direnci geliştirilerek elde edilen redoks adapte hücre hattı (LNCaP-HPR) ve mKDPK hücre hattına (C4-2) ek olarak sağlıklı prostatik epitel hücre hattı (RWPE-1) kullanılmıştır. LNCaP-HPR hücre hattında gerçekleştirilen direnç validasyonlarıyla redoks adaptasyonuna neden olan mekanizmalar belirlendikten sonra Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile Cabazitaxel'in sitotoksik ve apoptotik etkileri analiz edilmiş olup hücrelerde prooksidan etkilerin değerlendirilebileceği uygun selektif dozlar, zaman dilimleri ve kombin uygulamada ajanların farmakolojik etkileşimleri tespit edilmiştir. Belirlenen dozlarda ve zaman dilimlerinde prooksidan kombin terapi modelinin ve Cabazitaxel'in hücrelerde oksidatif stres artışı (endojen hidrojen peroksit ve süperoksit düzeyleri), mitokondriyal membran potansiyeli, hücrel antioksidan savunma sistemi ana molekülü olan total glutatyon (GSH) seviyesi, antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan genlerin mRNA düzeyi; redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri ile AR ve PSA'nın mRNA ve protein düzeyleri ile bu proteinlerin tedavi sonrasında subsellüler lokalizasyonları üzerine etkileri incelenmiştir.

Sonuç olarak Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile seçici sitotoksik, apoptotik ve prooksidan etkileri Cabazitaxel'e göre yüksek olan, redoks adaptasyonunu hedef aldığı belirlenen ve anti-androjenik etkileri bulunan PK için alternatif olabilecek potansiyele sahip yeni bir *in vitro* prooksidan kombin terapi modeli oluşturulmuş ve ilk kez bu terapi modelinin *in vitro* etkinliği ve kullanılabilirliği PK'nde gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

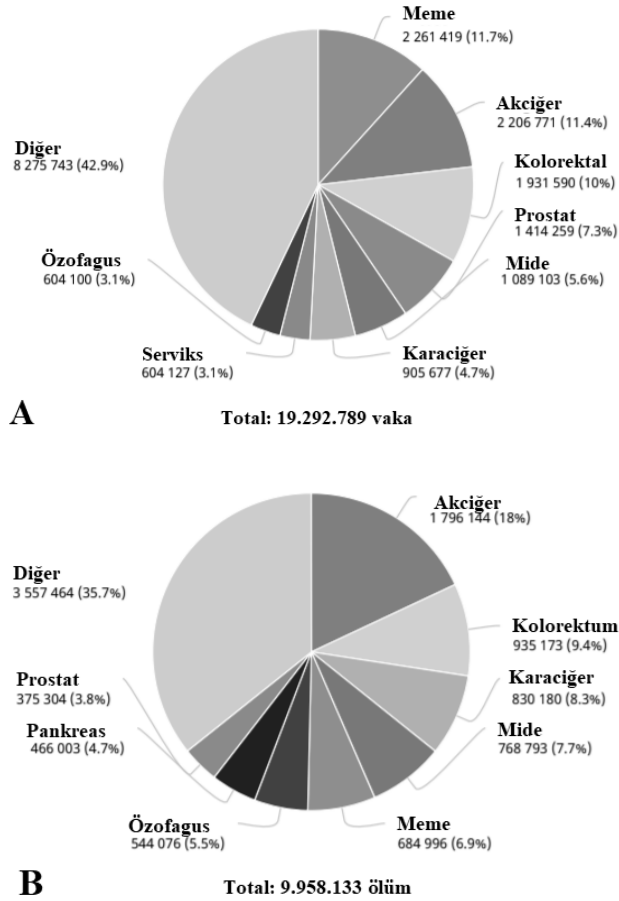
2.1. Kanserin tanımı

Kanser; hücre bölünmesi kontrolünün kaybedilmesi, invaziv ve metastatik potansiyel ile primer bölgeden farklı vücut dokularına yayılabilen özellikteki anormal hücrelerin gelişimi ve sürekli olarak çoğalması ile karakterize edilen, çok nedenli ve çok basamaklı, hücresel düzeyde genetik bir hastalıktır. Kanser hastalığında temelde yer alan anormallik kanser hücrelerinin sürekli olarak, programsız ve düzenlenemeyen proliferasyonudur. Bu nedenle kanserleşme süreci pek çok bozulmuş hücresel sürecin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir hücrenin sağlıklı şekilde hayatta kalması hücrenin davranışını kontrol eden sinyallere karşı denge içerisinde cevap vermesini gerektirir, ancak kanser hücresinde hücre içi homeostazinin bozulması nedeni ile hücresel davranış kontrolü kaybolmaktadır. Bunun sonucunda kanser hücreleri normal dokuları ve organları istila ederek en sonunda tüm vücuda yayılım göstermektedir. Kanser hücrelerinin tamamında görülen büyüme ve bölünme kontrolünün kaybı, kanserleşme süreci içerisinde hücre genomunda biriken çoklu genetik ve epigenetik değişimlerin bir sonucudur ve bu özellik kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran temel bir özelliktir (Fouad & Aanei, 2017; Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

Kanser, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve günümüzde farklı tedavi yöntemleri geliştirilmeye devam etmektedir. Son yıllarda, kanser etiyojisi alanında önemli gelişmeler gerçekleşmiştir. Kanserin önlenmesi, teşhis ve tedavi alanında ölüm oranlarını azaltacak önemli gelişmeler yaşanmasına rağmen bazı kanser türleri ve bunları tetikleyen risk faktörleri nedeniyle dünyanın farklı bölgelerinde kanser ölüm oranları artmaya devam etmektedir (Wu, Zhu, Thompson & Hannun, 2018). Sigara, enfeksiyon, obezite, fiziksel aktivite azlığı, alkol, hava kirliliği, radyasyon gibi farklı risk etmenleri hastalık riskini arttırmakla birlikte, genetik yatkınlık ve immün sistem işleyişindeki bozukluklar da ölüm oranlarının artışında büyük öneme sahiptir (Sloan & Gelband, 2007; Wu ve ark., 2018).

2.2. Dünya’da ve Türkiye’de güncel kanser yükü istatistikleri

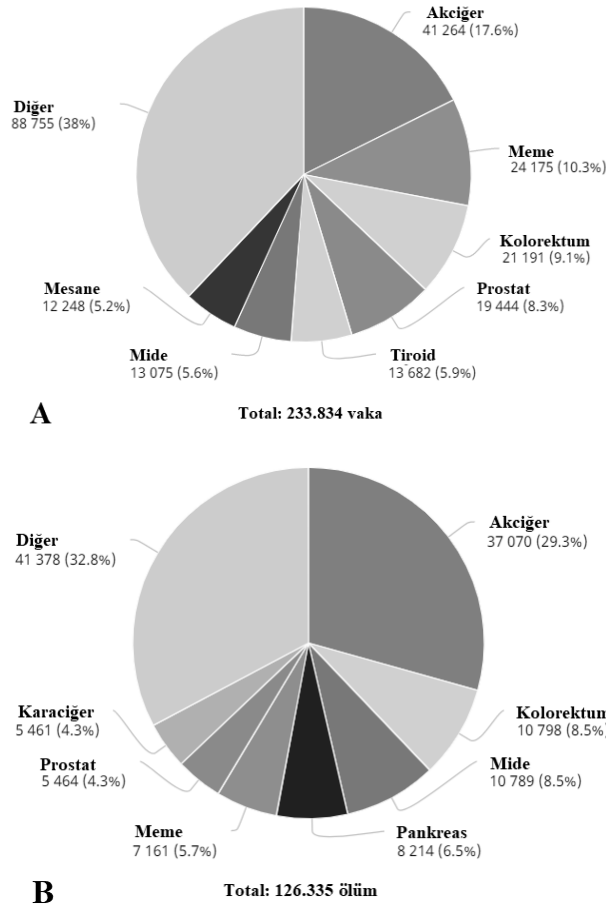
Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)’ın 15 Aralık 2020’de yayınladığı (GLOBOCAN 2020) küresel kanser yüküne ilişkin son istatistikler, dünyada her 5 kişiden birinin kansere yakalandığını, tanı alan bireylerin erkeklerde 1:8 ve kadınlarda 1:11 oranında kanser nedeni ile yaşamını kaybettiğini göstermektedir. Aynı raporda 2020 yılında 19.3 milyon yeni vaka ve yaklaşık 10.0 milyon ölüm ile küresel kanser hızının artış gösterdiği açıklanmıştır (Şekil 1A). İstatistiklere bakıldığında yaşa ve cinsiyete bağlı olmaksızın yeni vaka oranına göre listelenmiş en sık görülen kanser tipleri sırasıyla; meme, akciğer, kolorektal, prostat, mide, karaciğer, serviks ve özofagus kanserleridir. Kansere bağlı küresel ölüm oranları yaşa ve cinsiyete bağlı olmaksızın sıralandığında ise akciğer, kolorektum ve karaciğer kanserlerinin önde olduğu görülmektedir (Sung ve ark., 2021; Şekil 1B).



Şekil 1. GLOBOCAN 2020 verilerine bağlı (A) görülme oranına göre ve (B) kansere bağlı ölüm oranına göre küresel kanser yükü istatistikleri (GLOBOCAN 2020, <http://gco.iarc.fr/>)

Yaşa bağı standardize edilen küresel kanser insidans oranları incelendiğinde ise meme, prostat ve akciğer kanserlerinin en sık görülen ilk üç kanser türü olduğu bildirilmiştir. Küresel boyutta yaşa bağı erkeklerde en sık akciğer ve prostat kanseri; kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserler görülmektedir (Sung ve ark., 2021).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yıllık yeni tanı alan kanser hastası sayısı artış göstermektedir. Türkiye’de 2020 yılında 84.339.067 toplam nüfus içerisinde 233.834 yeni kanser vakası ve 126.335 kansere bağı ölüm kayıt altına alınmıştır (GLOBOCAN 2020, <http://gco.iarc.fr/>). Türkiye’deki 2020 istatistiklerine göre yaşa ve cinsiyete bağı olmaksızın sırasıyla; akciğer, meme, kolorektal, prostat ve tiroid kanserleri en sık görülen kanser tipleri olup tüm kanserlerin %50’sinden fazlasını oluşturmaktadır (Şekil 2A). Ülkemizde kansere bağı ölüm oranlarında önde olan ilk üç kanser türü ise akciğer, kolorektal ve mide kanseri olarak tespit edilmiştir (Şekil 2B).



Şekil 2. GLOBOCAN 2020 verilerine bağı (A) görülme oranına göre ve (B) kansere bağı ölüm oranına göre Türkiye kanser yükü istatistikleri (GLOBOCAN 2020, <http://gco.iarc.fr/>)

İstatistiklere bağlı veriler toplumumuzda 75 yaş öncesi her 4 kişiden birinin kanser tanısı aldığını göstermektedir. Ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanserlerin akciğer ve prostat kanserleri; kadınlar da ise meme ve tiroid kanserleri olduğu belirlenmiştir. Erkeklerde hem kanser sıklığının hem de kansere bağlı yaşam kayıplarının kadınlara göre sigara tüketimine bağlı olduğu düşünülen belirgin yüksekliği dikkat çekmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. *GLOBOCAN 2020 verilerine göre Türkiye kanser istatistiklerinin özeti

	Erkekler	Kadınlar	Her iki cinsiyet
Toplum	41 636 125	42 702 942	84 339 067
Yeni vaka sayısı	132 816	101 018	233 834
Yaşa göre standardize edilmiş her 100.000 kişide yeni vaka sayısı	291.5	188.0	231.5
75 yaşından önce kanser gelişme riski (%)	29.2	18.4	23.3
Kansere bağlı yaşam kayıplarının sayısı	78 949	47 386	126 335
Yaşa göre standardize edilmiş her 100.000 kişide yıllık kansere bağlı ölüm sayısı	171.6	81.4	120.4
75 yaşından önce kansere bağlı yaşam kaybı riski (%)	18.2	8.6	13.0
5-yıllık aktif vaka sayısı	300 071	281 565	581 636
Melanom dışı cilt kanseri hariç en sık görülen 5 kanser	Akciğer Prostat Kolonorektal Mesane Meme	Meme Tiroid Kolonorektal Akciğer Rahim	Akciğer Meme Kolonorektal Prostat Tiroid

*(GLOBOCAN 2020 <http://gco.iarc.fr/>)

2.3. Kanser oluşumunu tetikleyen etmenler

Kanser, hücresel düzeyde genetik bir hastalıktır. Tüm kanserler, kanser hücresinin genomunda bir dizi ardışık mutasyon oluşması ve mutasyonların birikimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanserlerin %10-15'nin kalıtsal olduğu, geriye kalan %85-90'ının ise yaşam boyunca DNA'nın mutajenlere maruz kalması sonucu gen mutasyonlarının ortaya çıkması, genomun iç ve dış etmenlere karşı daha duyarlı hale gelmesi ve yaşlanmaya bağlı replikasyon hataları gibi nedenler ile oluştuğu düşünülmektedir (Hassanpour & Dehghani, 2017). Bu nedenle çok nedenli ve çok basamaklı bir hastalık olan kanserde yaş, aile öyküsü, bakteriyel ve viral kaynaklar, radyasyon, beslenme alışkanlığı, sigara kullanımı ve karsinogenik etkisi bulunan kimyasallara maruziyet gibi birçok dış ve iç etmen suçlanmaktadır (Wu ve ark., 2018).

2.3.1. Kanser oluşumunda etkili dış etmenler

WHO, kanserlerin %80'inin kanser oluşum riskini arttıran veya direkt kansere neden olabilen fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlere bağlı geliştiğini öne sürmektedir (National Cancer Institute, Risk Factors for Cancer, <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>).

2.3.1.1. Yaş

Kanser oluşumunda en önemli risk faktörü yaştır. Kanser, genç yaşlarda da görülebilmekte ancak çoğunlukla 55 yaş üstü bireylerde ortaya çıkmaktadır. Bu durumun en önemli sebebi yaşlılığın karsinogenez için uzun bir zaman aralığı sağlamasıdır. İleri yaş, progenitör hücrelerde hasar birikimine neden olan ve hücrenin davranışsal kontrolünü kaybetmesine yol açan birtakım etmenlere karşı daha uzun süre maruz kalınması anlamına gelmektedir (de Magalhães, 2013). Yaşla birlikte görülme sıklığı en yüksek oranda artış gösteren kanser türü ise prostat kanseridir (Rawla, 2019).

2.3.1.2. Aile öyküsü

Ailesel kanserler aynı aileye mensup bireylerde aynı kanser türünün sıklıkla görülmesini; kalıtsal kanserler ise ilgili kanser türleri için suçlanan bir genetik değişikliğin aynı ailede kuşaklar arasında aktarılma yolu ile neden olduğu kanser türlerini ifade etmektedir. Genel olarak bir aile içerisinde artmış olan kanser sıklığının, kalıtsal duyarlılık, paylaşılan ortak çevre ve davranışların bir kombinasyonundan kaynaklandığı; multifaktöriyel etkileşim ile, aile öyküsünün kanser için yüksek risk faktörü olduğu bilinmektedir (Lichtenstein ve ark., 2000; Mucci ve ark., 2016). Örneğin; birinci derece yakınlarında prostat kanseri olan erkeklerde prostat kanseri gelişme riskinin 2-3 kat arttığı ve agresif prostat kanserinin daha yüksek oranda gözlendiği bildirilmiştir (Barber ve ark., 2018). Aile öyküsünün kanser ile ilişkisinin daha belirgin ve net olarak açıklanabildiği meme ve kolorektal kanserlerde gerçekleştirilen çalışmalar ve değerlendirmeler göz önüne alındığında ise, ailede kanser öyküsü olan bireylerin düzenli kontrollerinin gerçekleştirilmesi ve uygun genetik danışmanlık ile bilgilendirilmesi gerekmektedir (Wu ve ark., 2018).

2.3.1.3. Diyet ve obezite

Obezite; kanser gelişimi başta olmak üzere farklı birçok kronik hastalığa neden olan ciddi bir sağlık sorunudur. Obezite, fiziksel aktivite ve diyet alışkanlıklarının kansere yakalanma riskini %20 arttırdığı bilinmektedir.

Yapılan çalışmalar özellikle; serviks, özofagus kanseri, kolorektal, meme, prostat kanserleri ile beslenme ve obezite arasında anlamlı bir ilişki olduğunu öne sürmektedir. Diyet alışkanlığı ve obezitenin kanser risk faktörleri olarak tanımlanması; insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-I, cinsiyet steroidleri ve adipokinler gibi faktörlerle ilişkilendirilmektedir (De Pergola & Silvestris, 2013). Bu faktörlerin düzensiz inflamatuvar yanıt oluşturması sonucu metabolizma kontrolü bozulmakta ve yağ dokularında sitokin üretimi, tümör gelişimini destekleyen kronik bir inflamatuvar mikroçevre oluşmaktadır. Bu nedenle diyet ve obezite kanser oluşumu ve gelişiminde önemli çevresel etmenlerdir (Seiler, Chen, Brown & Fagundes, 2018; Wu, Powers, Zhu & Hannun, 2016).

2.3.1.4. Sigara ve alkol kullanımı

Sigara kullanımı, akciğer kanseri başta olmak üzere diğer kanser türleri için de önemli bir risk faktörüdür. Son 50 yılda, tütün kullanımının artması ile adenokarsinomalar en yaygın kanser alt tipleri haline gelmiştir (Aizawa ve ark., 2016; Furrukh, 2013). Sigara dumanında bulunan benzen gibi karsinogenik etkili pek çok bileşik hava yolu ile vücuda alınarak kanser riskini ciddi ölçüde arttırmaktadır. Benzene maruziyet ve kanser riski arasındaki en güçlü veriler akut miyeloid lösemi hastalarından elde edilmiştir. Fazla düzeyde benzene maruz kalan kimya sanayi, rafineri ve ayakkabı imalatı çalışanlarında akut miyeloid lösemisinin daha sık olarak geliştiği bildirilmiş ve IARC benzeni bilinen insan karsinojeni olarak sınıflamıştır (Loomis ve ark., 2017). Uzun süreli alkol kullanımının ise başta karaciğer kanseri olmak üzere kolon ve rektum kanserlerinde risk artışına neden olduğu belirlenmiştir. Alkol tüketiminin özellikle primer karaciğer kanseri ile ilişkili olduğu, çok sık kullanımının hastaların bir kısmında karaciğer tahribatı, inflamasyon ve siroza neden olarak karaciğer kanserine yol açabildiği gösterilmiştir (Bagnardi, Blangiardo, La Vecchia & Corrao, 2001; Connor, 2017).

2.3.1.5. Kimyasal maruziyeti ve çevre kirliliği

Organik bileşiklerin yanması sonucu ortaya çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, azot oksitler, formaldehit, benzen, epoksit türevleri, nitrozamidler, 1,3-butadien gibi uçucu organik bileşikler, sigara dumanı bileşenleri, radon, asbest, arsenik, paraben, nitratlar, organik klorlu bileşikler (dioksin), biyositler (organik klor, karbamat ve karbinol grubu taşıyanlar), pestisitler gibi pek çok kimyasal

madde çevresel kirliliğe neden olarak insanda primer karsinogenik (direkt), sekonder karsinogenik (prokarsinogenik), kokarsinogenik ya da immünsüpresif etki göstermektedir. Kimyasal maruziyeti özellikle çocukluk çağı kanserleri, akut lösemi, akciğer, pankreas, melanoma, karaciğer, mesane ve meme kanserlerinin gelişme riskini arttırmaktadır (Antwi ve ark., 2015; Poon, McPherson, Tan, Teh & Rozen, 2014; Wu ve ark., 2018).

2.3.1.6. Ultraviyole ışınlar ve iyonize radyasyon

Ultraviyole (UV) ışınları tam kanserojen olarak sınıflandırılmaktadır. UV, DNA'da pirimidin dimerlerinin oluşumunu tetikleyerek replikasyon hatalarına yol açmakta ve hücrelerde oksidatif stres artışına neden olmaktadır. UV ışınlarına aşırı maruz kalındığında, en yaygın üç cilt kanseri türü; bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom veya malign melanoma oluşma riskinin arttığı belirtilmektedir (D'Orazio, Jarrett, Amaro-Ortiz & Scott 2013). İyonize radyasyon ise, kovalent bağları kırarak elektronları serbest bırakabilen yüksek enerjili bir radyasyon türüdür. IR, çift zincir ve tek zincir kırıklarını indükleyerek DNA yapısını doğrudan etkilemektedir. İkincil etki olarak, proteinlerin ve lipidlerin oksidasyona uğramasına yol açan reaktif oksijen türlerinin birikimine yol açmaktadır. Bu değişiklikler, hücrelerde genomik bütünlüğün bozulmasına ve kanserleşmeye neden olmaktadır (Borrego-Soto, Ortiz-López & Rojas-Martínez 2015).

2.3.1.7. Virüs ve bakteriler

Kanser olgularının yaklaşık %20'sine enfeksiyonların neden olduğu düşünülmektedir (Oh & Weiderpass 2014). Birçok bakteri ve virüs, konakçı hücreleri enfekte ettikten sonra, konakçı faktörlerini kullanmakta ve manipüle etmektedir. Bu manipülasyonlar konakçı hücrenin bütünlüğünü etkilemekte ve kanserleşme sürecini hızlandırmaktadır (van Elsland & Neeffjes 2018). Uzun süreli kalıcı enfeksiyonlar oluşturma eğiliminde olan onkogenik DNA ve RNA virüsleri, konakçı bağışıklık tepkisinden kaçış ile viral genleri indükleyerek doğrudan mutajenik etki göstermektedirler. Ayrıca, kronik inflamasyon gibi ek faktörlerle ile konak hücrede oksidatif stres artışına neden olarak dolaylı yoldan kanserleşmeye neden olmaktadır (McLaughlin-Drubin & Munger 2008). En iyi bilinen onkogenik virüsler arasında insan papillomavirüsleri (servikal kanser ve deri kanserleri), Epstein-Barr virüsü (nazofaringeal karsinoma, Burkitt's lenfoma ve Hodgkin lenfoma), Kaposi sarkoma

ile ilişkili herpes virüsler, Hepatit B ve hepatit C virüsleri (karaciğer kanserleri) yer almaktadır. Bakteriler ise, WHO tarafından Sınıf I kanserojenler olarak tanımlanmaktadır ve birçok kanserlerle ilişkili olarak çeşitli bakteriyel enfeksiyonlar bildirilmiştir. *Helicobacter pylori*'nin gastrik kanserlerin, *Opisthorchis viverrini*'nin safra kesesi kanserlerinin, *Schistosoma haematobium*'un mesane kanserlerinin gelişimde etkili olduğu bilinmektedir (Eyvazi ve ark., 2020; Rolston, 2017).

2.3.2. Kanser oluşumunda etkili iç etmenler

Kanseri başlatıcı hücre genomunda hücrenin yaşamsal dengelerini, farklılaşmasını ve fonksiyonlarını kontrol eden genlerde rastgele ortaya çıkan mutasyonlar ve mutasyona sahip hücrelerin genomik kararsızlığa bağlı olarak daha fazla mutasyona açık bir fenotip kazanması kanserleşme sürecinde iç etmenlerin varlığını açıkça ortaya koymaktadır (Wu ve ark., 2018). Kanser gelişiminde rol oynayan genler başlıca iki gruba ayrılmaktadır; Onkogenler ve Tümör süpressör genler. Kanser hücrelerinde bu iki gen grubunun ya mutasyona uğradığı ya da yanlış ifade edildiği bilinmektedir (Lee & Muller 2010). Bununla birlikte bağışıklık sisteminin zayıflaması, immün sürveyans mekanizmasında bozukluklar, aktiveleştirici enzimler ve kalıtsal dispozisyonlar gibi iç etmenler de malign transformasyona katkıda bulunmaktadır (Wu ve ark., 2018).

2.3.2.1. Onkogen aktivasyonu

İnsan vücudundaki hücre sayısı, hücre çoğalması, hücrelerin belirli fonksiyonları yerine getirmek üzere geçirdiği farklılaşma süreçleri ve hücre ölümünün sıkı kontrol altında düzenlenmesiyle dengede tutulmaktadır. Bu süreçler protoonkogenler olarak adlandırılan genler tarafından sağlanmaktadır. Hücrelerin çoğalma ve farklılaşma süreçleri sona erdiğinde pek çok protoonkogen baskılanmaktadır (Münger, 2002). Ancak, kanser hücrelerinde protoonkogenlerdeki baskılanma ortadan kalkmakta ve hücre bölünmesi kontrolü sağlanamamaktadır. Kanser gelişimine katkıda bulunan hatalı protoonkogenler “onkogen” adını almaktadır. Onkogenler dominant etkili olup tek allelde meydana gelen değişiklik transformasyon için yeterli olmaktadır. Onkogen aktivasyonu; hücre proliferasyonu ve programlı hücre ölümü gibi süreçleri; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve reseptörleri ve apoptoz düzenleyicileri gibi değişik fonksiyonlar ile kontrol ederek çoğalma avantajına sahip hücrelerin artan bir oranda hayatta kalmasını sağlamaktadır.

(Bild ve ark., 2006). Protoonkogenlerin onkogenelere dönüşümünü sağlayan mekanizmalar nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları (overekspresyon), translokasyon ve delesyon, onkogene özgü reseptör aktifleşmesi, retroviral promotör veya enhancer entegrasyonu, antionkogen kaybı, regülatör bölge mutasyonları ve hipometilasyonlarıdır (Lee & Muller 2010; Matsui, Ihara, Suda, Mikami & Semba, 2013; Zheng, 2013).

2.3.2.2. Tümör süpressör inaktivasyonu

Tümör süpressör genler, bozulmuş hücre döngüsünü baskılayan, DNA replikasyonu ve tamir mekanizmaları ile hücre bölünmesinin hatasız şekilde sonlanmasını kontrol eden (gatekeeper genler: p53, Rb), mutasyonların düşük seviyede tutulmasını, böylece genomun stabil kalmasını sağlayan ve gerekli koşullarda hücreyi programlı hücre ölümüne teşvik eden (caretaker genler: DNA tamir genleri ve proapoptotik genler) genlerdir. Tümör süpressör inaktivasyonuna neden olan mekanizmalar nokta mutasyonu, delesyon, heterozigosite kaybı, gen dönüşümleri, mitotik rekombinasyon, mitotik nondisjunction sonucu kromozom kayıpları ve metilasyon artışıdır. Tümör süpressör genler resesif etkili genler olup transformasyon için değişimin her iki allelde (çift vuruş hipotezi) birlikte gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu değişimler yaşam içerisinde somatik olarak arka arkaya kazanılabilir özellikte olabildiği gibi, tek alleldeki değişim kalıtsal olduğu ve nesiller boyu aktarılarak kanser predispozisyonuna ve ailesel kanserlerin ortaya çıkmasına neden olduğu; ailesel retinoblastom, kalıtsal meme ve over kanseri sendromu, herediter non-polipozis kolorektal kanser gibi örneklendirilebilecek durumlar da mevcuttur (Chial, 2008; Knudson, Meadows, Nichols & Hill 1976; Lee & Muller 2010).

2.3.2.3. Bağışıklık sisteminin zayıflaması ve immün sürveyans mekanizmasındaki bozukluklar

Bağışıklık sistemi; kanser hücrelerini üç farklı mekanizmayla ortadan kaldırmaktadır. İlk olarak, bağışıklık sistemi viral enfeksiyonları yok ederek veya baskılayarak konak hücreyi viral enfeksiyon kaynaklı kanserlerden koruyabilir. İkinci olarak, patojenlerin enfeksiyon başlamadan ortadan kaldırılması inflamasyonun engellenmesi anlamına gelmektedir. Bu şekilde tümör uyarıcı inflamasyonun ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. Üçüncü olarak ise, immün sistem kansere özgü antijenleri

spesifik olarak tanımlayabilmekte ve kanser hücrelerini ortadan kaldırmaktadır (Swann & Smyth, 2007). İmmün sürveyans, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sisteminin gücünü ifade etmektedir ve sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler kanser hücrelerini bu mekanizma sayesinde ortadan kaldırmaktadır (Dunn, Old & Schreiber, 2004; Ribatti, 2017). Ancak kanser hücrelerinde kazanılan immünojenite kaybı hücrelerin bu mekanizmadan kaçmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, düşük immünojeniteye sahip kanser hücrelerinin immün sürveyanstan kaçma olasılığı daha yüksek olmaktadır. Kanser hücreleri majör doku uygunluk kompleksi-I (MHC-I) ekspresyonunu düşürerek sitotoksik T hücrelerinden kaçabilmektedir. Ayrıca, kanser hücre yüzeyinde ekspres edilen programlı hücre ölümü 1 (PD-L1) immün kontrol ligandı da T hücre yüzeyinde bulunan PD-1 reseptörüne bağlanarak T hücrelerinin aktivasyonunu engellemekte ve sitotoksik T hücrelerini apoptoza teşvik etmektedir (Feins, Kong, Williams, Milone & Fraietta 2019; Han, Liu & Li 2020).

2.3.2.4. Kalıtsal dispozisyonlar

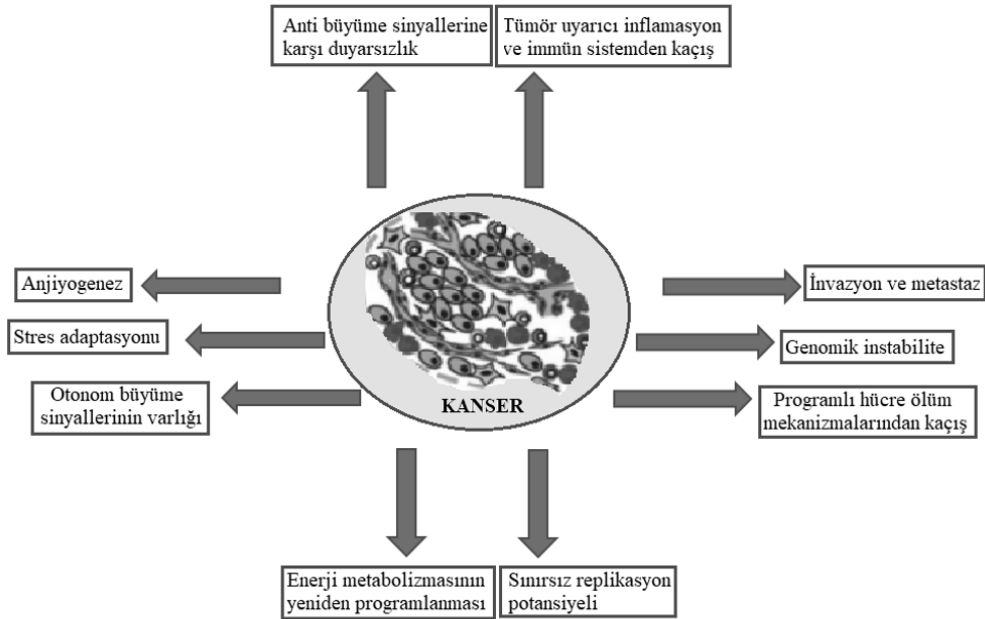
DNA hasarlarının tespitinde veya DNA tamir mekanizmalarında görevli genlerde ailesel mutasyonlar ile karakterize olan resesif kalıtıma sahip bazı hastalıklar (Bloom sendromu, Fanconi anemisi, Ataxia telangiectasia, Xeroderma pigmentosum) kansere yatkınlığın artış gösterdiği hastalıklardır. Bloom sendromu ve Fanconi anemilerinde lösemi gelişimine; Ataxia telangiectasia ve Xeroderma pigmentosum hastalıklarında ise cilt kanserlerinin gelişimine yatkınlık söz konusudur (Garber & Offit, 2005).

2.3.2.5. Aktifleştirici enzimler

Aktifleştirici enzimler sekonder karsinojenlerin etkilerini ortaya çıkaran metabolizma enzimleridir. Bu enzimlerin aktiviteleri sonucu prokarsinojenik bir madde karsinojenik bir ara ürüne ya da son ürüne metabolize olmaktadır. Örneğin bir karaciğer detoksifikasyon enzimi olan aril hidrokarbon hidroksilaz aktivitesi sonucu aromatik hidrokarbonlar, karsinojenik epoksit türevlerine dönüşerek kanser gelişimini uyarmaktadır (Molenaar, Maciejewski, Wilpink & van Noorden 2018; Pflieger, Harvey, Yan & Hariharan 2007; Silva & Carvalho, 1992).

2.4. Kanser hücrelerinin genel özellikleri

Hanahan ve Weinberg 2000 yılında neoplastik oluşumların kanserleşme sürecini açıklayan ve lokal olarak kanserleşen hücrenin özelliklerini kapsayan 6 farklı karakteristiği açıklamışlardı. Bu karakteristikler arasında otonom büyüme sinyallerinin varlığı, anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık, programlı hücre ölüm mekanizmalarından kaçış, sınırsız replikatif potansiyel, anjiyogenez, invazyon ve metastaz yeteneği yer almaktadır (Hanahan & Weinberg, 2000). Ancak günümüz perspektifinde kanser hücrelerinin oluşum sürecini ve progresyonunu kapsayan pek çok basamağın tümör mikroçevresi tarafından desteklendiği, kanserleşme sürecinin sadece kanser hücrelerini ilgilendiren bir süreç olmadığı kesinlik kazanmıştır. Bu nedenle kanser hücrelerinin agresifliğinin artmasında önemli rol oynayan hem kanser hücrelerini hem de mikroçevresini kanser progresyonuna göre yeniden programlayan değişimler de kanser karakteristikleri arasına eklenmiştir. (Fouad & Aanei, 2017; Hanahan & Weinberg, 2011; Meirson ve ark., 2020). Güncellemeye göre genomik instabilite, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, tümör uyarıcı inflamasyon, immün sistemden kaçış ve stres adaptasyonu kanser progresyonunu sağlayan önemli parametreler arasında yer aldığından kanser hücrelerinin karakteristikleri arasına eklenerek kanser karakteristikleri 11 başlık altında toplanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Kanser hücrelerinin genel karakteristikleri (Meirson ve ark., 2020)

2.4.1. Otonom büyüme sinyallerinin varlığı ve anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık

Normal hücreler, doku homeostazını kontrol altında tutarak çoğalmak ve bu döngüyü korumak için sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu durum, hücrenin bulunduğu çevre içerisindeki diğer hücreler tarafından salınan hücre döngüsü ve büyüme sinyallerine (büyüme ligandları, reseptörleri ve sitozolik sinyal molekülleri) bağlı yönlendirilmektedir. Bu sinyaller, epitel veya stromal hücreler tarafından üretilen “büyüme teşvik edici” ve “büyüme inhibe edici” olarak işlev görmekte olup hücreler arası boşluğa salınarak sadece onu üreten hücrede değil, aynı zamanda çevredeki diğer hücrelere de proliferasyona ya da inhibisyona neden olabilmektedir (Fouad & Aanei, 2017). Kanser hücresinin büyüme ortamında ise büyüme ve çoğalma ligandları, tümör ilerlemesini teşvik etmek üzere otokrin veya parakrin olarak hareket etmektedir. Yani kanser hücrelerinin yaşamı eksojen büyüme faktörlerine bağlı değildir. Ekstrasellüler matrikse salgıladıkları kendi mitojenik faktörlerinin endojen üretimi yoluyla bu bağımlılıktan kaçınırlar ve otokrin sinyalizasyon ile sürekli proliferasyonu uyarırlar (Leber & Efferth, 2009). Kanser hücreleri, embriyogenez ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde görev yapan büyüme faktörlerini ve o faktörlerin bağlandığı reseptörleri sentezleme yeteneğine sahiptir (Witsch, Sela & Yarden, 2010). Sonuç olarak bu hücreler büyüme sinyallerini yeniden regüle ederek ve anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlaşarak, çoğalma potansiyellerinin devamlılığını sağlayabilmektedir (Amin ve ark., 2015). Kontrolsüz proliferasyon sinyalleri dışında, kanser hücrelerinde otonom büyüme sinyallerinin devamlılığı ve anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlığa neden olan diğer mekanizmalar arasında alt proliferatif yolları uyaran aktifleştirici somatik mutasyonlar, proliferatif sinyalizasyonu düzenleyen geri besleme mekanizmalarındaki bozukluklar, hücre senesensinin bozulması, kontakt inhibisyon kaybı ve TGF- β sinyalizasyon bozukluğu yer almaktadır (Neha, 2021; Syed, 2016). Kanser hücrelerinde disfonksiyon gösteren proliferatif yollar arasında başlıca PI3K/Akt/mTOR/GSK-3 β , MAPK/ERK, JAK/STAT, Wnt/ β -katenin ve TGF- β /Smad2/3 sinyalizasyonları yer almaktadır (Feitelson ve ark., 2015; Fritz & Fajas, 2010; Syed, 2016).

2.4.2. Programlı hücre ölüm mekanizmalarından kaçış

Hücre ölümü embriyonik gelişimde, organizmanın homeostazisinin devamlılığında ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Geçmiş yıllarda programlı hücre ölümü üç tip (apoptoz, otofaji ve nekroptoz) olarak sınıflandırılırken güncel kaynaklarda uyaran faktörlere, moleküler mekanizmalara ve hücrenin morfolojik özelliklerine göre yeni ölüm tipleri karakterize edilmiş ve 2018 yılında molekül odaklı bir şekilde çoklu hücre ölüm türleri Hücre Ölümü Nomenklatür Komitesi tarafından listelenmiştir (Galluzzi ve ark., 2018, Tablo 2). Buna göre sinyalizasyon gereksinimine bağlı olarak hücre ölümü programlı hücre ölümü ve programlı olmayan hücre ölümü olarak iki ana grupta kategorize edilmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Hücre Ölümü Komitesi (2018)'ne göre hücre ölümü sınıflandırması. Hücre ölümü tipleri, sinyal bağımlılıklarına, morfolojik özelliklerine ve moleküler mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır (Galluzzi ve ark., 2018).

Programlı hücre ölümü intrasellüler sinyal ileti yolları tarafından sıkı bir şekilde regüle edilirken, programlı olmayan hücre ölümü beklenmeyen ve ani gelişen bir hücre hasarı sonucunda hücrenin rastgele ölmesini ifade etmektedir. Programlı hücre ölümleri morfolojik karakteristiklere ve moleküler mekanizmalara bağlı olarak apoptotik ve non-apoptotik programlı hücre ölümleri şeklinde gruplandırılmaktadır.

Apoptotik gruptaki ölümler kaspaz bağımlı olup hücre membran bütünlüğü korunmaktadır. Apoptotik olmayan hücre ölümlerinde ise kaspaz bağımsızlığı ve membran parçalanmaları söz konusudur. Ek olarak non-apoptotik hücre ölümleri; 1. Vakuol ilişkili (Otofaji, Entoz, Methuoz, Paraptoz); 2. Mitokondri ilişkili (Mitoptoz, Parthanatoz); 3. Demir bağımlı (Ferroptoz); 4. İmmün bağımlı (Piroptoz, NEToz) ve 5. Diğer (Nekroptoz) olmak üzere beş alt grupta incelenmektedir (Yan, Elbadawi & Efferth, 2020).

Tablo 2. Hücre ölümü tipleri, özellikleri ve tespit metodları

Hücre ölümü	Uyarıcı faktörler	Anahtar molekül	Belirgin morfolojik karakteristik	Tespit metodları
Nekroz	Enfeksiyon, toksinler, fiziksel hasar, iskemik travma, nörodejenerasyon sonucu ani olarak gelişir.	Yok	İyon pompalarının bozulmasına bağlı sitoplazmik şişme (onkoz), plazma membran bütünlüğünün bozulması, organel kaybı, kromatin kondensasyonu olmadan DNA'nın rastgele degrades olması	Hücre ölümünü ve membran geçirgenliğinin tespiti için laktat dehidrogenaz aktivite ölçümü ve hücre membranından geçmeyen DNA'ya bağlanabilir özellikte boyalann kullanımı ile morfolojik analizler
Anoikis	Apoptozun özel bir türü olarak apoptotik sinyal yoldan ile aktifleşir ancak apoptoz uyarılanından farklı olarak hücre-matriks etkileşiminin yetersiz ve uygunsuz olduğu durumlarda uyanmaktadır. Matriks etkileşimi ve apoptoz arasındaki bağlantı henüz zayıf şekilde aydınlatılabilmektedir.	Ölüm reseptörleri (DRs) ve ligandları; Proapoptotik Bcl-2 üyeleri, Bax, Bak, AIF, kaspaz 8, kaspaz 3, kaspaz 9	Hücre hacminin küçülmesi, zar kabarcıklarının oluşması, hücre membranı biyolojik yapıda değişiklikler (fosfatidilserin translokasyonu), DNA yoğunlaşması, nükleer membranda bozulma ve düzenli nükleer fragmentasyon	TUNEL assay, hücre membranından geçmeyen DNA'ya bağlanabilir özellikte boyalar ile birlikte Annexin V boyama, parçalanmış PARP assay, Kaspaz assay, alça sitometrik analizler, Western blot tabanlı analizler, floresan mikroskop tabanlı analizler
Apoptoz	DNA hasarı ve stres koşullarında ölüm reseptörleri (dış yolaç), mitokondriyal (iç yolaç), perforin/granzim aracılı olarak üzere üç sinyal yolağı apoptozu uyarabilir. Bilinen pek çok uyarıcı mevcuttur. En iyi aydınlatılmış olan hücre ölüm tipidir.	UKL1, PI3KIII, ATGs, LC3	Büyük intrasellüler çift membranlı veziküller, plazma membranında kabarcıklanma, organellerin genişlemesi, kromatin kondensasyonu yokluğunda organel kaybı gözlenir.	Otofaji aktivitesinin ölçümü (uzun ömürlü proteinlerin çevir hızı, LDH ayrılması, otofaji spesifik antikorlarla ve western blot tabanlı analizler
Otofaji	Besin açlığında tetiklendiği iyi bilinmektedir. Ek olarak koruyucu bir cevap niteliğinde hücre stres üzerine başlatılabilmektedir.	RhoA, ROCK1/II, E-cadherin, α-catenin, aktomyosin	Hücre içinde hücre oluşumu, entotik hücrenin konak hücre içersinde lizozom aracılı yıkıma uğratılır ancak otofajiden farklı olarak LC3'ün katılmadığı tek membranlı bir fagozom oluşumu ile parçalanma söz konusu olduğundan vakuol oluşumları gözlenebilir.	Otofaji aktivitesinin ölçümü (uzun ömürlü proteinlerin çevir hızı, LDH ayrılması, otofaji spesifik antikorlarla ve western blot tabanlı analizler
Entoz	İki hücrenin birini içine girmesi sürecidir. Uyanılma süreci tam anlaşılmasın olmalda birlikte fagositozdan farklı olarak RhoA ve ROCK moleküllerinin rol oynadığı, integrin-ekstrasellüler matriks bağlantısının bozulması sonucu uyanıldığı düşünülmektedir. E-cadherin ve α-katenin hücre bağlantı arabirimi aracılığıyla entotik hücre ve konak hücre arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir.	Ras, Rac1, Arf6, Geç endozomal markerlar: LAMP1 ve Rab7	Mikropinozomlardan kaynaklanan çok sayıda içi sıvı dolu tek membranlı vakuol birikimi ile karakterizedir. Nekroza benzer şekilde sitoplazma şişer ve plazma membran bütünlüğü bozulur.	Entoz tespiti için henüz spesifik bir tespit yöntemi bulunmamaktadır. Floresan mikroskobik analizler ya da elektron mikroskobu ile morfolojik analizi önerilmektedir.
Methuo z	Apoptoz bozukluğunda RAS hiperaktivasyonu ile uyarılır. Ras, Rac1'i aktive ederek mikropinositozu tetikler. Aynı anda gerçekleşen Arf6 miktarındaki azalma makropinozom geri dönüşümünü engeller ve yeni oluşan çok sayıda makropinozom birleşerek büyük sitoplazmik vakuoller oluşturur. Lizozomal yoldan parçalanamayan bu vakuoller sonucunda hücre ölümü gerçekleşir.	Bilinmemektedir.	Endoplazmik retikulum ya da mitokondriden köken alan tek membranlı sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterizedir.	Elektron mikroskobu ile morfolojik analiz
Parapto z	Son yıllarda bazı çalışmalarda insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) reseptörünün MAPK ve JNK alt yollarını uyararak paraptozisi indükledebildiği gösterilmesine rağmen uyarıcı faktörler ve moleküler mekanizmaları henüz anlaşılmasın.	Bax, Bak, TIMM8a(DDP), Ddp1	Mitokondrinin kaybı, mitokondriyal retikulumun küçük küresel organellere ayrılması	Fragmente mitokondrinin Mito Tracker Green gibi mitokondri spesifik boyalar ile boyanması ve floresan mikroskobu ile elektron mikroskobu, sitokrom c ve TIMM8a/DDP spesifik antikorlarla ve western blot analizi
Mitoptoz	Uyarıcı faktörler üzerine araştırmalar devam etmektedir. Mitokondrinin otofajik yol ile ortadan kaldırılmasının aksine mitoptoz ATP sağlama kapasitesinin eş zamanlı olarak azaldığı mitokondrinin programlanmış fisyon ve füzyon süreçlerini ifade etmektedir. Hem apoptoz hem de otofaji ile ilişkilidir. Bax ve Bak tarafından mitokondriyal dış zar geçirgenliği tetiklenerek TIMM8a(DDP) olarak isimlendirilen mitokondri zarları arasında lokalize bir translokazın salınımı tetiklenir. DDP, sitoplazmada Drp1'e bağlanarak fisyonu tetikler. Süreç henüz tam anlamıyla anlaşılmasın ancak mitoptozun morfolojik karakteristiği kesindir.	PARP, AIF	Hücre membran bütünlüğü bozulur. Mitokondriyal dış membranda permeabilizasyon gerçekleşir. Kromatin kondensasyonu ve DNA'nın büyük parçalar halinde fragmentasyonu gözlenir.	PAR bütünlüğü, PARP aktivasyonu ve nükleer AIF pratik olarak kullanılan parthanatoz belirteçleridir. Süreç mitokondriyal depolarizasyonun tespiti ile desteklenir.
Parthana to z	PARP hiperaktivasyonu ile karakterize, kaspaz bağımsız, mitokondri ilişkili ölüm tipidir. PARP, PAR sentezini uyarılması ile sitoplazmaya geçiş yapar sonrasında AIF salınımı gerçekleşir. Serbest AIF mitokondriden nükleusa translokasyon olur. DNA kırıklarına ve kromatin kondensasyonu uyarır. Apoptotik süreçten farklı, PARP yıkımı olmadan PARP'nin bütün olarak aktifleşmesidir. Süreç kaspaz inhibitörleri ile bloke edilememektedir. Parthanatoz uyarılan araştırmaya devam etmektedir.	Sistem XC -, GPX4, lipidik ROS birikimi	Normal bir morfoloji ile ilişkilidir. Hücre membranı sağlamdır, nükleus boyutu normaldir ve kromatin yoğunlaşması yoktur. Ancak mitokondri kristalleri küçülmüştür, membran yapıları hasara uğramış ve küçülmüş mitokondri birikimi gözlenir.	Ferroptoz inhibitörlerinin kullanımı (ferrostatin-1, liprostatin-1), lipid peroksidasyonun MDA miktarının ölçümüne dayalı olarak tespiti
Ferroptoz	Ferroptoz glutatyon bağımlı antioksidan savunma sistemi yetersizliğinde uyarılan sistem XC kusurlarına ya da GPX4 kusurlarına bağlı gelişen ölüm tipidir. Sistem XC, hücre dışındaki sistemleri hücre içine alarak GSH sentezi için gerekli sistemleri sağlar. GPX4 ise hücre dışı lipid peroksidasyon seviyesini azaltmak için glutatyon ve lipid hidroperoksidler arasındaki reaksiyonu doğrudan katalize eder. Her iki mekanizmanın da bozulması lipid peroksidasyonun artmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu serbest demirin lipid hidroperoksidler ile edleşerek Fenton reaksiyonu sonucu gelişen lipidik ROS artışı tetiklemekte ve hücre ölümü gerçekleşmektedir.	NLRs, ALRs, kaspaz-1, kaspaz-11	Hücre şişer, hücre membran bütünlüğü bozulur. Por yapıları oluşur. Sürece DNA yoğunlaşması ve fragmentasyonu eşlik eder.	Sitoplazmik LDH'nin kantitatifasyonu, floresan mikroskobu ile membran bütünlüğü kaybının görselleştirilmesi, interlökin (IL)-1β'nin salınması, kaspaz aktivasyonu ve western blot analizi ile gasdermin D tespiti ile değerlendirilebilir.
Pirop to z	Intrasellüler patojenlerin immün sistem hücreleri tarafından tanınması ile başlatılan inflamatuvar bir ölüm sürecidir. Enfekte makrofajların inflamasyon sensörleri (NLR) patojenlerin flagelin birleşimlerini tanıır. Daha sonra kaspaz-1'i aktive eden multi-protein kompleks inflamasyonların oluşumunu başlatır. Aktivasyon üzerine, kaspaz-1, gasdermin D'nin bütünsel yolunuyla zar gözenek oluşumuna aracılık eder ve hücre zarının yırtılmasına izin verir. Ayrıca kaspaz-11, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) tarafından doğrudan aktive edilebilir ve piropotozu indükledebilir.	NOX4, PAD4	Kromatin dekonkonsasyonu, membran bütünlüğünün bozulması	Nötrofil den salınan moleküllerin ve ekstrasellüler DNA'nın eş zamanlı boyanması, alça sitometrik teknikler
NE To z	Süreç, nötrofillere özgü bir ölüm tipidir. Nötrofiller tarafından patojenler tanındığında histon modifikasyonu, kromozom dekonkonsasyonu ve NET ismi verilen nötrofil ekstrasellüler tuzak moleküllerinin salgısı başlatılmaktadır. Sürece NOX4 ve PAD4'ün eşlik ettiği gösterilse de mekanizması henüz aydınlatılabilmektedir.	DRs, TLRs, TCR, RIPKs, MLNKC	Nekrotik morfoloji, hücre ve mitokondri şişmesi, hücre membran bütünlüğünün bozulması ve organel kaybı	Membran geçirgenliğinin gözlenmesi için floresan boyama teknikleri, mitokondriyal depolarizasyon detektasyonu, nekroptoz spesifik inhibitör kullanımı, nekroptoz spesifik antikorlarla ve Western blot bazlı protein analizleri
Nekroptoz	Programlanmış nekroz tipidir. Ölüm reseptörleri (DRs), Toll-like reseptörler (TLRs) ve T-hücre reseptörleri tarafından gelen sinyaller üzerine aktifleşen rasptör-etiklesimli protein kinazların (RIPKs) (RIPK3 ve RIPK1) MLNKC'ye fosforilasyonu ile aktive ederek oligomerize MLNKC'nin hücre membranında permeabilizasyonu neden olması hücre ölümüne yol açmaktadır. Ayrıca, RIP3'e bağlı nekroptoz, viral enfeksiyonun veya çift sınımlı viral DNA'nın varlığı ile sitozolik DNA sensörü, interferon (DAI) düzenleyici faktörlerinin DNA'ya bağlı aktivatörü tarafından da tetiklenir.			

Karsinogenezde hücre ölümü süreçlerinin düzensizliği son derece önemlidir. Hücre ölümü ve kanser arasındaki ilişki karmaşık moleküler temellere sahiptir ve bu alandaki çalışmalar artan şekilde devam etmektedir. Kanser hücrelerinin bilinen en iyi özelliklerinden biri programlı hücre ölüm tiplerinden başarılı bir şekilde kaçabilmesidir (Fernald & Kurokawa, 2013). Bu nedenle çeşitli ajanlar ve ilaçlar kullanılarak kanser hücrelerinde tekrar programlanabilir hücre ölümlerinin uyarılabilmesi hedeflenmektedir. Hücrelerde mekanizması en iyi aydınlatılmış programlı hücre ölüm tipi apoptozdur. Apoptozun moleküler mekanizması, uyarıları, anahtar molekülleri ve morfolojik karakteristikleri kanser hücrelerinde de iyi bilinmektedir (Elmore, 2007; Kaczanowski, 2016; Tablo 2). Pek çok kanserde Bcl-2 ve Bcl-X_L anti-apoptotik proteinlerinin yüksek ekspresyonu söz konusudur. Ek olarak proapoptotik faktörlerin (Bax, Bim, PUMA), apoptozu tetikleyen kaspazların ve apoptoz indükleyici faktörün (AIF) ekspresyonundaki azalmalar kanser hücrelerinin, apoptozdan kaçışını sağlamaktadır (Cotter, 2009; Mishra ve ark., 2018). Bu nedenle pek çok çalışma kanser hücrelerinde apoptozun yeniden programlanabilmesi ve kanser hücrelerinin apoptotik yoldan kontrollü ölümü üzerine odaklanmıştır ve bu alanda çalışmalar hala devam etmektedir (Carneiro & El-Deiry, 2020).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar kanser hücrelerinin çeşitli ajanlara ve uyarılara yanıt olarak birden fazla hücre ölümünü uyarılabildiğini ve bazı hücre ölüm tiplerinin kanser hücreleri üzerinde ikili hatta zıt etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Flemming, 2007; Jung, Jeong & Yu, 2020, Yan ve ark., 2020). Nekrozun kontrol edilemez bir süreç olduğu ve kanser hücrelerinde proinflamatuvar etki yaratarak tümör ilerletici etkilerinin olduğu bilinmektedir (Syntichaki & Tavernarakis, 2002; Yan ve ark., 2020). Otofajinin ise erken evrede kanser gelişimini önlemek için önemli bir mekanizma olduğu ve kronik hücre hasarının önlenmesine yardımcı olduğu düşünülmeye rağmen, özellikle apoptoz mekanizmasında bozukluklara sahip olan agresif kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizması olarak geç evrede otofajiyi kullandıkları literatür verileri arasındadır (Jung ve ark., 2020; Mulcahy Levy & Thorburn, 2020; Yun & Lee, 2018). Benzer şekilde entozun da kanserin evresine bağlı olarak ikili rol oynadığı gösterilmiştir (Durgan & Florey, 2018; Wang ve ark., 2019). Kanser hücrelerinde nekroptoz ve ferroptoz mekanizmaları da aydınlatılmış durumdadır. Hatta apoptoz, piroptoz ve nekroptoz gibi kaspaz bağımlı hücre

ölümlerinden kaçabilen kanser hücrelerinde, alternatif olarak ferroptozaya karşı duyarlılığın artabileceğini öneren raporlar mevcuttur (Bebber, Müller, Prieto Clemente, Weber & von Karstedt, 2020; Yu, Guo, Xie, Wang & Chen, 2017).

Tablo 2’de özetlenmiş olan diğer hücre ölümü tipleri ise endojen olarak kanser gelişiminde ve ilerlemesinde çok daha az yer tutmaktadır ve çoğunlukla vücudun kansere karşı savunma stratejileri olarak kullanılmaktadır. Bu ölüm tiplerini ilgilendiren sinyalleşmelerdeki kusurlar ise dolaylı olarak kanserde ilaç direnci ve klinik başarısızlıklara yol açmaktadır (Yan ve ark., 2020).

2.4.3. Sınırsız replikatif potansiyel

Kanser hücrelerinin ölümsüzleşmesi yani sınırsız replikasyon potansiyeli, malign davranışlar için gerekli olan kritik bir özelliktir. Sınırsız replikasyon potansiyeline katkı sağlayan mekanizmalar arasında kanser hücrelerinin senesensden kaçması, devamlı telomeraz aktivitesi ve telomeraz enziminin kanser hücrelerinde yeni fonksiyonlar kazanması yer almaktadır. Telomerler; ökaryotik kromozom uçlarında bulunan ve tekrarlı TTAGGG dizilerinden oluşan yapılardır. Normal hücrelerde telomerlerin kromozom uçlarında genomik bütünlüğün korunmasını ve hücre bölünmesi sırasında kromozom uçlarının doğru şekilde replike olmasını sağlamak gibi önemli görevleri bulunmaktadır. Telomerler her hücre bölünmesi sonunda kısalarak hücrenin bölünme kapasitesini sınırlayıcı (senesensi uyarıcı) ve böylece hücreye yaşlanma sinyali veren kritik oluşumlardır. Ancak kanser hücrelerinin büyük çoğunluğunda telomer uzunluğu, telomeraz adı verilen reverse transkriptaz enziminin aktivasyonu nedeni ile korunmaktadır (Sarni & Kerem, 2017). Normal hücrelerde inaktif olan telomeraz enziminin kanser hücrelerinde yeniden aktive edilmesi kanser hücrelerinin sınırsız replikasyon potansiyeline katkıda bulunan en yaygın mekanizmadır. Kanser hücrelerinde telomerazın katalitik alt birimi olan telomeraz ters transkriptazın (TERT) promotöründeki meydana gelen mutasyonlar kanser hücrelerine sonsuz bir replikasyon yeteneği sunmaktadır (Colebatch, Dobrovic, & Cooper, 2019; Jafri, Ansari, Alqahtani & Shay, 2016). Ayrıca kanser hücrelerinde telomer uzunluğunun korunması, telomerlerin alternatif uzaması (ALT) olarak adlandırılan başka bir DNA rekombinasyon mekanizması ile de gerçekleştirilmektedir. Bu mekanizma mezenkimal veya epitel kaynaklı kanserlerin ~%5-15’inde aktif olarak kullanılmaktadır. Telomer korunmasının yanında telomeraz enziminin alt birimi olan

TERT kanser hücrelerinde yeni proliferatif etkili roller de üstlenmektedir (Trybek, Kowalik, Gózd & Kowalska, 2020).

2.4.4. Anjiyogenez yeteneği

Anjiyogenez, kanser hücrelerinin sürekli çoğalabilmeleri için daha fazla besin ve oksijen kaynağına erişimlerini sağlamak üzere yeni kan damarlarının oluşturulmasını kapsayan ve farklı biyomoleküller tarafından kontrol edilen karmaşık bir süreçtir. Endojen lokal veya sistemik kimyasal sinyaller, damarda bir hasar meydana geldiğinde damarlarını onarmak için endotel hücrelerinin ve düz kas hücrelerinin işlevlerini koordine etmektedir. Anjiyogenez sürecinde proteaz üretimi, endotel hücre göçü ve proliferasyonu, vasküler tüp oluşumu, yeni oluşan tüplerin anastomozu gibi düz kas hücrelerinin dahil edilmesi ile son bulan farklı aşamalar yer almaktadır. Oksijen ve besin kaynağına ulaşmak ve atık ürünlerin uzaklaştırılması kanser hücrelerinin çoğalması ve metastatik yetenek kazanması için majör öneme sahiptir. Bu yol vasküler ağdaki yeni büyüme ile sağlanmaktadır. Bu süreçte sırasıyla anjiyogenez ve lenfanjiyogenez ile birlikte yeni kan ve lenfatik damarlar oluşmaktadır. Kanseri hücreleri, önceden var olan damarlardan çeşitli moleküler ve hücrel mekanizmalar yoluyla yeni kan damarı oluşumunu (anjiyogenez) indükleyerek vaskülarize edebilmektedir. Kanserde anjiyogenez uyarıcı mekanizmalar arasında vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) aşırı aktivasyonu, tümör mikroçevresinde yer alan damar perisit hücrelerinin progresyon yönünde rol oynaması, kemik iliğinden köken alan hücrelerin davranışlarındaki değişimlerin vasküler progenitör fenotipi indüklemesi yer almaktadır. Yeni damar oluşumu çok sayıda pro- ve anti-anjiyogenik faktör tarafından düzenlenmektedir. Ek olarak anjiyogenezin, tümör hücrelerinin metastatik yeteneği ile doğrudan ilişkili olmasının yanısıra tümör ilişkili inflamasyon oluşmasına da katkı sağlayan bir süreç olduğu ve hipoksik koşullarda anjiyogenez etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (Lugano, Ramachandran & Dimberg, 2020; Nishida, Yano, Nishida, Kamura & Kojiro, 2006; Rajabi & Mousa, 2017).

2.4.5. İnvazyon ve metastaz yeteneği

Kanseri hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneği, uzun yıllar boyunca araştırma odağı olmaya devam etmiştir. İnvazyon; kanseri hücrelerinin çevre dokulara doğrudan yayılmasıdır, dolaşım sistemi veya lenfatik sistem aracılığıyla daha uzak bölgelere ulaşımı sağlayan metastazdan bu anlamda ayrılmaktadır (Krakhmal,

Zavyalova, Denisov, Vtorushin & Perelmuter, 2015). Metastaz ise, kanser hücrelerinin kanserin başladığı primer bölgeden uzak dokulara ve organlara (ikincil bölge) yayılmasıdır. Bu süreç kanser hastalarında mortaliteyi arttıran primer nedendir. Metastatik süreç, metastatik kaskad olarak adlandırılan bir dizi karmaşık sinyalizasyondan oluşmaktadır. Bu kaskad sırasında, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerindeki değişiklikler büyük önem taşımaktadır (Meirson ve ark., 2020). Metastatik süreçte etkisi en iyi tanımlanan mekanizma epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) mekanizmasıdır. Epitel hücrelerin mezenkimal fenotipik özellikler kazanarak invaziv ve metastatik yetenek geliştirmesini sağlayan bu mekanizma bir dizi transkripsiyon faktörü tarafından yönlendiren, kanser hücresinde epitel belirteçlerin kaybı ve mezenkimal belirteçlerin kazanımı ile sonuçlanan moleküler bir süreçtir. Bir bölgede lokalize olan kanser hücrelerinin bu sürece aynı anda girmedikleri, sürecin epitel ve mezenkimal yönde bir döngü şeklinde ilerleyebildiği bilinmekte ve bu durum kanser hücrelerinde “plastisite” ile açıklanmaktadır (Lu & Kang, 2019). Ek olarak stromada yer alan makrofajların salgıladıkları faktörler ile kanser hücrelerinin invaziv sürecine katkı sağladığı ve lokal invazyonu hızlandırdığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Bhatia, Monkman, Toh, Nagaraj & Thompson, 2017; Ishay-Ronen & Christofori 2019).

2.4.6. Genomik instabilite

Genomik instabilite tanım olarak; DNA baz çifti mutasyonlarından, mikrosatellit instabilite gibi küçük yapı varyasyonlarına ve hatta kromozom sayısı ve yapısını ilgilendiren kusurlara kadar geniş çerçevede genom kararsızlığını içermektedir. Telomer hasarları, sentrozom amplifikasyonu, mitotik bozukluklar, epigenetik modifikasyonlar veya tamir edilemeyen endojen ve eksojen kaynaklı DNA hasarları gibi birçok farklı neden ile genomik instabilite oluşabilmektedir. Genomik instabilite çoğu kanserin ortak bir özelliğidir. Genomun stabil halinin bozulması kanserin başlamasına ve hatta progresyonuna neden olabilmektedir. Genomik kararsızlığın kökeninde yatan mekanizmalar ve bu yolun kanserde itici gücünü açıklamaya çalışan farklı hipotezler vardır. Bu hipotezler, gen fonksiyon kaybından kaynaklanan mutator fenotip ve onkogen kaynaklı DNA replikasyon stres modelidir (Ferguson ve ark., 2015; Yao & Dai, 2014). DNA replikasyonu sırasında oluşan hatalar DNA tamir genleri (*ATM*, *ATR*, *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*, *hPMS2* gibi) ile

onarılmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar ilerleyen bir hızda genomik hasar birikimine neden olduğundan bir süre sonra hasar miktarı onarım kapasitesini aşmaktadır. Bununla birlikte genomik instabilite gelişmekte ve kanserleşme eğilimi artmaktadır. Genomik instabilite ve DNA tamir genlerinde oluşan mutasyonlar genomda mutasyon birikim hızı artmış mutator fenotipe yol açmaktadır (Pećina-Šlaus, Kafka, Salamon & Bukovac, 2020). Onkogene bağlı replikasyon stresi ise erken kanser gelişiminde önemli rol oynamakta ve onkogen aktivasyonunu takiben genomik instabiliteye neden olan farklı aşamalardan oluşmaktadır (Liu, Ding & Meng, 2018). Ancak replikasyona bağlı genomik instabilitenin kanser gelişiminin erken evrelerinde önemli rol oyandığı düşünülmesine rağmen kanserli hücrelerin stresli ortama uyum sağladıkça replikasyon dinamiklerini değiştirdiği ve ek stres faktörlerinin genomik instabiliteyi tetikleyerek sürece dahil olduğu bilinmektedir (Negrini, Gorgoulis & Halazonetis, 2010; Sarni & Kerem, 2017).

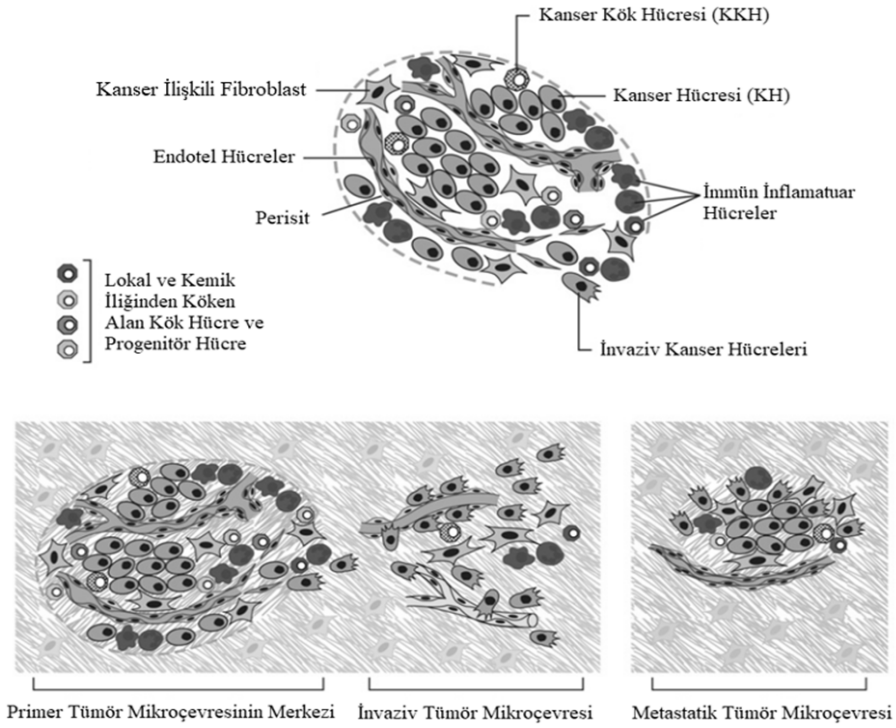
2.4.7. Enerji metabolizmasının yeniden programlanması

Aerobik koşullar altında normal hücrelerde, glukoz öncelikle glikoliz ile sitoplazmada pirüvata; daha sonra enerji karşılığında mitokondride karbondioksit döndürülür. Anaerobik koşullarda ise oksijen tüketen mitokondri devre dışı bırakılarak sadece glikoliz ile enerji üretimi sağlanır. Kanser hücrelerinde değişen enerji metabolizması ilk kez 1930 ve 1956 yıllarında Otto Warburg tarafından aydınlatılmış ve kanser hücrelerinin oksijen varlığında dahi glikolizi tercih ettiği bu süreç “aerobik glikoliz” olarak adlandırılmıştır (Warburg, 1956). Aerobik glikoliz, kanser hücrelerinin oksijeni düşük (hipoksik) koşullarda yaşamaya adaptasyon süreci ile doğrudan bağlantılı onkogenik bir süreçtir. Hipoksik koşullarda kanser hücrelerinde glukoz taşıyıcılarının (GLUT1) artan aktivitesi ile sitoplazmaya glukoz girişinin artırıldığı ve kanser hücrelerinin glikolitik yoldan hızlı bir şekilde enerji sağladığı gösterilmiştir. Yani hipoksik koşullara adaptasyon glikolitik yakım sürecini arttırmaktadır (Carvalho ve ark., 2011). Ek olarak, kanser hücrelerinde aktive olan onkogenlerin ve mutant tümör süpressör genlerin de glikolitik yakım sürecine katkı sağladığı belirlenmiştir. Örneğin, RAS onkoproteini hipoksik koşullarda adaptasyon sağlayan ve hipoksi ile uyarılan transkripsiyon faktörlerinin düzeyini artırarak glikolizin artışına neden olmaktadır (Chun, Johnson, Washburn, Cruz-Correa, Dang & Dang, 2010). Kanser hücrelerinde kısa yoldan hızlı bir şekilde sağlanan biyoenjerji

(ATP), lipitler, nükleotitler, NADPH ve amino asitler gibi önemli moleküllerin biyosentez hızının artışına ve böylece kanser hücrelerinde bölünme hızının artmasına katkı sağlamaktadır (Kim, 2018).

2.4.8. Tümör uyarıcı inflamasyon

Tümör mikroçevresinde oluşan kronik inflamasyonun kanser gelişimini destekler ve progresyonu hızlandırır şekilde sürekli bir uyarıcı rolü üstlendiği ve progresif yönde domino etkisi yarattığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Greten & Grivennikov, 2019). Kanser hücresinden salınan immün modülatör faktörler, hücre dışı ortamda inflamatuvar hücrelerin davranışlarını etkilemektedir. Böylelikle, kanser mikroçevresinde yaygın olarak yer alan immün inflamatuvar hücreler, kanser hücrelerinin çevrelerinde sürekli bir inflamatuvar yanıtı tetiklemeleri nedeni ile kanserli bölgelere “asla iyileşmeyen yara bölgeleri” olarak davranmaktadır. Enfeksiyon ya da yaralanma gibi normal inflamatuvar yanıtın dahil olduğu süreçlerde bu hücrelerin geçici aktiviteleri söz konusu iken, kanser hücrelerinin kronik inflamasyon bölgelerindeki kalıcılıkları, ilgili hücrelerin doku patolojileri ile ilişkilendirilmesine neden olmuştur (Qian, Golubnitschaja & Zhan, 2019). Bu hücreler (makrofaj alt tipleri, nörofiller, T ve B lenfositler) salgıladıkları sitokin molekülleri ile tümörü destekleyici inflamatuvar ortamın devamlılığını sağlarken, ortama salınımını sağladıkları çeşitli tümör büyüme faktörleri (EGF, FGF, TGF- β , PDGF, NGF gibi) ile de kanser progresyonunu uyarmaktadırlar. Ek olarak immün inflamatuvar hücreler mikroçevrede VEGF ve hücre dışı matriks bileşenlerini değiştirici faktörlerin salınımı ile kanser hücrelerinde anjiyogenezi uyaran sinyaller yaratmaktadırlar (Biswas, 2015). Kanser mikroçevresinde inflamasyonun kronikleşmesini sağlayan bir diğer hücre grubu ise kanser ilişkili fibroblastlardır (Ping ve ark., 2021). Bu hücreler hücre dışı matriks bileşenleri salgılama özellikleri ile invaziv ve metastatik süreçlere katkı sağlamaktadır. İmmün inflamatuvar hücrelerin ve kanser ilişkili fibroblastların özellikle metastatik tümör mikroçevresinde birikimi dikkat çekicidir (Comen, Bowman & Kleppe, 2018). Sonuç olarak, kanser hücreleri buldukları mikroçevre içerisinde kronik inflamatuvar ortamda sürekli diğer hücreler ile etkileşim halindedir ve bu ortamda bulunan tüm hücre grupları ve gerçekleştirilen tüm etkileşimler anjiyogeneze, invazyon ve metastaza katkı sağlamaktadır (Hanahan & Weinberg, 2011; Şekil 5).



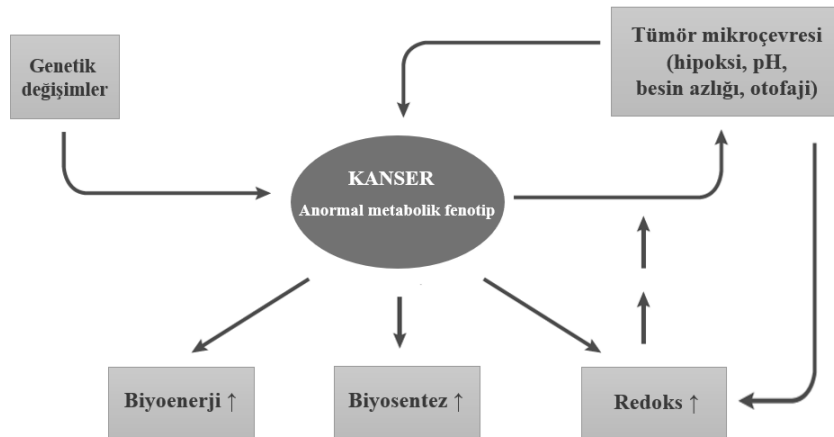
Şekil 5. Kanser mikroçevresinde inflamasyon ve metastaz ilişkili hücre grupları (Hanahan & Weinberg, 2011)

2.4.9. İmmün sistemden kaçış

Kanser hücreleri immün sürveyansa rağmen yaşamaya ve çoğalmaya devam edebilen karakteristiklere sahiptir. Kanser immüno-düzenleme adı verilen sürecin ilk aşamasında kanser hücrelerinin immün sistem hücreleri tarafından belirli bir düzeyde eliminasyonu sağlanmaktadır. İkinci aşama denge aşamasıdır. Bu aşamada hayatta kalmayı başarabilen kanser hücreleri hücre yüzey reseptörlerindeki değişiklikler sayesinde immünojenitesini azaltabilmekte ve immün sisteme dirençli varyantların seçilimi gerçekleşmektedir. Son aşama olan kaçış fazında ise antijen tanıma mekanizmalarındaki değişimlerin hem kanser hücrelerinde hem de efektör hücrelerde gerçekleşmesi, kanserde immünolojik reddin uyarılması, kanser hücrelerinden immün baskılayıcı faktörlerin salgılanması ve kanser hücreleri tarafından immün baskılayıcı inflamatuvar hücrelerin aktive edilmesi gibi yollar ile immün sistemden kaçış gerçekleşmektedir (Messerschmidt, Prendergast & Messerschmidt, 2016).

2.4.10. Stres adaptasyonu

Kanser hücrelerinde süreç içerisinde değişen pek çok genetik, epigenetik ve çevresel faktörün kanserleşme sürecine katkı sağladığı bilinmesine rağmen aslında bu faktörler kanser hücrelerinin hayatta kalmaları için adaptasyon geliştirmelerini gerektiren pek çok koşulu (anormal sinyalizasyon artışı, sürekli DNA hasarı birikimi, hipoksik koşullarda yaşam, besin yetersizliği ve hatta antikanser terapi ilaçlarına maruziyet gibi) da yaratmaktadır. Örneğin DNA hasar birikimine yanıt olarak kanser hücrelerinde DNA hasarı ile uyarılan tamir mekanizmalarının efektif kullanılmaması DNA hasar stresine bir yanıt olarak gelişmektedir. Benzer şekilde besin açlığı ve bazı antikanser ilaçlara yanıt olarak kanser hücrelerinin otofajik ölüm mekanizmasını kullandığı, otofajinin geç evrede kanser hücrelerinde stres cevabı olarak tetiklendiği bilinmektedir (Fouad & Aanei, 2017). Kanserleşme sürecinde değişen ve gelişen yeni intrasellüler düzende pek çok neden ile kanser hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS)'nin aşırı birikimi sonucu oksidatif stres düzeyi artmaktadır. Artan oksidatif stres koşullarında kanser hücreleri yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmek için pek çok iç faktörü yeniden düzenleyerek hem iç oksidatif strese adaptasyon geliştirmekte hem de oksidatif stres koşullarında yaşabileceği dış ortamın düzenlenmesine, hipoksik koşulların devamlılığına ve inflamatuvar tümör uyarıcı çevrenin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Ghoneum, Abdulfattah, Warren, Shu & Said, 2020; Şekil 6).



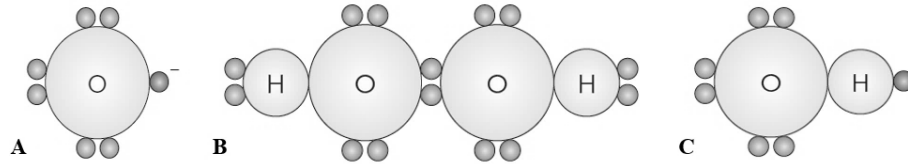
Şekil 6. Kanserde stres adaptasyonunun anormal metabolik fenotip ve tümör mikroçevresi ile ilişkisi

Kanser hücrelerinde gelişen redoks direnci, adaptasyon süreci ve redoks hedefli terapi modelleri mevcut tez çalışmasının ana konusunu oluşturduğundan redoks sinyalizasyonunun kanser biyolojisindeki yeri ve önemi ile oksidatif stres ve kanser terapi ilişkisi detaylı olarak ele alınmıştır.

2.5. Redoks sinyalizasyonu ve kanser biyolojisindeki rolü

2.5.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Oksijen, organizmanın canlılığı ve metabolizmanın devamlılığı için esansiyel bir moleküldür. Ancak biyolojik sistemlerde oksijenin metabolize edilmesi sonucu kimyasal olarak oldukça aktif moleküller olan ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan ürünler açığa çıkmaktadır (Brieger, Schiavone, Miller & Krause, 2012). Bu ürünler moleküler oksijenden (O_2) türemiş olan, kısa ömürlü, oksidatif etkiye sahip olarak hızlı tepkime verebilen atom ya da atom grupları olarak tanımlanmakta; hızlıca birbirine dönüşebilen serbest radikaller ve radikal olmayan ROS türleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Serbest radikaller dış moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren kararsız gruplarken, radikal olmayan ROS türleri eşleşmemiş elektronlara sahip olmayan ancak kimyasal olarak reaktif olan ve radikal ROS'lara dönüşebilme özelliği bulunan türleri kapsamaktadır (Trachootham, Alexandre & Huang, 2009). Biyolojik sistemlerde yaygın olarak bulunan radikal ROS'lar süperoksit (O_2^-), nitrik oksit (NO) ve hidroksil (OH^\bullet) radikalleridir. Radikal olmayan ROS'lar arasında ise hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), peroksinitrat ($RCOOONO_2$) ve hidroksit (OH^-) bulunmaktadır. Her iki grup arasında biyolojik öneme sahip olan, çeşitli hücrel fonksiyonlarda ve hücre içi sinyalizasyonlarda görev alan ROS türleri ise hidroksil (OH^\bullet) radikali, süperoksit (O_2^-) anyonu ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'tir (Winterbourn & Hampton, 2008; Trachootham ve ark., 2009; Şekil 7).

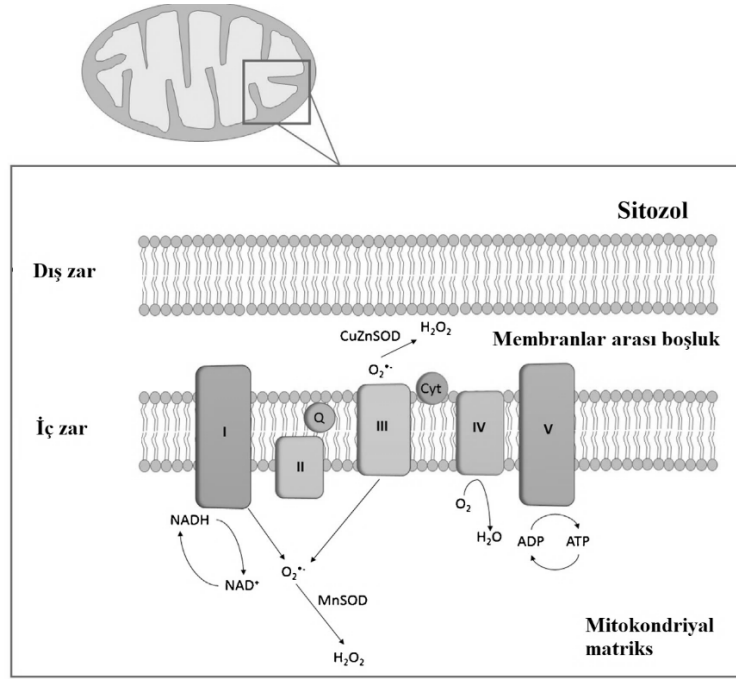


Şekil 7. Biyolojik öneme sahip reaktif oksijen türleri ve kimyasal yapıları (A) süperoksit (O_2^-) anyonu (B) hidrojen peroksit (H_2O_2) (C) hidroksil (OH^\bullet) radikali (Trachootham ve ark., 2009)

2.5.2. ROS kaynakları ve hücrel redoks homeostazisi

Hücre içerisinde reaktif oksijen türlerinin oluşumu endojen ya da ekzojen kaynaklı olarak tetiklenebilmektedir. Eksojen ROS uyaranları arasında çeşitli ilaçlar ve kimyasallar, radyasyon, çevre kirliliği ve ağır metaller yer almaktadır. Biyolojik sistemlerde en önemli endojen ROS kaynağı ise mitokondriyal elektron transport zinciri (Mt-ETS)'dir (Jakubczyk, Dec, Kałduńska, Kawczuga, Kochman & Janda, 2020). Hücrel ROS'un çok büyük bir kısmı Mt-ETS tarafından, kalan kısmı ise başlıca plazma membranında bulunan NADPH oksidaz (NOX) ailesi kompleksleri tarafından, endoplazmik retikulum (ER)'da oksidatif protein katlanma süreci sırasında, ksantin oksidaz (XO) ve diğer oksidaz enzimlerinin aktiviteleri sonucu ve büyüme faktörü sinyalizasyonu sırasında üretilmektedir. Daha az bir kısım ROS ise yağ asidi biyosentezinden sorumlu lipogenaz (LOX) aktivitesi sonucu, ER membranında prostaglandin sentezinden sorumlu prostaglandin endoperoksit sentaz aktivitesi sonucu ve detoksifikasyon reaksiyonlarından sorumlu sitokrom P450 enzim sistemlerinin aktiviteleri sonucu ve immün sistemin fagositik hücrelerinin aktiviteleri sonucu bir yan ürün olarak ortaya çıkmaktadır (Holmström & Finkel, 2014; Jakubczyk ve ark., 2020; Lambeth, 2004; Moloney & Cotter, 2018; Trachootham ve ark., 2009).

Mt-ETS sisteminde yer alan komplekslerde (daha sıklıkla kompleks I ve III'de ve daha nadir olarak kompleks II'de) moleküler oksijenden bir elektron sızıntısı olması sonucu mitokondriyal matriks içerisinde süperoksit (O_2^-) anyonu oluşmaktadır. Süperoksit anyonu hücrede endojen olarak üretilen ilk serbest radikal türüdür. Oluşan O_2^- 'in büyük bir kısmı mitokondriyal manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD, SOD2) enzimi tarafından mitokondri matriksi içerisinde hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülmektedir. Mitokondriyal O_2^- 'in bir kısmı ise kompleks III tarafından mitokondriyal membranlar arası boşluğa salınabilmekte ve burada bakır çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD) enzimi tarafından yine hidrojen peroksit dönüştürülmektedir (Fukai & Ushio-Fukai, 2011; Goncalves, Quinlan, Perevoshchikova, Hey-Mogensen & Brand, 2015; Murphy, 2009; Şekil 8).

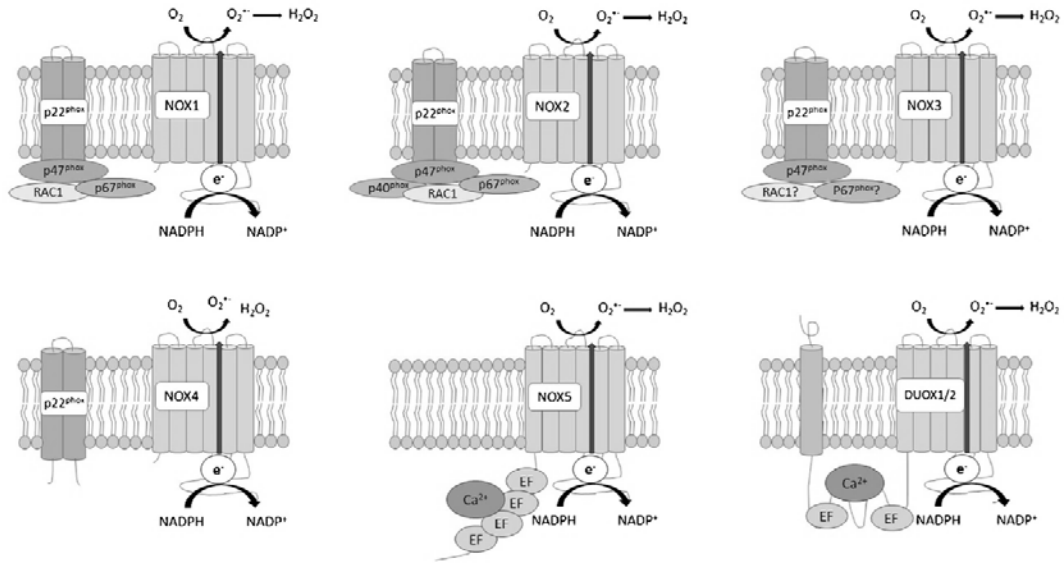


Şekil 8. Major endojen ROS kaynağı olarak mitokondriyal elektron transport zinciri (Moloney & Cotter, 2018)

Mitokondride oluşan ancak H_2O_2 'ye dönüştürülmeyen O_2^- dış mitokondriyal membranda lokalize voltaj-bağımlı anyon kanalları (VDAC) ile; mitokondride bulunan SOD enzimleri tarafından oluşturulan H_2O_2 ise mitokondriyal membranlardan difüzyon yolu ile sitozole geçmektedir (Glasauer & Chandel, 2014; Muller, Liu & Van Remmen, 2004).

Sitozolda biriken O_2^- ve H_2O_2 'in mitokondri dışındaki diğer kaynakları NOX enzimleri ve XO aktivitesidir. Yedi üyeden oluşan NOX ailesi enzimleri (NOX1-5, dual oksidaz 1 DUOX1 ve dual oksidaz 2 DUOX2) hücrede direkt olarak ROS üretiminden sorumlu olarak tanımlanmış ilk enzim grubudur. Plazma membranı üzerinde konumlanmış bir transmembran protein ailesi olan NOX enzimlerinin tümü benzer domain yapılarına sahip olmakla birlikte bu enzimlerin ana görevleri sitozolik tarafta NADPH'in $NADP^+$ 'ya dönüşümü sırasında oluşan bir elektronun membrandan geçişini sağlayarak ekstrasellüler alanda ROS üretimi gerçekleştirmek ve böylece sinyalizasyon gerekliliğine göre elektron trafiğini düzenlemektedir (Bedard & Krause, 2007; Bienert & Chaumont, 2014). Benzer işlevlere sahip olan NOX enzimlerinin inflamatuvar uyarılma sinyalleri, aktifleşme mekanizmaları, aktiviteleri için gerekli yardımcı proteinler ve mineral gereksinimlerine göre farklılıkları bulunmaktadır (Şekil

9). Aktivasyon gerçekleştiğinde NOX1-3 sıklıkla O_2^- üretimi sağlarken; NOX4, DUOX1 ve DUOX2 direkt olarak H_2O_2 de üretebilmektedir (Moloney & Cotter, 2018). Ayrıca NOX enzimleri tarafından üretilen O_2^- ekstrasellüler alanda SOD3 enzimi tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülmekte ya da direkt olarak plazma membranında bulunan klorid kanalları ile hücre içerisine alınmaktadır. Ekstrasellüler alanda SOD3 aktivitesi sonucu oluşan H_2O_2 ise lipofilik özelliği sayesinde plazma membrabında bulunan aquaporin kanalları ile direkt hücre içine geçerek gerekli sinyalizasyonlara katılmaktadır (Bienert & Chaumont, 2014). Böylece, hücre içerisinde ROS aracılı pek çok sinyalizasyon NOX enzim sistemleri tarafından üretilen ROS türleri ile düzenlenmektedir (Holmström & Finkel, 2014).



Şekil 9. Plazma membranında lokalize NOX enzim ailesi üyeleri (Moloney & Cotter, 2018)

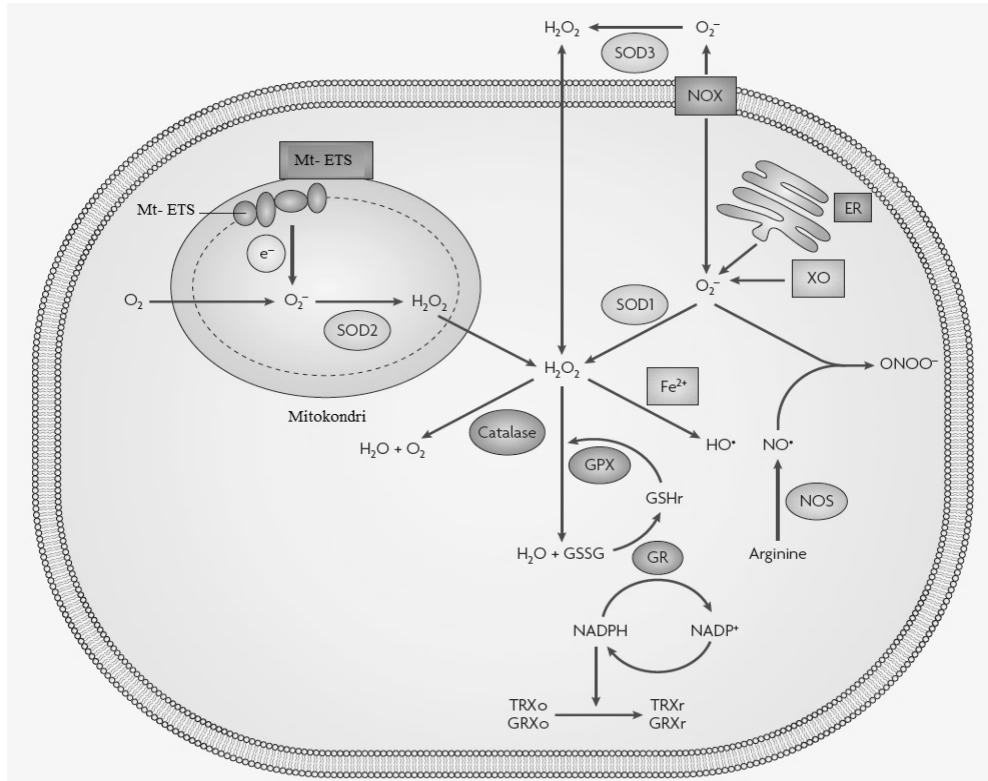
Görevleri sadece ROS üretmek olan NOX enzimlerinin aksine XO, ürik asit oluşumundan sorumlu bir enzimdir. Enzimatik aktivitesinin bir yan ürünü olarak hem O_2^- hem de H_2O_2 oluşturabilmektedir. Özellikle peroksizomal aktivitesi sonucu O_2^- ortaya çıktığı bilinmektedir (Bonini, Miyamoto, Di Mascio & Augusto, 2004).

Hangi kaynak ile oluşursa oluşsun süperoksit anyonu oldukça kararsız bir yapıya sahiptir ve sitozolik alanda biriken O_2^- ya süperoksit dismutaz (SOD1) enzimi tarafından radikal olmayan ROS türü H_2O_2 'ye ya da arjinin metabolizması ürünü olan nitrik oksit (NO) ile birleşerek yine radikal olmayan peroksinitrit ($ONOO^-$)'e dönüştürülmektedir (Şekil 10). Hem H_2O_2 hem de $ONOO^-$ hücrenin yaşamsal

fonksiyonlarının devamlılığı için gerekli ve önemli sinyalizasyonlarda görev aldıkları bilinen ve fonksiyoları iyi aydınlatılmış olan ROS türleridir (Trachootham ve ark., 2009). Buna karşılık hücre içerisinde artan H₂O₂ düzeyi, ROS’u ortadan kaldıran ve “hücrel antioksidan savunma sistemleri” olarak tanımlanan bazı moleküllerin ve enzimlerin aktivasyonu ile dengede tutulmaktadır. Örneğin, H₂O₂ peroksizomda katalaz (CAT) enzim aktivitesi ile suya ve moleküler oksijene indirgenmektedir. Ayrıca glutatyon peroksidaz (GPX) enzim aktivitesi ile oksidize glutatyon (GSSG) oluşumuna aracılık etmekte ve böylece hücrenin antioksidan savunma mekanizmasının önemli bir bölümünü oluşturan total indirgenmiş glutatyon (GSH) havuzunun korunmasına katkı sağlamaktadır (Reczek & Chandel, 2015). GSH, tüm canlılarda hücrel antioksidan savunmanın önemli bir parçasıdır. Kimyasal olarak basitçe γ -glutamil-sisteinil-glisinden oluşan bir tripeptid yapısındadır. Küçük ve membranlardan kolayca difüze olabilmesi nedeni ile nükleus, sitozol ve ER gibi farklı hücrel lokalizasyonlarda bulunabilmektedir. Sağlıklı hücre ve dokularda glutatyon %90 oranında indirgenmiş formda (GSH) bulunmaktadır. GSH, proteinlerin disülfid bağlarının sisteinlere indirgenmesini sağlayarak hücrel düzeyde oksidasyondan korunma sağlamaktadır. Bu nedenle total GSH düzeyinin korunabiliyor olması hücre sağlığının bir belirteci kabul edilmektedir (Narayanankutty, Job & Narayanankutty, 2019). GSH oluşumu NADPH varlığında sitozolde glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivitesi sonucu gerçekleşmektedir. Total GSH, H₂O₂’in suya indirgenmesi sırasında tekrar GPX enzimi ile GSSG’ye indirgenmektedir (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013; Narayanankutty ve ark., 2019; Trachootham ve ark., 2009; Şekil 10).

Ek olarak GSH sentezinden sorumlu GR aktivitesi için gerekli olan NADPH düzeyinin korunması için tioredoksin (TRX), glutaredoksin (GRX) ve peroksiredoksin (PRX) molekülleri de hücrel düzeyde önemli antioksidanlar arasında yer almaktadır (Cox, Winterbourn & Hampton, 2009; Moloney & Cotter, 2018). Ayrıca TRX direkt olarak kendi sistein bakiyelerinin oksidasyonunu gerçekleştirerek de H₂O₂’in suya indirgenmesini sağlayabildiğinden ve pek çok hücrel lokalizasyonda bulunabildiğinden önemli bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Böylece hücre içerisinde hem ROS düzeyinin hem de ROS düzeyine bağlı hücrel antioksidan savunma mekanizmalarının denge içerisinde korunduğu hücrel redoks homeostazisi sağlanmakta ve redoks bağımlı pek çok fonksiyon

kontrol altında gerçekleştirilmektedir. Ancak elimine edilemeyen H_2O_2 sitozolde Fe^{+2} gibi geçiş metallere varlığında Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikaline ($OH\cdot$) dönüşebilmektedir ve $OH\cdot$, en reaktif serbest radikal olup hücresel makromoleküllerin oksidasyonuna neden olarak hücrede kalıcı oksidatif hasarlara neden olabilmektedir (Glasauer & Chandel, 2014; Hancock, Desikan & Neill, 2001; Trachootham ve ark., 2009; Moloney & Cotter, 2018).



Şekil 10. Hücresel redoks homeostazisi ve ana bileşenleri (Trachootham ve ark., 2009)

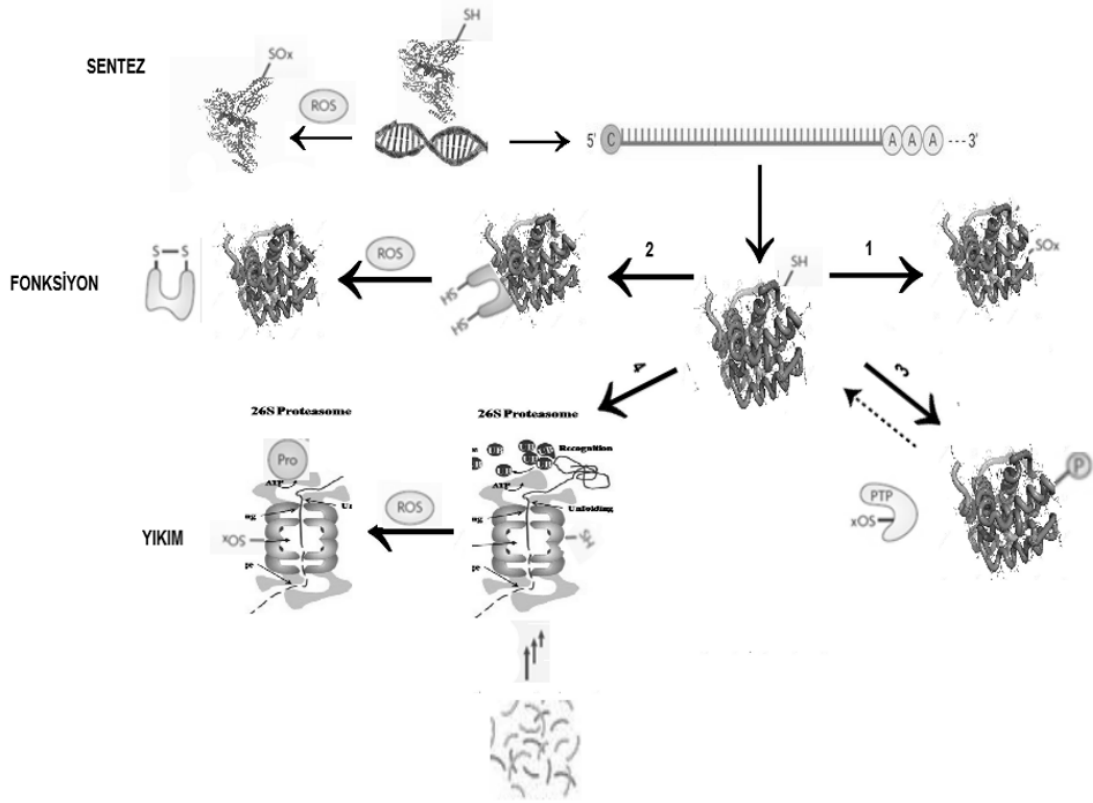
2.5.3. Hücre içi sinyalizasyonun bir parçası olarak ROS

Biyolojik fonksiyonlar için gerekli olan ROS, hücre içerisinde çeşitli proteinler, transkripsiyon faktörleri ve böylece gen yapıları ile reaksiyona girerek birçok sinyal ileti yolunu düzenlemektedir (Trachootham ve ark., 2009). ROS'un ikincil mesajcı olarak görev aldığı hücresel sinyalizasyon mekanizmalarının altında proteinlerin yapısında yer alan oksidasyona açık bakiyelerin ROS tarafından oksidatif olarak düzenlenmesi yatmaktadır (Rhee, 2006). Hücre büyümesi ve farklılaşması, ilaç metabolizasyonu, stres adaptasyonu gibi yaşamsal fonksiyonlar için gerekli sinyalizasyonlar, timidin katabolizması, poliamin katabolizması, ribonükleotid

redüktaz gibi enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, sitokin üretiminin uyarılması ile inflamatuvar yanıtı aracılık, patojenlerin ve yabancı moleküllerin ortadan kaldırılması gibi pek çok hücre fonksiyonları ROS seviyesindeki düzenli dalgalanmalar sayesinde redoks bağımlı gerçekleşmektedir (Bogeski & Niemeyer, 2014; Brieger ve ark., 2012; Hamanaka & Chandel, 2010; Kemble & Sun, 2009; Wink ve ark., 2011; Winterbourn, 2008). Bu nedenle belirli bir ROS düzeyi hücre yaşamı için elzemdir. Hücrede normal fonksiyonlar için gerekli olan ve bulunması gereken bu düzey “sitostatik ROS düzeyi” olarak tanımlanmaktadır (Weinberg, Ramnath & Nagrath, 2019).

Hücrede sitostatik düzeyde ROS, normal fonksiyonu gereği direkt olarak transkripsiyonel ve post-translasyonel seviyede protein miktarını, fonksiyonunu ve stabilitesini düzenleyebilmektedir (Trachootham ve ark., 2009). Örneğin redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri DNA-bağlanma bölgelerinde redoks duyarlı sistein bakiyeleri bulundurmaktadır (Barford, 2004; Marinho, Real, Cyrne, Soares & Antunes, 2014). Sistein bakiyelerinin oksidasyonu (SO_x) transaktivasyonu bozarak hedef genlerin transkripsiyonunu engellemektedir (Şekil 11). TRX, Ras, Akt, PTEN gibi bazı proteinlerde ise ROS ile modifiye edilebilir özellikte redoks duyarlı sistein, tirozin ve metiyonin bakiyeleri yer almaktadır. ROS, bu amino asitlerin oksidasyonunu sağlayarak protein fonksiyonlarını arttırabilmekte ya da azaltabilmektedir (Hoxhaj & Manning, 2020). Hücre içindeki bazı proteinlerin fonksiyonları ise redoks duyarlı olan başka proteinler tarafından düzenlenebilmektedir. Bu tür etkileşimli proteinlerin ROS tarafından modifikasyonu Nrf2-Keap1 protein komplekslerinde olduğu gibi bileşenlerde fonksiyonel bir değişikliğe yol açarak protein kompleksinin ayrışmasına neden olabilmektedir (Kasai, Shimizu, Tatara, Mimura & Itoh, 2020; Shi ve ark., 2014). Bazı proteinlerde ise önemli bir post-translasyonel mekanizma olan fosforilasyonun kontrolü ROS aracılı düzenlenebilmekte ve böylece hedef protein aktive ya da inhibe edilebilmektedir. Örneğin, defosforilasyondan sorumlu olan protein tirozin fosfatazlar ROS aracılı oksidasyon ile etkisiz hale getirilerek hedef proteinlerin yüksek düzeyde fosforile kalması sağlanabilmektedir (Corcoran & Cotter, 2013). Başka bir ROS aracılı mekanizma ise proteinlerin stabilitesini ilgilendirmektedir. Sinyal proteinlerinin stabilitesi, aktivitelerinin hem seviyesini hem de süresini belirlemektedir. Birçok proteinin stabilitesi ubiquitin-proteozom sistemi aracılı parçalanma yoluyla kontrol edilmektedir. Ubiquitin aktive edici enzim E1 ve

proteazom 26S ve 20S, ROS ile oksidasyon yoluyla etkisiz hale getirilebilmekte ve hedef proteinlerin yıkım süreci kontrol edilebilmektedir (Pajares ve ark., 2015; Schieber & Chandel, 2014; Trachootham ve ark., 2009; Şekil 11).



Şekil 11. Redoks bağımlı mekanizmalar ile hücre içi protein miktarının, fonksiyonunun ve stabilitesinin düzenlenmesi (Trachootham ve ark., 2009)

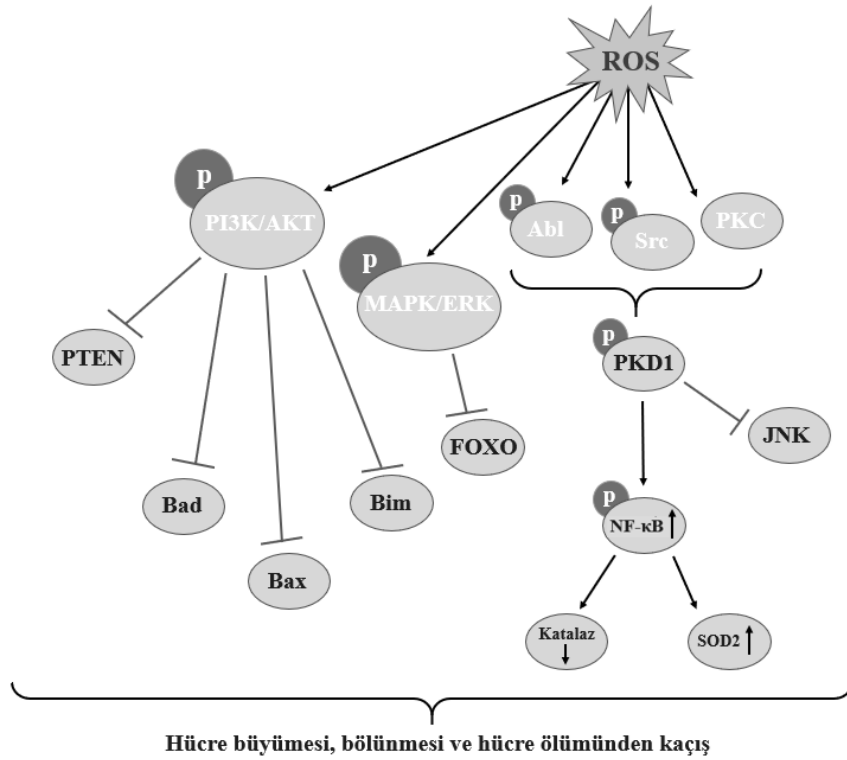
Sağlıklı hücrelerde sitostatik ROS düzeyi ve bu düzeye uygun olarak ayarlanan hücrel antioksidan kapasite sayesinde tüm bu süreçler dengeli şekilde ve sıkı bir kontrol altında gerçekleştirilmektedir. Böylece, yaşamsal öneme sahip hücre büyümesi, bölünmesi veya hücre ölümünü ilgilendiren sinyalizasyonlar, ROS kaynaklı hücrel hasar ve hasar yanıtına bağlı aktifleştirilen tamir mekanizmaları sağlıklı işleyebilmektedir.

2.5.4. Karsinogenez sürecinde ROS'un etkileri

Sitostatik düzeyde ROS hücrel fonksiyonlar için gerekli olmasına rağmen genellikle ekzojen kaynaklar nedeni ile ROS'un hücre içindeki kontrolsüz artışı ve hücrel antioksidan savunma sistemlerinin artan ROS düzeyine karşı yetersiz kalması gibi bazı durumlarda ROS düzeyi hücrede kalıcı oksidatif hasarlara yol açabilecek

seviyeye ulaşmaktadır (Checa & Aran, 2020). Hasar oluşumunda maruz kalınan ROS konsantrasyonu ve maruziyetin sürekliliği belirleyici etkenlerdir. Artan ROS düzeyi hücrel makromoleküllerin oksidasyonuna neden olarak başta lipidler ve proteinler olmak üzere pek çok fonksiyonel ve yapısal makromolekülde hasara yol açmaktadır. ROS kaynaklı oksidatif hasarların hedefindeki bir diğer makromolekül ise DNA'dır (Ghoneum ve ark., 2020). ROS'un kanserleşme sürecindeki etkilerini araştıran pek çok çalışma, artan ROS düzeyinin direkt olarak genomik DNA üzerinde etkileri bulunduğunu ve ROS kaynaklı DNA hasarlarının genomda birikerek kromozomal anomalilere ve genomik instabiliteye yol açtığını ortaya koymuştur (Benkafadar ve ark., 2019; Bertram & Hass, 2008; Kang, So, Simons, Spitz & Ouchi, 2012; Nissanka & Moraes, 2018). Sağlıklı hücrelerin oksidatif hasarlara maruz kalmaları sonucu "oksidatif stres" durumu ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres, hücre içerisinde genellikle ekzojen kaynaklı ROS'un fazlaca artması ve bu artışa karşılık antioksidan savunma sisteminin kapasitesindeki yetersizlik sonucu oluşan dengesizlik koşuludur (Liguori ve ark., 2018). Sağlıklı bir hücre akut oksidatif strese maruz kaldığında hücrel düzeyde stres yanıtı devreye girmektedir. Örneğin, hücrede ROS kaynaklı olası bir DNA hasarı (gen mutasyonları, baz modifikasyonları, hidrolize DNA bazları, anormal DNA-protein çapraz bağlantıları veya DNA zincir kırıkları gibi) hasar ile ilişkili olan DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilemeyecek düzeyde olduğunda genellikle hücrel stresin bir yanıtı olarak apoptoz, otofaji, ferroptoz veya nekroptoz gibi ROS aracılı uyarılabilen programlı hücre ölümü mekanizmaları aktifleştirilerek hasarlı hücrenin ortadan kaldırılması sağlanmaktadır (Galadari, Rahman, Pallichankandy & Thayyullathil, 2017). Böylece hücrenin kanserleşme sürecine girmesini engelleyen koruyucu bir mekanizma işlemektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda ROS'a maruziyet sürekli hale geldiğinde DNA hasar birikim hızı artmakta ve bu süreklilik genomik instabiliteye neden olmaktadır (Tafari ve ark., 2016). Hücrede DNA hasar birikiminin yanısıra genetik ve epigenetik düzeyde gerçekleşen pek çok değişim de ROS ilişkili karsinogenez sürecine dahil olabilmektedir. ROS ile tetiklenen DNA hasarları sonucu onkogen aktivasyonları (*Bcr-Abl*, *c-myc*, *H-Ras*, *siklin D1*) ve genellikle metilasyona bağlı tümör süpressör gen inaktivasyonları (*p53*, *CDKN2A*, *VHL*, *Rb*, *PTEN*, *BRCA1*) gerçekleşebilmekte, DNA tamir mekanizmaları inaktif hale gelebilmekte, kanserleşmede etkili önemli

sinyal yollarının (PI3K/AKT, MAPK/ERK1-2, PKD1, NF-κB) aktivitelerinde anormal artışlar olabilmektedir (Galadari ve ark., 2017; Koundouros & Poulogiannis, 2018; Lim ve ark., 2008; Salmeen ve ark., 2003; Maciag, Sithanandam & Anderson, 2004; Salmeen ve ark., 2003; Son, Kim, Chung & Pae, 2013). İlgili sinyalizasyonlardaki anormal artış sonucu, hücrede programlı hücre ölümünü yönlendiren bazı proteinlerin seviyelerinin yeniden düzenlenmesi yolu ile kanserleşme süreci desteklenmektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Karsinogenez sürecinde ROS-ilişkili proliferatif aktivite ve hücre ölümünden kaçış mekanizmaları: ROS aracılı aktivitesi artan onkogenik PI3K/AKT ve MAPK yolları FOXO transkripsiyon faktörünün baskılanmasına ve böylece antioksidan sistemin bloke edilerek ROS artışının tetiklenmesine neden olur. Ek olarak ilgili onkogenik yolların aktifleşmesi PTEN, Bad, Bax, Bim gibi proapoptotik proteinlerin baskılanmasına neden olarak hücre ölümünü inaktive etmektedir. ROS aracılı protein kinaz C (PKC) ile fosforile olan PKD1 proteini stresle tetiklenen adaptör protein JNK'nın baskılanmasına ve NF-κB aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktif NF-κB ise hem hücrede antioksidan sistemi uyararak hem de Bcl-2 ve kaspaz inhibitörlerinin düzeyinde artışa yol açarak hücre ölümünü baskılamakta ve karsinogenez sürecine katkı sağlamaktadır.

ROS ilişkili karsinogenez sürecinde mitokondriyal DNA hasarlarında artış olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Hart ve ark., 2015; Moloney, Stanicka & Cotter, 2017; Van Houten, Woshner & Santos, 2006). Ayrıca plazma

membranı ve membran yapısına sahip organeller hücre içindeki anormal ROS artışından etkilenebilmekte, başta mitokondri ve ER olmak üzere hücre canlılığı ve sağlığı için önemli görevlere sahip bu organellerin işleyişinde bozukluklar meydana gelebilmektedir (Guo, Sun, Chen & Zhang, 2013; Nordziece & Medraño-Fernandez, 2018; Yoboue, Sitia & Simmen, 2018).

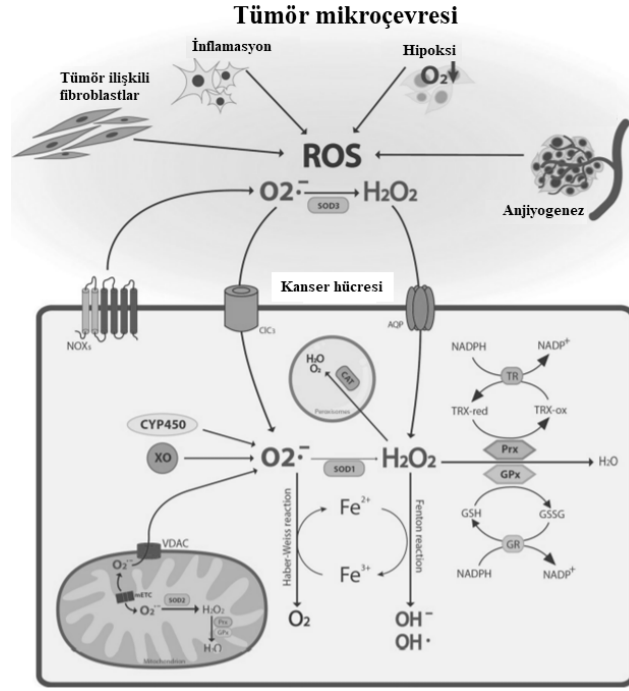
Anjiyogenez, invazyon ve metastaz yeteneği kanserleşme sürecinin en yıkıcı karakteristiklerindedir. Kanser hücrelerinde ROS, prolil hidroksilazı inhibe ederek hipoksi ile uyarılan faktör- α (Hif- α) stabilizasyonunu sağlayabilmekte ve böylece yeni damarların oluşumu için Hif- α hedef proteini olan VEGF'yi aktive edebilmektedir. Bu süreç Hif- α 'nın aktivasyonunun arttığı hipoksik koşullar altında gerçekleşmektedir. Bu nedenle kanser hücresinin içerisine bulunduğu hipoksik çevre ROS birikimine katkı sağlarken aynı zamanda metastatik sürecin başlamasına da ortam oluşturmaktadır (Corrado & Fontana, 2020; Jing ve ark., 2012; Xia, Meng, Liu, Rojasasakul, Wang & Jiang, 2007). Ek olarak ROS'un kanser hücrelerinde EMT mekanizmasında görev alan transkripsiyon faktörü *Snail* üzerinde direkt uyarıcı etkisinin bulunduğunu ve invaziv özellikler için önemli proteinler olan matriks metalloproteinaz (MMP)'lerin aktivitesini artırarak primer kanser hücrelerinde ekstrasellüler matriks bağlantılarının kopmasına yol açtığını bildiren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Liao, Chua & Tan, 2019).

Kanser hücrelerinde genomik instabiliteye bağlı artan onkogen aktivasyonu, metabolik adaptasyon ve hipoksik ortam da endojen ROS artışıyla birlikte kronik oksidatif stres koşullarının devamlılığına ve kanserleşme sürecinin ilerlemesine katkı sağlayan tümörojenik etkenler arasında yer almaktadır (Glasauer & Chandel, 2014). H-Ras^{v12}-transforme NIH3T3 fibroblast hücrelerinde NADPH oksidaz-aracılı ROS oluşumunun ve endojen süperoksit birikiminin arttığını gösteren çalışma bu konudaki ilk bilimsel kanıtları oluşturmuştur (Irani ve ark., 1997). Sonraki yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda ise *c-myc*, *Bcr-Abl* onkogenlerinin de transforme hücrelerde ROS artışına ve oksidatif DNA hasarına yol açarak benzer etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Trachootham ve ark., 2009). Sonuç olarak günümüze kadar pek çok literatür verisi ile destekli olan ROS ve karsinogenez ilişkisi, oksidatif stresin kronikleşerek kanserleşme sürecini başlatma ve ilerletme potansiyeline sahip önemli bir etken olduğunu doğrulamaktadır (Wang ve ark., 2021).

2.5.5. Kanser hücrelerinde değişen redoks homeostazisi

Hücre içerisinde ROS oluşumu ve ROS'un antioksidan savunma mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılması olarak tanımlanan redoks dengesi döngüsel olarak sıkı bir kontrol altındadır. Hücre proliferasyonu, farklılaşması, stres koşullarına adaptasyon gibi süreçlerde hücrel sinyalizasyonun sağlıklı şekilde yürütülmesi için redoks dengesinin korunması büyük önem taşımaktadır. Normal hücrelerde homeostazinin devamlılığını sağlayan ROS düzeyi sitostatik düzeydedir. Ancak karsinogenez sürecine girmiş bir hücrede endojen ROS birikimi nedeni ile sitostatik ROS düzeyi "tümörojenik ROS düzeyi"ne ulaşmaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak tümörojenik ROS düzeyi nedeniyle ortaya çıkan kronik oksidatif stres koşullarında hayatta kalabilmekte ve yaşamlarını yeni ROS düzeyine uygun olarak sürdürebilmektedir (Ghoneum ve ark., 2020; Hayes, Dinkova-Kostova & Tew, 2020). Bu süreçte hücre içi artan ROS düzeyine karşı ROS'u ortadan kaldıran hücrel antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesinin artışı sayesinde redoks homeostazisi yeniden düzenlenmektedir. Kanser hücrelerinin yeni ROS düzeyine ve kronik oksidatif strese karşı geliştirdikleri bu adaptasyon "redoks adaptasyonu" olarak tanımlanmaktadır. Redoks adaptasyonu geliştirmiş bir kanser hücresi hücre içi artmış ROS düzeyi, endojen kronik oksidatif stres, artmış antioksidan kapasite ve redoks adaptasyonu sayesinde oksidatif stres direnci ile karakterizedir (Raza ve ark., 2017; Wang, Ming, Zuo, Tian & Huang, 2021).

Kanser hücrelerinde artmış olan ROS düzeyi, kanser progresyonunu ilgilendiren değişimler için de ilerletici rol oynamaktadır. Kanser hücrelerindeki ROS artışı ve bu artışa bağlı olarak gelişen redoks adaptasyonu, tümör mikroçevresinde inflamatuvar uyarıcı ortamın oluşmasına, hipoksik koşulların sağlanmasına, tümör mikroçevresinde anjiyogenezin uyarılmasına ve böylece kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik yetenek kazanmalarına katkı sağlamaktadır (Aboeella, Brandle, Kim, Ding & Zhou, 2021; Aggarwal ve ark., 2019). Progresif olarak gelişen ve direkt olarak kanser hücrelerinin agresivitesi ile ilgili olan bu değişimler tümör mikroçevresinde anormal ROS birikimine neden olarak kanser hücrelerinin iç ROS seviyesinin tümörojenik seviyede kalmasına da destek oluşturmaktadır (Weinberg ve ark., 2019). Böylece, redoks adaptasyonu geliştirmiş olan kanser hücrelerinde hem iç hem de dış faktörler birbirini destekleyici şekilde kanser progresyonunu arttırmaktadır (Şekil 13).

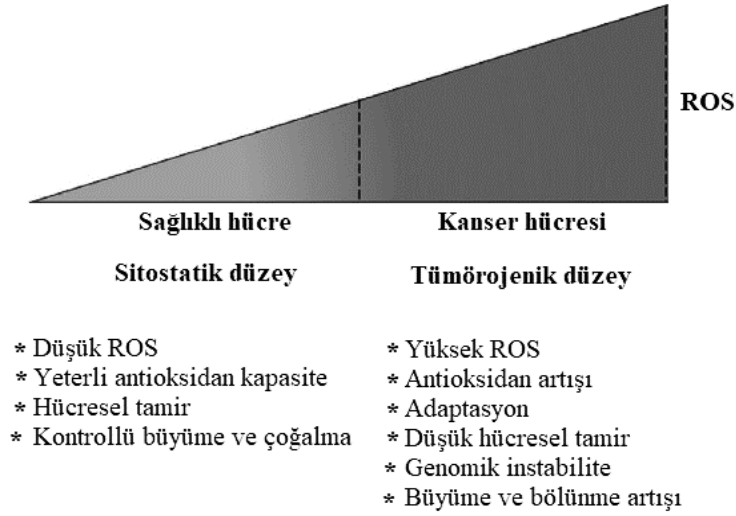


Şekil 13. Kanser hücrelerinde oksidatif stres artışının kanser progresyonuna katkı sağlayan hücre dışı faktörler ile ilişkisi (Weinberg ve ark., 2019).

2.5.5.1. Kanser hücrelerinde redoks adaptasyon mekanizmaları ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri

Kanser hücrelerinin yaşamlarına devam edebilmesi için redoks homeostazisini tümörojenik ROS düzeyine uygun olarak regüle etmesi süreci kanserde redoks adaptasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu adaptasyon sayesinde kanser hücrelerinde hem tümörojenik ROS düzeyinin aracılık ettiği proliferatif süreçler devam ettirilmekte hem de ROS'un aşırı artışı önlenerek hücre ölümüne neden olabilecek toksik ROS düzeyine ulaşılmasının önüne geçilmektedir. Redoks adaptasyonu artan oksidatif strese yanıt olarak kanser hücrelerinde hücrel antioksidan savunma kapasitesinin artırılması ile gerçekleşmektedir. Hücrenin tümörojenik ROS düzeyine uygun olarak geliştirdiği bu onkogenik regülasyonda "redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri" aktif rol oynamaktadır (Espinosa-Die ve ark., 2015; Bellezza, Mierla & Minelli, 2010; Trachootham, Zhang & Huang, 2009). Kanser hücrelerinde oksidatif stres artışına yanıt olarak redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesi sonucu hedef antioksidan moleküllerin ve çeşitli yaşamsal proteinlerin seviyelerinde artış olmakta ve böylece kanser hücreleri artan ROS seviyelerine rağmen bu adaptif faktörleri

kullanarak hücre ölüm yollarını baskılayabilmekte ve hayatta kalabilmektedir (Ghoneum ve ark., 2020; Hayes ve ark., 2020; Sies & Jones, 2020; Şekil 14).

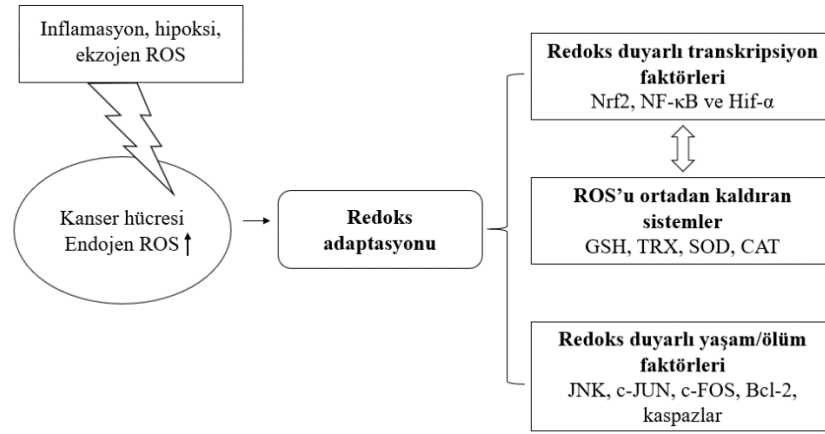


Şekil 14. Sağlıklı hücreler ve kanser hücreleri arasındaki ROS düzeyi farklılıkları ve ilişkili değişiklikler

Hücre içerisinde redoks ile aktifleşen transkripsiyon faktörleri arasında başlıca nükleer faktör-eritroid 2 p45 ilişkili faktör 2 (Nrf2), nükleer faktör- κ B (NF- κ B), hipoksi ile uyarılan faktör- α (Hif- α), aktivatör protein-1 (AP-1, c-JUN ve c-FOS), p53, ısı şok faktör-1 (HSF-1) yer almaktadır. Bu faktörlerden Nrf2, NF- κ B ve Hif- α ROS birikimine ve oksidatif strese karşı hücresel yanıtta rol oynayan adaptasyon süreçlerinden sorumlu iken, AP-1 ve p53 oksidatif strese yanıt olarak hücre döngüsü ve hücre ölümünün kontrolünü sağlamaktadır (Trachootham ve ark., 2009). Sağlıklı hücrelerde bazal seviyede eksprese edilen bu transkripsiyon faktörleri oksijen yetersizliği, DNA hasarı veya oksidatif stres artışı gibi hücresel stres koşullarında ya da inflamatuvar yanıt gerektiren bazı durumlarda artış göstermekte ve stres koşullarını oluşturan dış faktörlere karşı hücresel yanıtın oluşmasını sağlamaktadır. Bu yanıt sonucunda hücreler ya Nrf2, NF- κ B ve Hif- α 'nın aktifleşmesi sonucu dış stresi tolere edebilecek yanıtları oluşturarak yaşamlarına devam etmekte ya da hücrede AP-1 veya p53 proteinlerinin aktifleşmesi ile proliferasyon, farklılaşma veya programlı hücre ölümü düzenlenmektedir (Ghoneum ve ark., 2020; Hayes ve ark., 2020). Hücrede oksidatif stres bazal seviyede ve iç antioksidan savunma yeterli düzeyde iken redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri düşük seviyede aktivite göstermektedir. Ilımlı oksidatif stres artışında öncelikle tek başına Nrf2 aktifleştirilerek antioksidan

sisteminin kapasitesinin artmasını sağlayan ilk hücrel yanıt oluşturulmaktadır (Hayes ve ark., 2020). Bu koşullarda diğer transkripsiyon faktörleri hala düşük seviyede aktivite göstermektedir. Oksidatif stresin şiddetine bağlı olarak savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı daha yüksek stres koşullarında ise Nrf2 aktivitesine ek olarak diğer redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin de aktifleştiği ve dahil olduğu tam redoks yanıt süreci devreye girmektedir (Espinosa-Die ve ark., 2015; Hayes ve ark., 2020). Kanser hücrelerinde ise tümörojenik ROS düzeyine uygun olarak bu transkripsiyon faktörleri kontrol dışı aktivite ya da inaktivite göstermektedir. Pek çok kanser türünde p53'ün inaktive olduğu, oksidatif stres koşullarında p53 aracılı hasar yanıtının oluşmadığı bilinmektedir (Sablina ve ark., 2005). c-FOS ve c-JUN olmak üzere heterodimer formda iki alt birimden oluşan AP-1 proteininin ise kanser hücrelerinde evreye bağlı olarak onkogenik ya da tümör süpressör etkilere sahip olabildiği bildirilmiştir. AP-1, hücrenin ve uyarının tipine ve stresin süresine bağlı olarak pro-apoptotik ya da anti-apoptotik sinyalizasyonları aktifleştirebilmektedir. Ancak kanserin geç evrelerinde genellikle büyüme faktör reseptörlerinden gelen sürekli sinyallerin ERK ve MAPK aracılı AP-1'e aktarılması sonucu, AP-1 hedefinde bulunan ve hücre döngüsünün ana düzenleyicileri olan siklinlerin (D1, A, E) düzeyi artmakta ve proliferatif süreçlerin devamlılığı sağlanmaktadır (Eferl & Wagner, 2003).

Kanser hücrelerinde onkogenik redoks adaptasyon süreci ise başlıca Nrf2, NF- κ B ve Hif- α transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesi sonucu transkripsiyon faktörlerinin hedefindeki protein ekspresyonlarının sağlanması ile gerçekleşmektedir. İlgili transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilen hedef proteinler arasında başlıca hücrel antioksidan savunmadan sorumlu proteinler, antioksidan savunma sistemi enzimleri, GSH metabolizmasını düzenleyen proteinler, ROS-aracılı inflamasyona yanıtta sorumlu olan proteinler ve hipoksik koşullarda ROS artışına bağlı olarak düzenlenen süreçlerde görev alan proteinler yer almaktadır. Böylece, kanser hücreleri endojen ROS artışına bağlı olan kronik oksidatif stres koşullarında bile ilgili transkripsiyon faktörlerinin kontrolü altında gelişen redoks adaptasyonu sayesinde yaşamlarını sürdürebilmektedir (Barrera, Cucci, Grattarola, Dianzani, Muzio & Pizzimenti, 2021; Ghoneum ve ark., 2020; Hegedüs ve ark., 2018; Trachootham ve ark., 2009; Şekil 15).



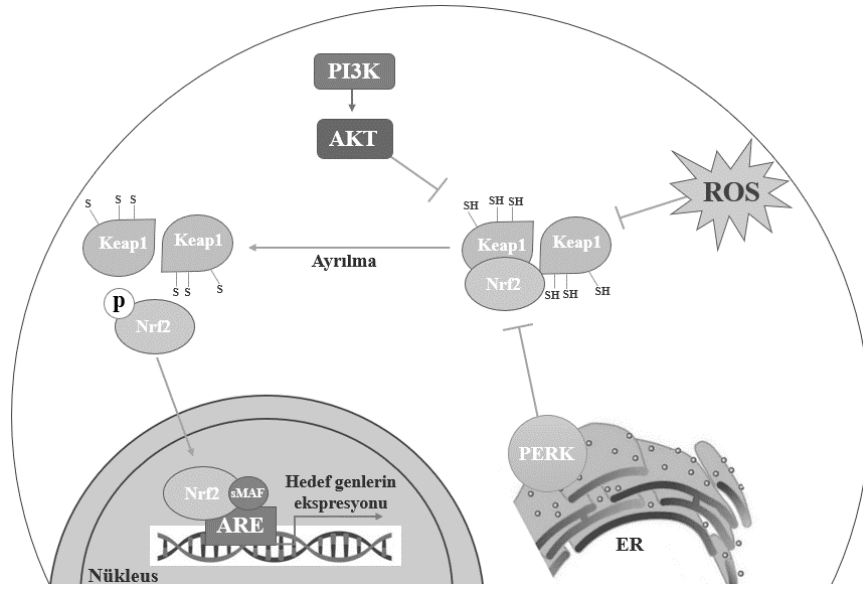
Şekil 15. Kanser hücrelerinde kronik oksidatif stres koşullarına karşı gelişen redoks adaptasyonu ve mekanizmaları

2.5.5.1.1. Nrf2

Nrf2, oksidatif strese karşı hücre koruyucu reaksiyonların başlatılması için redoks duyarlı olarak aktifleşen ilk ve en önemli transkripsiyonel aktivatördür (Hayes ve ark., 2020). Lösin fermuar yapısal motifine sahip olan, küçük muskuloaponevrotik fibrosarkom (sMAF) proteinleri ile heterodimerik formda DNA'ya bağlanma özelliği göstererek promotör bölgelerinde antioksidan cevap elementi (ARE) içeren genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir. Normal koşullar altında Nrf2, Cullin-3-(CUL3)-ring-box 1-(RBX1) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir substratı olan Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1 (Keap1) ile etkileşerek sitoplazmada ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyon yolu ile inaktif halde tutulmaktadır. Oksidatif stres koşullarında Keap1'in inhibe edici etkisi ortadan kalkmakta, böylelikle Nrf2 serbest kalmakta ve aktifleşerek sitoplazmadan nükleusa geçiş yapmaktadır. Nükleus içerisinde küçük sMAF proteinleri ile heterodimer yapıda birleşerek ARE içeren genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır (Leinonen, Kansanen, Pölönen, Heinäniemi & Levonen, 2014; Li & Kong, 2009; Milkovic, Zarkovic & Saso, 2017). Sitoplazmada Nrf2 aktivasyonuna yol açan en aktif mekanizmalar arasında Keap1'in sistein bakiyelerinin oksidasyonu ile konformasyonel değişime uğraması sonucu inaktifleşmesi ve PKC-aracılı olarak Nrf2'nin Serin40 bakiyesinden fosforillenmesi yer almaktadır (Apopa, He & Ma, 2008). Fosforile Nrf2 (p-Nrf2) direkt olarak nükleusa geçiş yaparak hedef gen ekspresyonunun aktifleşmesini sağlamaktadır (Şekil 16).

Nrf2 hedef genleri arasında NAD(P)H-kinon oksidoredüktaz (NQO1), SOD, GPX, CAT, TRX, hem oksijenaz-1 enzim (HO-1) yer almaktadır. Bu enzimlerin tümü ROS'u ortadan kaldıran mekanizmalarda ana rollere sahiptir (Trachootham ve ark., 2009). Ayrıca Nrf2'nin glutamilsistein sentaz geninin ekspresyonunu uyararak GSH sentezini uyarıcı etkisinin bulunduğu, böylece hücresel düzeyde antioksidan savunma sistemini arttırdığı bilinmektedir (Kim, Zhang, Kang, You & Hyun, 2011). Bu fonksiyonlarına ek olarak Nrf2, prooksidatif elektrofilik bileşenlerin detoksifikasyonu için gerekli glutatyon-S-transferaz (GST), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1 (MRP1) ve ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcıları (ABC) enzimlerinin seviyesi gen düzeyinde regüle ederek ksenobiyotiklerin ve ilaçların detoksifikasyonunda önemli rol oynamakta ve bu etkileri ile kanser hücrelerinin kemoterapötiklere yanıtını da değiştirebilmektedir (Goto, Kawabata & Li, 2020; Menegon, Columbano & Giordano, 2016; Vollrath, Wielandt, Iruretagoyena & Chianale, 2006). Nrf2 yokluğunda hücrelerin ölüm reseptörü bağımlı apoptotik yoldan ölüme gittiği bildirilmiş ve Nrf2'nin hücrede Fas-aracılı apoptoz inhibitörü olarak rol oynadığı rapor edilmiştir (Gào & Schöttker, 2017; Kotlo ve ark., 2003; Rojo de la Vega, Chapman & Zhang, 2018).

Protein katlanma bozukluklarının eşlik ettiği ER stresi, translasyon düzeyini azaltarak protein sentezini bir süre durdurması için hücreye zaman tanıyan mekanizmaların aktif rol oynaması ile (unfolded protein response, UPR) yanıtlanmaktadır. Bu süreçte, ER transmembran protein kinaz (PERK) direkt olarak translasyon başlatıcı faktör 2 (eIF2a)'yı fosforilleyerek hücreye protein katlanma bozukluklarını gidermesi için zaman tanınmasını sağlamaktadır. ER stres koşullarında Nrf2, direkt bir PERK hedefi olarak fosforillenmekte ve aktifleşmektedir (Cullinan, Zhang, Hannink, Arvisais, Kaufman & Diehl, 2003; Trachootham ve ark., 2009; Wek & Cavener, 2007). Nrf2 tarafından 26S proteozom ve ısı şok proteinlerinin uyarılması, hasarlı proteinlerin onarılmasını veya ortadan kaldırılmasını kolaylaştırarak hücreleri apoptozdan korumaktadır (Kwak, Wakabayashi, Itoh, Motohashi, Yamamoto & Kensler, 2003). Özetle, Nrf2 aktivasyonu stres koşulları altında hücreyi yaşamsal süreçler için zorlayıcı çoklu mekanizmaları devreye sokmaktadır (Basak, Sadhukhan, Sarkar & Sil, 2017).



Şekil 16. Nrf2/Keap1 kompleksinin inhibisyonu ve Nrf2'nin transkripsiyonel aktivasyon mekanizmaları

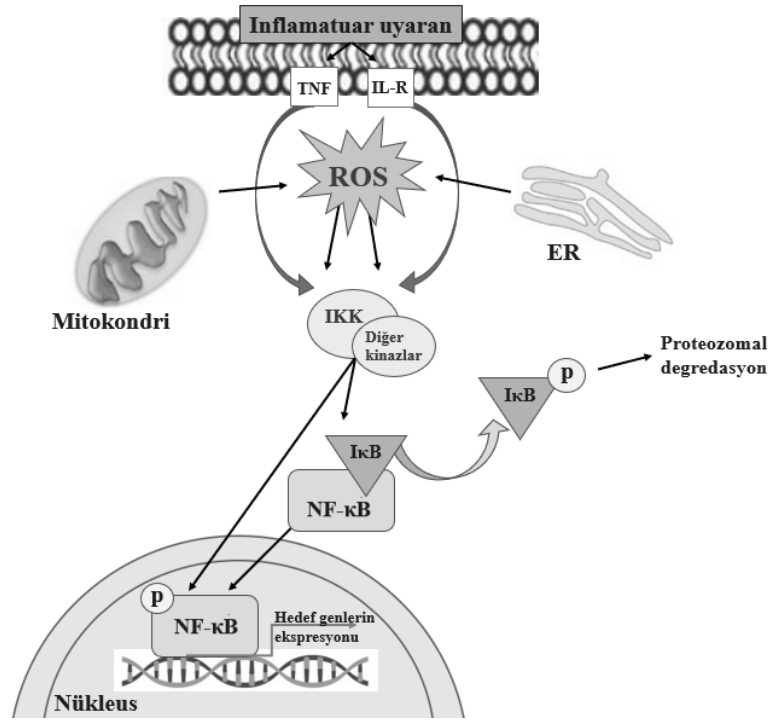
Kanser hücreleri kronik oksidatif stres koşullarında bile kontrolsüz büyüme ve çoğalma kapasiteleriyle normal hücrelerden farklı fenotipe sahiptir. Pek çok ileri evre kanser türünde bu sürece eşlik eden Nrf2 aşırı aktivitesi gözlenmektedir (Wu, Lu & Bai, 2019). Kanser hücrelerinde kontrolsüz nükleer Nrf2 aktivasyonu PKC-aracılı olarak sağlanabilmekle birlikte, büyüme faktörü reseptörlerinden gelen sürekli çoğalma sinyallerinin MAPK ve PI3K/AKT tarafından Nrf2'ye fosforilasyon yolu ile aktarılması ya da somatik Nrf2 veya Keap1 onkogenik mutasyonları sonucu da sağlanabilmektedir (Espinosa-Diez ve ark., 2015; Kansanen, Kuosmanen, Leinonen & Levonen, 2013). Nrf2'nin direkt olarak indirgenmiş GSH sentezini arttıran ve NADPH oluşumunu sağlayan enzimleri aktive edici rolleri bulunması nedeniyle kanser hücrelerini stres koşullarında koruyan ve yaşamaya teşvik eden onkogenik etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Wu ve ark., 2019). Literatürde redoks adaptasyon sürecinde kanser hücrelerinin pürin, pirimidin ve amino asit sentezleme hızını arttıran metabolik değişimlerin de Nrf2 aracılı gerçekleştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (DeBlasi & DeNicola, 2020; Mitsuishi, Motohashi & Yamamoto, 2012). Bu nedenle kanser hücrelerinde Nrf2'nin farmakolojik olarak hedeflenerek inhibe edilmesinin, hücrel koruyucu adaptasyonlara sahip kanser türlerinde hücreyi ölüme yönlendirecek makul ve etkili bir strateji olduğu düşünülmektedir (Gào & Schöttker,

2017; Panieri ve ark., 2020; Sivinski, Zhang & Chapman, 2021; Telkoparan-Akillilar, Panieri, Cevik, Suzen & Saso, 2021; Zhu ve ark., 2016).

2.5.5.1.2. NF- κ B

NF- κ B bağımsızlık, inflamasyon, hücre büyümesi, çoğalması ve hücrenin hayatta kalmasını sağlayan mekanizmaların düzenlenmesinde rol oynayan redoks duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür (Trachootham ve ark., 2009). Memelilerde NF- κ B ailesi, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel alt ünitelerinin heterodimer ya da homodimer formlarda birleşmesinden oluşmakta olup daha sıklıkla bulunan NF- κ B formu heterodimer yapıda p50/p65 ünitelerinden meydana gelmektedir. Tüm üyeler DNA'ya bağlanmaya, aile üyeleri arasında dimerizasyona ve NF- κ B dimerlerinin inhibitör kappa B (I κ B) ile ilişkisine aracılık eden Rel homoloji alanının varlığı ile karakterizedir (Hayden & Ghosh, 2004). Bazal stres koşullarında NF- κ B, I κ B inhibitör proteinine bağlı olarak inaktif formda bulunmaktadır. İnflamatuar yanıt sırasında NF- κ B'nin klasik aktivasyonu, I κ B kinazları (IKK'ler) aktive eden tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin (IL) reseptörlerinin uyarılmasıyla başlatılmaktadır. I κ B inhibitör proteininin, 32. ve 36. serin bakiyelerinden IKK'ler tarafından fosforillenmesi sonucu proteozomal yıkıma yönlendirilmesi ile NF- κ B üzerindeki inhibisyon ortadan kalmakta ve NF- κ B aktifleşerek nükleusa geçiş yapmaktadır (Espinosa-Diez ve ark., 2015; Liu, Zhang, Joo & Sun, 2017). Bu mekanizmaya ek olarak NF- κ B aktivasyonunu sağlayan I κ B'dan bağımsız başka mekanizmalar da bulunmaktadır. Endojen ROS seviyesindeki artış, direkt olarak I κ B'nin tirozin bakiyelerinin fosforilasyonunu uyarabilmekte ve NF- κ B'nin da diğer protein kinazlar (PKC, PKA, TANK bağlayıcı kinaz 1, kazein kinaz II gibi) tarafından fosforillenme yolu aktifleşmesini sağlayarak nükleusa geçişine izin verebilmektedir (Oliveira-Marques, Marinho, Cyrne & Antunes, 2009). NF- κ B fosforilasyonu, proteinin nükleusta transaktivasyon potansiyelini arttıran ve NF- κ B p65 alt biriminde optimal aktivite sağlayan önemli bir post-translasyonel mekanizmadır (Christian, Smith & Carmody, 2016). Ek olarak ROS artışı, MAPK aktivasyonu yolu ile de NF- κ B fosforilasyonunu ve aktivasyonunu uyarabilmektedir (Nakano, Nakajima, Sakon-Komazawa, Piao, Xue & Okumura, 2006). Aktif NF- κ B, inflammatuar yanıtta aracılık eden sitokinlerin, kemokinlerin ve reseptörlerin ekspresyonunu indüklemekte; doku hasarını onararak istilacı patojenleri yok etmek

için adaptif bir yanıt düzenlemektedir (Liu ve ark., 2017). Bu fonksiyonlarına ek olarak ROS-aracılı antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenleyici etkileri bulunduğundan hücrel redoks adaptasyonuna katkı sağlamaktadır (Lingappan, 2018; Trachootham ve ark., 2009; Şekil 17).



Şekil 17. ROS-aracılı NF-κB aktivasyonu

NF-κB aktivitesi, birçok kanser türünde artış göstermektedir (Yu, Lin, Zhang, Zhang & Hu, 2020). Oksidatif strese yanıt olarak gerçekleşen NF-κB aktivasyonu, siklinlerin, anti-apoptotik proteinlerin, hücre adhezyon proteinlerinin ve MMP'ler dahil olmak üzere anjiyogenezde yer alan çeşitli proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek kanser hücrelerinde proliferasyonu ve invazyonu desteklemektedir (Karin & Lin, 2002). Aktif NF-κB'nın hedefleri arasında *NOX2*, *XOR*, *NOS2*, *COX2*, *ALOX5* gibi ROS düzenleyici proteinleri kodlayan genler, *Mn-SOD*, *SOD1*, *CAT*, *GPX* ve ferritin ağır zinciri (*FHC*) gibi antioksidan protein genleri, Bcl-X_L ve Bcl-2 ilişkili protein A1 (Bfl-1) dahil olmak üzere Bcl-2 ailesi üyeleri gibi apoptoz inhibitörleri, kaspaz-8'in inaktif homoloğu, IAP'ler gibi kaspaz inhibitörleri, TNF reseptörü ile ilişkili faktör 1 (TRAF1) ve Gadd45 (JNK aracılı hücre ölümü inhibitörü) yer

almaktadır (Espinosa-Diez ve ark., 2015; Hayes ve ark., 2020; Lingappan, 2018; Morgan & Liu, 2011; Perkins, 2012; Trachootham ve ark., 2009).

Tümör mikroçevresindeki yüksek ROS seviyesi, NF- κ B aracılı hücrel sağkalıma teşvik yollarının regülasyonunu yönlendiren bir diğer önemli stres etkenini oluşturmaktadır. Son çalışmalar fagositik hücreler tarafından salınan TNF- α ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunun, ROS üreten enzim NADPH oksidazın ekspresyonunu ve aktivitesini modüle ederek hücrel ROS düzeyini doğrudan kontrol edebileceğini ileri sürmektedir (Forrester, Kikuchi, Hernandes, Xu & Griendling, 2018; Tang, Tao, Fang, Deng, Xu & Zhou, 2017; Weinberg ve ark., 2019). TNF- α dahil olmak üzere birçok sitokinin tümör mikroçevresinde salınımı bulunduğundan, bu sitokinlerin NF- κ B aktivasyonu yoluyla kanser hücrelerinin hücrel redoks durumunu etkileyebileceği düşünülmektedir (Şekil 17). Bu nedenle kanser hücrelerinde hücrel adaptasyonu modüle eden NF- κ B'nin hedeflenmesi kabul gören farmakolojik bir stratejidir (Chaiswing, St Clair & St Clair, 2018; Yu ve ark., 2020).

2.5.5.1.3. Hif- α

Hif- α , hipoksi ile indüklenebilir faktör (Hif) ailesine (Hif-1, Hif-2 ve Hif-3) ait olan heterodimerik transkripsiyon faktörü Hif-1'in bir bileşenidir. Hif-1 proteini, bir alfa ve bir beta alt biriminden oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir ve hipoksik koşullarda hücrel fonksiyonun adaptif düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Lee, Bae, Jeong, Kim & Kim, 2004). Hif-1, kanser hücrelerinde von Hippel Lindau (*VHL*) veya *PTEN* gibi tümör süpressör proteinlerin fonksiyon kaybı ve/veya bazı onkogenlerin (büyüme faktörü/reseptörü) fonksiyon kazanımı sonucu aktive edilmektedir (Kaelin, 2017; Masoud & Li, 2015).

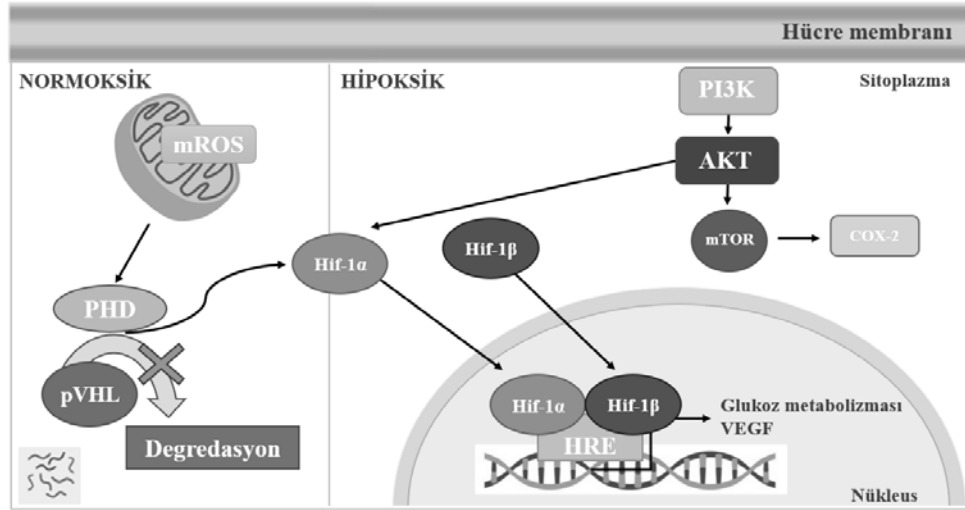
Hif- α proteini, O₂'ye bağlı bozunma alanında iki prolin bakiyesi ve C-terminal transkripsiyon aktivasyon alanında bir aspartil bakiyesi olmak üzere yapısal olarak üç hidroksilasyon bölgesi içermektedir (Lee ve ark., 2004). Normoksik koşullarda, alt ünite Hif- α 'nın iki prolin bakiyesi (Pro-402 ve/veya Pro-564), prolil hidroksilaz domain 2 (PHD2) enzimi tarafından hidroksillenmekte ve bu reaksiyon Hif- α 'nın ubiquitinasyon ve VHL aracılı proteozomal degradasyon yolu ile yıkım sürecini desteklemektedir. Ancak mitokondriyal O₂ (substrat) yoksunluğu ve/veya endojen ROS birikimi sonucu gelişen hipoksik koşullar altında, hidroksilazların katalitik alanında bulunan demir iyonları oksitlenerek asparaginil ve prolil hidroksilasyon

reaksiyonları inhibe edilmektedir. Bu koşul, PHD enzimi için sınırlı substrat mevcudiyetine yol açmaktadır ve Hif-1'i hidroksillenmemiş ve dolayısıyla VHL gibi E3 ligazlar tarafından parçalanamayan stabilize bir formda bırakmaktadır. Sonuç olarak, stabilize Hif- α nükleusa geçiş yaparak Hif- β alt birimi ile hetero-dimerize olmakta ve hedef genlerin promotör bölgelerinde bulunan hipoksiye duyarlı elementlere (HRE) bağlanarak gen ekspresyonunu uyarmaktadır (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007; Ghoneum ve ark., 2020; Şekil 18).

Hızlı çoğalan kanser hücreleri, kronik hipoksi ve O₂ açlığı nedeni ile karsinogenez, hücre transformasyonu dahil olmak üzere kanser biyolojisinin her alanında rol alan çok sayıda proteini kodlayan genin transkripsiyonunu düzenleyen Hif-1 aktivasyonunu kontrolsüz indüklemektedir. Kanser hücrelerinin majör biyoenerji sensörü olan aktif Hif-1, hücre proliferasyonu, glukoz ve enerji metabolizması, anjiyogenez, otokrin büyüme faktörü sinyalizasyonu, invazyon, metastaz, immün sistemden kaçış, kemoterapi ve radyoterapi direnci gibi metabolik adaptasyon aracılığıyla ilerleyen pek çok sürecin gelişmesinde rol oynamaktadır (Hayes ve ark., 2020; Lee ve ark., 2016; Samanta & Semenza, 2017). Hif-1 transkripsiyon faktörünün en iyi bilinen hedefleri arasında metabolik adaptasyondan sorumlu glukoz taşıyıcıları-1 ve -3 (GLUT-1, GLUT-3) ile anjiyogenez ve invazyon ilişkili proteinler VEGF ve MMP'ler bulunmaktadır (Semenza, 2013). Hif-1 kanser hücrelerinde glukoz taşıyıcılarının, glukoz alımının ve heksokinazların yeniden düzenlenmesi ile birlikte aerobik glikolizi de artırmaktadır. Ayrıca, hipoksik ve metabolik olarak aktif tümör odakları tarafından artan glukoz alımı, tümörlerin FDG-PET ile işaretlenerek görüntülenebilmesinin temelini oluşturmaktadır (Ghoneum ve ark., 2020; Semenza, 2009; Semenza, 2013).

Hipoksik koşullarda kanser hücreleri, mitokondriyal kompleks III düzensizliği nedeniyle artan hücre içi ROS ile kalıcı oksidatif stres sergilemektedir. Böylece, mitokondriyal ROS artışı veya NOX aracılığıyla üretilen hücre içindeki fazla ROS düzeyi hem hipoksik hem de normoksik koşullarda Hif-1 stabilizasyonunun sağlanması için baskın rol oynayan bir diğer mekanizmadır. Hipoksik koşullarda NOX aracılığıyla üretilen ROS, Ca⁺² ve mTOR sinyalleşmesine bağlı olan Hif-1'in redoksa bağlı stabilizasyonunu indüklemektedir. Böylece, döngüsel olarak Hif-1 ve ROS ifadesinin ve aktivitesinin düzenlenmesi bir redoks adaptasyon tepkisi başlatmakta; kanser

hücrelerinde hayatta kalma mekanizmalarını zorlayarak ve Hif-1 hedefindeki antioksidan genlerin ekspresyonunu uyararak hücrelerinin oksidatif strese toleransını arttırmaktadır (Guzy, Mack & Schumacker, 2007; Hayes ve ark., 2020; Yuan, Nanduri, Khan, Semenza & Prabhakar, 2008; Stegen ve ark., 2016).



Şekil 18. Hif-1 α 'nın normoksik ve hipoksik koşullarda aktivasyonu

2.5.6. Kanser hücrelerinde değişen redoks homeostazisinin kanser progresyonu ile ilişkisi

Kanser hücrelerinde endojen ROS artışına bağlı olarak redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesi ile ilerletilen redoks adaptasyon süreci sadece kanser hücrelerinin hayatta kalmalarına değil aynı zamanda kanser progresyonunun hızlanmasına katkıda bulunan mekanizmaların da aktifleşmesine neden olmaktadır. Redoks adaptasyonunun primer ilercileri olan Nrf2, NF- κ B ve Hif- α transkripsiyon faktörleri özelinde detaylandırılan sinyalizasyonlardaki hedef proteinler, hücrel antioksidan savunma mekanizmalarının ve proliferatif aktivitenin artmasını sağlamakla birlikte; kanser hücrelerinde biyosentez hızının artması, apoptoz inhibitörlerinin uyarılması ile programlı hücre ölümünden kaçış, metabolik adaptasyonun düzenlenmesi, hipoksik koşulların oluşması ve devamlılığının sağlanması, invaziv ve metastatik yeteneklerin kazanımı, tümör mikroçevresinin düzenlenmesi yolu ile immün sistemden kaçış sağlanması, ilaç metabolizmasının yeniden düzenlenmesi ile kanser hücrelerinde ilaç yanıtının değiştirilmesi ve ilaç direnci gibi kanserin kötü progresyonunu ilgilendiren pek çok değişim için de ilerletici

roller üstlenmektedir (Galadari ve ark., 2017; Ghoneum ve ark., 2020; Glasauer & Chandel, 2014; Hayes ve ark., 2020; Moloney & Cotter, 2018). Bu nedenle kanser hücrelerinde redoks adaptasyonunun terapötik açıdan hedeflenebilirliği stratejik bir öneme sahiptir.

2.5.7. ROS'un tümör süpressör etkileri ve kanser hücrelerinde terapötik hedef olarak redoks adaptasyonu

ROS, normal hücrelerde sitostatik ve kanser hücrelerinde tümörojenik düzeyde iken doğrudan hücrelerin hayatta kalma mekanizmalarını ilerleten sinyalizasyonların önemli bir parçası olarak işlev görmektedir. Buna rağmen tolere edilemeyecek toksik düzeye ulaştığında bilinen tüm canlı sistemlerde ölüme neden olmaktadır. Kanser hücreleri için düşünüldüğünde ise ROS seviyesi, hücrelerin redoks adaptasyonu sayesinde yaşamına devam edebildiği tümörojenik düzeyin üzerine çıktığında sitotoksik seviyeye daha çabuk ulaşmakta ve sitotoksik seviyede tümör süpressör etkiler göstermektedir (Kim ve ark., 2019).

Toksik düzeye ulaşmış endojen ROS'un kanser hücrelerinde bilinen en iyi hedefi apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1)'dir. ROS artışının direkt olarak ASK1 dimer oluşumunu indüklediği ve aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Ichijo ve ark., 1997). ASK1'in aktivasyonu stresle aktive edilen protein kinaz (JNK) ve p38 kinazın fosforilasyonunu ve aktivasyonunu tetikleyerek hücrede iç apoptoz yolağının aktifleşmesine neden olmaktadır. Ayrıca aktif ASK1/JNK/p38 sinyalizasyonu hücre siklusunu düzenleyen siklinleri inhibe ederek ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini aktive ederek hücre döngüsünün durmasına neden olmaktadır (Glasauer & Chandel, 2014; Han & Sun, 2007; Tobiume ve ark., 2001). ROS'un doğrudan hücre döngüsü proteinleri üzerine etkileri de tanımlanmıştır. En iyi örnek G2'den M fazına hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli olan fosfotaz Cdc25'in H₂O₂ aracılı oksidasyonu ve inaktivasyonudur (Liu, Liu, Wang, Yang & Wang, 2012; Savitsky & Finkel, 2002).

İç apoptoz yolağını aktifleştiren bir diğer ROS-aracılı mekanizma ise ROS'un direkt olarak mitokondri üzerine etkileri ile ilişkilidir. Bu mekanizmada ROS, VDAC-bağımlı mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin yapısını bozarak mitokondri membran potansiyelini değiştirmekte ve dış mitokondriyal zardan sitokrom c, AIF ve SMAC/DIABLO gibi pro-apoptotik faktörlerin salınımına yol açmaktadır (Galadari ve ark., 2017; Marchi ve ark., 2012; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). ROS'un

dış apoptotik yolak ile ilişkisi ise hücresele FLICE inhibitör protein (c-FLIP) hedefinde ilerletilmektedir. c-FLIP, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC)'nin oluşumunu engelleyerek dış apoptotik yolağı baskılamaktadır. Ancak yüksek düzeyde ROS, c-FLIP proteinini post-transkripsiyonel düzeyde regüle ederek dış apoptotik yolağın aktifleşmesini sağlamaktadır (Wilkie-Grantham, Matsuzawa & Reed, 2013).

ROS-aracılı hücre ölümlerinin büyük kısmı apoptotik yolağın aktifleşmesi ile sağlanıyor olmasına rağmen, hücre içerisinde endojen ROS oluşumunu arttıran bazı uyaranlar hücrelerde farklı ölüm tiplerini de tetikleyebilmektedir. Uyarana ajana ve hücre tipine bağılı olarak değışmekle birlikte sanguinarin ve curcuminin glioma hücrelerinde ROS-aracılı otofajik etkileri olduğı belirlenmiştir. ROS'un hücrelerdeki primer otofaji hedefleri arasında mTOR, ATG4 ve Beclin-1 proteinleri yer almaktadır (Chen, McMillan-Ward, Kong, Israels & Gibson, 2008; Scherz-Shouval, Shvets, Fass, Shorer, Gil & Elazar, 2007; Scherz-Shouval & Elazar, 2011). Bununla birlikte, otofajinin redoks ile düzenlenmesi, ROS'a maruz kalan hücrenin tipine, agresivitesine ve ajanın maruziyet süresine bağılı olarak değışmektedir (Galadari ve ark., 2017).

Toksik düzeyde ROS-aracılı tetiklenen bir diğere hücre ölümü tipi ise ferroptozdur (Dodson, Castro-Portuguez & Zhang, 2019). Ferroptoz mekanizmasında hücre membranında bulunan sistein/glutamat taşıyıcı sisteminde (system X_C⁻) gerçekleşen inhibisyon sonucu sistein alımı düşmekte ve böylece hücrenin antioksidan kapasitesi (GSH miktarı) azalmaktadır. Hücre içinde biriken ROS demir iyonlarının varlığında ciddi oksidatif hasar yaratarak ER stresinin eşlik ettiğı lipid peroksidasyonuna yol açmakta ve ferroptozu tetiklemektedir (Bebber ve ark., 2020). Çeşitli ajanların GSH'ın GSSG'ye dönüşümünü sağlayan GPx4 enzim inhibisyonuna neden olarak ferroptozu aktifleştirdiğı bildirilmiştir (Yang ve ark., 2014). Bu mekanizma hücrenin ROS'u ortadan kaldıran ana döngüsü olan GSH→GSSG dönüşümünü direkt olarak inhibe ettiğinden hücre içinde lipidik ROS artışına yol açmakta ve hücreyi ferroptozu teşvik etmektedir. Artemisin, sorafenib, erastin gibi ajanların renal hücreli karsinomada ve hepatosellüler karsinomada ROS-aracılı olarak ferroptozu uyardığı belirlenmiştir (Dixon ve ark., 2012; Linkermann ve ark., 2014; Louandre ve ark., 2015; Ooko ve ark., 2015).

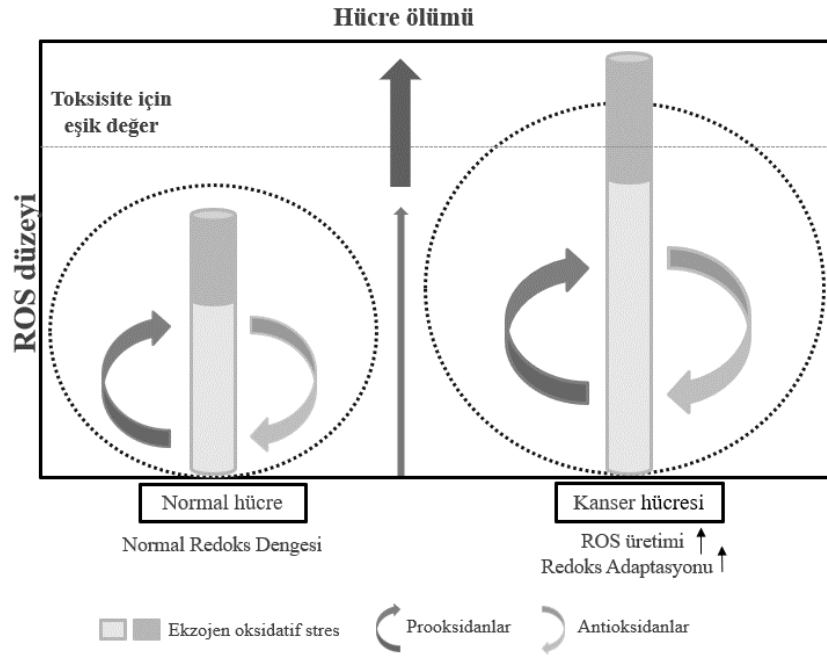
Son olarak toksik düzeydeki ROS'un, kanser hücrelerinde invaziv ve metastatik özelliklerin baskılanmasına yol açtığı ve hücrelerin kemosenesivitesinde artışa neden olduğu rapor edilen tümör süpressör etkileri arasında yerini almıştır (Galadari ve ark., 2017; Hayes ve ark., 2020). Yüksek konsantrasyonlarda ROS'un EMT mekanizması üzerindeki baskılayıcı özellikleri nedeni ile antimetastatik etki gösterdiği bilinmektedir. Normal düzeyde ABC transport proteinlerinin aktivitesinde artışa neden olarak ilaç yanıt sistemi üzerinde düzenleyici etkilere sahip olan ROS, toksik konsantrasyona ulaştığında P-glikoprotein inhibisyonuna neden olarak kanser hücrelerinin kemoterapi yanıtını iyileştirebilmektedir (Pandey, Chaube & Bhat, 2011).

ROS'un hücrel sistemlerde yararlı ve zararlı etkileri değerlendirildiğinde antikanser bir strateji olarak hücrelerde ROS düzeyinin azaltılması yönündeki yaklaşımlar (antioksidan kanser tedavileri) başarısız kalmaktadır. Bu başarısızlığın en önemli nedenleri arasında yer alan faktörler şu şekilde özetlenebilir: (i) ekzojen olarak arttırılan antioksidan kapasiteye rağmen kanser hücrelerinde kalan lokal ROS düzeyi tümörojenik seviyenin altına inemediği için onkogenik sinyalizasyonun devamlılığını sağlamaya yetebilmektedir. (ii) Sitostatik düzeyde ROS ve ROS'a bağımlı hücre sinyali normal hücre fonksiyonu için gereklidir. Normal bir hücrenin ölümüne neden olabilecek sitostatik düzeyin altındaki ROS düzeyi tümör hücresinin yaşamı için yeterli olabilmektedir. (iii) Antioksidan kanser tedavileri, günümüzde kanser tedavisinin altın standardı kabul edilen kemoterapi ile zıt etkilerde çalışmaktadır. Pek çok kemoterapi ajanı etkisini direkt ya da dolaylı ROS arttırıcı sitotoksiste ile göstermektedir. Bu nedenler ile antioksidan aktiviteye sahip ajanların direkt kanser terapi hedefinde kullanımları yerine riskli koşullarda kanser koruyucu amaçla ya da kanser terapi sırasında kemo-koruyucu amaç ile kullanımları daha yaygın olup bu doğrultuda daha olumlu sonuçlar alınmaktadır (Firczuk ve ark., 2020; Ghoneum ve ark., 2020; Glasauer & Chandel, 2014; Kim ve ark., 2019; Trachootham ve ark., 2009).

Bu nedenle, ROS hedefli kanser terapi yaklaşımlarında, hücrelerde ROS düzeyinin arttırılmasını (prooksidan etki) hedefleyen ve böylece daha seçici bir etki ile kanser hücrelerinde redoks adaptasyonunu toksik yöne doğru kaydıran yaklaşımlar ön plana çıkmış ve kanserde redoks adaptasyonunun terapötik olarak hedeflenebilirliği ile ilgili çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir (Choi, Venkatesan & Shim, 2019;

Firczuk ve ark., 2020; Perillo ve ark., 2020; Wang ve ark., 2019; Zaidieh, Smith, Ball & An, 2019).

Kanser hücreleri ve normal hücreler, oksidatif stres ve antioksidan kapasite dengesi açısından belirgin farklılık göstermektedir. Redoks dengesizliğine karşı geliştirilen oksidatif stres adaptasyonu kanser hücresi için biyobelirteç niteliğindedir. Normal hücreler daha düşük düzeyde ROS üretimi (sitostatik düzey) ve ROS'u ortadan kaldıran mekanizmalara daha az gereksinim ile karakterize iken; kanser hücrelerinde değişen redoks homeostazisine uyumla ilişkili olarak daha yüksek ROS üretimi (tümörojenik düzey) ve ROS'u ortadan kaldıran hüresel antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesinde artış söz konusudur. Ancak bu durum, terapötik açıdan seçici olarak kanser hücrelerinin hedeflenebilirliğini düşündüren biyolojik temele sahip bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır (Panieri & Santoro, 2016; Raza ve ark., 2017; Şekil 19).



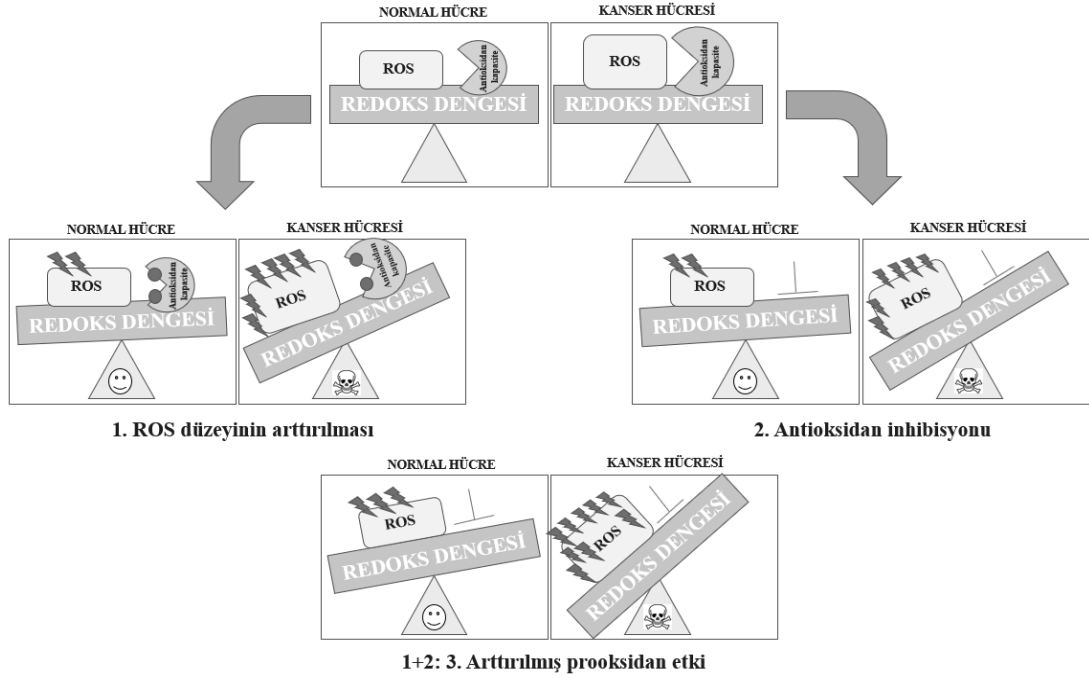
Şekil 19. Kanser hücrelerinde redoks manipülasyonlarının terapötik seçiciliği ve biyolojik temeli

Kanser hücrelerinin normal hücelere göre daha yüksek endojen ROS düzeyine sahip olmaları farmakolojik redoks manipülasyonları ile kanser hücrelerinin toksik ROS eşik değerine normal hücrelerden daha çabuk ulaşmasını sağlamakta ve toksik ROS değeri seçici olarak kanser hücrelerini programlı hücre ölümüne yönlendirmektedir. Yani, değişen redoks homeostazisi nedeni ile onkogenik

transformasyon geçirmiş hücreler redoks merkezli terapiler için primer hedef konumuna gelmektedir. Çeşitli ajanlar ile kanser hücrelerinde ROS düzeyini tümörojenik düzeyden sitotoksik düzeye çıkarmayı hedefleyen redoks manipülasyonları son yıllarda ilgi çeken çalışma konularından biri haline gelmiştir. Kanser hücrelerine kıyasla normal hücrelerdeki redoks homeostazisi daha düşük düzeyde ROS üretimi ve ROS'u ortadan kaldıran mekanizmalara daha az gereksinim ile karakterize olduğundan normal hücreler kanser hücrelerine göre redoks manipülasyonlarından daha az etkilenmektedir (Galadari ve ark., 2017; Glasauer & Chandel, 2014; Trachootham ve ark., 2009; Şekil 19).

Antikanser bir strateji olarak redoks manipülasyonlarında amaç primer terapötik hedef olan kanser hücrelerinde artmış olan ROS seviyesini toksik eşik değere çekmektir. Kanser tedavisinde redoks manipülasyonlarını içeren bu terapi modelleri genel olarak “prooksidan kanser terapi” olarak adlandırılmaktadır. Kanser hücrelerinin redoks adaptasyonunun bozulmasından daha çok etkilenmesi prooksidan kanser terapinin seçici sitotoksitesinin temelini oluşturmaktadır (Kim ve ark., 2019; Wang & Yi, 2008). Bu amaçla kanser hücrelerinde (i): direkt olarak oksidasyon yeteneğine (prooksidan etkiye) sahip bazı ajanlar kullanılarak doğrudan ROS seviyesinin artışı sağlanabilmektedir. Böylece, kanser hücrelerinde ROS düzeyi toksik eşik düzeyin üzerine çıkarılarak stresle indüklenmiş apoptoz, ferroptoz, otofaji ya da nekroptoz gibi programlı hücre ölümleri uyarılabilmektedir. Bu yaklaşım, direkt prooksidan etkiye sahip olan antikanser terapi yaklaşımıdır. Alternatif olarak (ii): antioksidan savunma sistemini bloke eden moleküller kullanılarak ROS'a karşı savunma mekanizmasını ortadan kaldırma yolu ile kanser hücrelerinin artmış olan ROS düzeyine karşı toleransı azaltılabilmektedir (Narayanan, Ma & Özcelik, 2020; Trachootham ve ark., 2009; Wang ve ark., 2021). Antioksidan inhibisyon yaklaşımında, kanser hücrelerinde antioksidan savunma sisteminin bloke edilmesi ile hücrelerde artmış ROS düzeyinin toksik değere eşitlenmesi hedeflendiğinden bu yaklaşım dolaylı prooksidan etkilere sahip bir yaklaşımı temsil etmektedir. Her iki strateji de literatürde kabul gören prooksidan kanser terapi yaklaşımları arasında yer almaktadır (Dong, Liu & Zhu, 2016; Kim ve ark., 2019; Wang ve ark., 2021). Ek olarak, son yıllarda iki yaklaşım kombinlenerek hem endojen ROS düzeyinin arttırılması hem de antioksidan savunma sistemi üzerinde inhibisyon sağlayıcı etkilerin yaratılması ile arttırılmış prooksidan

terapiler de, sinerjistik etkisi ve kanser spesifitesi daha yüksek bir terapi seçeneğini oluşturmaktadır (Firczuk ve ark., 2020; Şekil 20).



Şekil 20. Prooksidan kanser terapi yaklaşımları: 1. ROS düzeyinin arttırılması, 2. Antioksidan inhibisyonu ve 3. Arttırılmış prooksidan etki modeli

2.5.8. Kanser terapide prooksidan özelliklere sahip bileşiklere genel bakış

Prooksidan özelliğe sahip bileşikler, hücresel makromoleküller üzerinde oksidasyona neden olarak endojen oksidatif stresi artırma yeteneğine sahip bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Direkt prooksidan etkiye sahip olan bu bileşiklere ek olarak antioksidan savunma sisteminde inhibisyon sağlama özelliğine sahip bazı bileşikler de hücrede endojen oksidatif stres artışına neden olduklarından dolayı prooksidan etki göstermektedir (D'Angelo, Martino, Ilisso, Bagarolo, Porcelli & Cacciapuoti, 2017; Rahal ve ark., 2014). Literatürde prooksidan özelliği bulunan bileşiklerin veya türevlerinin çeşitli kanser türlerinde antikanser etkilerinin araştırıldığı prelinik ve klinik çalışmalar yer almaktadır (Dong ve ark., 2016; Galadari ve ark., 2017; Trachootham ve ark., 2009; Prooksidan özelliği bulunan bileşiklerden bazıları (Paclitaxel, Docetaxel, Doxorubicin gibi antrasiklinler, Prokarbazin, Vinkristin, Cisplatin, Bleomisin, 5-fluorourasil (5-FU), Rituximab, Arsenik trioksit (ATO), Sorafenib) kanser kemoterapisinde hali hazırda aktif kullanılan kemoterapötiklerdir (Yang ve ark., 2018). Ancak prooksidan etkiye sahip kemoterapi ajanlarının kanser

hücrelerinde bu yöndeki seçici etkileri düşük olduğundan, bu ajanlar normal hücreler üzerinde de prooksidan etki aracılı sitotoksiste göstermektedir. Bu durum tek başlarına kullanıldığında kemoterapi ajanlarının antikanser potansiyelini sınırlamaktadır (Huang & Pan, 2020; Mirzaei ve ark., 2021). Bu nedenle seçici olarak kanser hücrelerinde prooksidan etki gösterebilen ajanlar prooksidan kanser terapi için daha fazla umut vaat etmektedir. Benzer yaklaşımla kanser spesifitesi daha yüksek bazı küçük molekül yapısına sahip prooksidan etkili bileşiklerin çeşitli kanserlerde tek başlarına ya da kemoterapötikler ile kombin halinde uygulanan ve devam eden faz çalışmaları bulunmaktadır (Choudhari, Mandave, Deshpande, Ranjekar & Prakash, 2020; Gupta, Verma, Nalla, Kulshreshtha, Lall & Prasad, 2020; Zhang, Duan, Song, Liu, Hou & Fang, 2021). Örneğin daha önce tedavi edilen ve ikinci basamak tedavide Docetaxel alması uygun görülen akciğer, meme ve hormona dirençli prostat kanseri hastalarında, güçlü bir GSH deplesyonu sağlayan ve böylece kanser hücrelerinde prooksidan etkileri bulunan İmexon maddesi ile Docetaxel'in kombin kullanımının 2015 yılında Faz I çalışmaları tamamlanmış (Moulder ve ark., 2010) ve bu kombinasyonun akciğer kanserinde Faz II çalışmalarına ilerletilmesi uygun görülmüştür (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00327288).

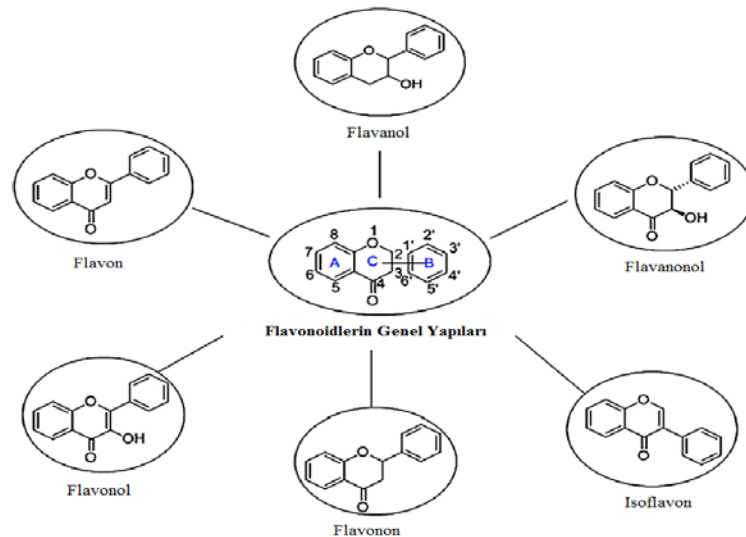
Prooksidan etkili bileşikler etki mekanizmaları açısından farklılık göstermelerine rağmen doğrudan ya da dolaylı olarak endojen ROS artışına bağlı hücre ölümünü tetiklemeleri nedeni ile ortak noktalara sahiptir. Literatürde en dikkat çeken prooksidan etkili bileşikler, (i) direkt ROS artışı, (ii) GSH deplesyonu, (iii) TRX inhibisyonu, (iv) SOD inhibisyonu olmak üzere etkilerini dört farklı mekanizma üzerinden gerçekleştirmektedir (Firczuk ve ark., 2019; Kim ve ark., 2019; Wang & Yi, 2008). Bu gruplar içerisinde yer alan yüzlerce bileşik ve türevleri içerisinde, (i) Direkt ROS artışı grubunda fenolik asitler ve flavonoidler (curcumin, quersetin, resveratrol, epigallokateşin, epigallokateşin gallat, kateşin gibi), piperlongumine, elesclomol (STA-4783) ajanlarına ek olarak fotodinamik kanser terapi; (ii) GSH deplesyonu grubunda buthionin sulfoksimin (BSO), imexon, fenetil izotiyosiyanat (PEITC), sulfurofan; (iii) TRX inhibisyonu grubunda PX-12 (1-metilpropil 2-imidazol disulfid), moteksafin gadolinium, auranofin altın kompleksi; (iv) SOD inhibisyonu grubunda methoxyestradiol (2-ME), ATN-224, disulfiram bileşikleri öne çıkmaktadır (Dong ve ark., 2016; Lee, Lee & Lim, 2021; Trachootham ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2021).

Mevcut tez çalışmasında antikanser etkilerinin ve kanser hücrelerinde prooksidan hedeflerinin araştırılması amacıyla ilk kez oluşturulan arttırılmış bir *in vitro* prooksidan terapi modeli üzerinde çalışılmıştır. Bu kapsamda kanser hücrelerinde ROS artışının flavonoid sınıfına dahil polifenolik bir bileşik olan Apigenin ile indüklenmesi ve eş zamanlı GSH depleksiyonunun PEITC ile sağlanması öngörülmüş, böylece redoks adaptasyonunun her iki yönden baskılanması ile prostat kanseri için yeni bir *in vitro* prooksidan kombin terapi modeli oluşturulması planlanmıştır.

2.5.8.1. Prooksidan ajanlar olarak flavonoidler

2.5.8.1.1. Flavonoidlerin kanser terapisindeki rolleri

Flavonoidler, fenil benzopiran halka yapısına sahip olan bitkisel sekonder metabolit grubuna dahil polifenolik yapıdaki renkli bileşiklerdir. Doygunluk düzeylerine, C-halkasının değişim paternine ve merkezi piran halka yapısının açılımına göre flavon, flavanol, flavanonol, flavonol, flavanon ve isoflavon olmak üzere 6 gruba ayrılmaktadır (Şekil 21). Günümüze kadar pek çok çalışmada çeşitli flavonoidlerin antialerjik, anti-inflamatuar, antianjiyogenik, antioksidan ve antikanser aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Durazzo, Lucarini, Souto, Cicala, Caiazzo & Izzo, 2019; Kopustinskiene, Jakstas, Savickas & Bernatoniene, 2020; Panche, Diwan & Chandra, 2016).



Şekil 21. Flavonoidlerin genel kimyasal yapıları (Ravishankar, Rajora, Greco & Osborn, 2013).

Flavonoidler kanser hücrelerinde antionkogenik hedefleri (tirozin kinaz ve serin/treonin kinaz inhibisyonu, topoizomerez inhibisyonu, VEGF ve MMP inhibisyonu, kaspaz aktivasyonu gibi) bulunması nedeni ile kanser terapisinde umut vaat eden küçük bitkisel metabolitler olarak dikkat çekmektedir (Lee ve ark., 2021; Panche ve ark., 2016; Ravishankar ve ark., 2013). Flavonoid sınıfında arasında yer alan bazı polifenolik bileşiklerin (alpinumisoflavone, baicalein, genistein, hispidulin, luteolin) güncel klinik öncesi deneyleri devam ederken (Choudhari ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2021); bazılarının ise (quersetin, curcumin ve epigallocateşin) kolorektal kanser, meme ve prostat kanserlerinde klinik faz çalışmaları (erken Faz I, Faz I, Faz II) devam etmektedir (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02891538, NCT03072992, NCT01912820).

2.5.8.1.2. Flavonoidlerin kanser terapisinde redoks aracılı rolleri

Flavonoidlerin, hedef bir molekülden oksidatif hasarı uzaklaştıran, önleyen ya da geciktiren güçlü antioksidan etkileri bulunmaktadır. Flavonoid aracılı antioksidan etki mekanizmaları arasında ROS'ları direkt ortadan kaldırma (antiradikal aktivite), antioksidan enzimlerin aktivasyonu, oksidazların inhibisyonu, nitrik oksit tarafından oluşturulan oksidatif hasarın azaltılması ve düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerin (GSH gibi) sentezini artırma gibi mekanizmalar yer almaktadır. Bu özellikleri nedeni ile oksidatif hasara maruz kalan hücrelerde kanserin önlenmesi ya da kanser tedavisinde kemoterapötiklerin zararlı etkilerinin azaltılması amacıyla flavonoidlerin etkilerini inceleyen ve olumlu sonuçlar bildiren farklı çalışmalar bulunmaktadır (D'Amelia, Aversano, Chiaiese & Carputo, 2018; Kikuchi, Yuan, Hu & Okazaki, 2019; Liskova ve ark., 2021). Ancak bazı flavonoidlerin redoks aracılı etkileri, konsantrasyon bağımlı olarak geçiş metallerinin varlığında antioksidan yönden prooksidan yöne doğru kaymaktadır (Eren-Guzelgun, Ince & Gurer-Orhan, 2018; Pignitter ve ark., 2016; Procházková, Boušová & Wilhelmová, 2011). Örneğin, quersetinin insan lenfositlerinde 50 μ M'da oksidatif DNA hasarını azalttığı, 100 μ M'da ise prooksidan etki ile aracılı DNA hasarını arttırdığı tespit edilmiştir (Yen, Duh, Tsai & Huang, 2003).

Antikanser bir strateji olarak flavonoidlerin prooksidan etkilerinden faydalanılması yönündeki araştırmalar son yıllarda artış göstermiştir. Bazı flavonoidler, kanser hücreleri üzerinde seçici prooksidan etkilere sahip olduklarından spesifik olarak kanser hücrelerinde ROS artışını uyarabilmektedir. Bazı flavonoidler ise seçici prooksidan etkileri ile kanser hücrelerinde antioksidan savunma kapasitesini inhibe etme yolu ile dolaylı olarak ROS artışına neden olduklarından kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedir (Lee ve ark., 2021; Sznarkowska, Kostecka, Meller & Bielawski, 2017). Literatürde öne çıkan prooksidan etkili flavonoidlerin ROS-aracılı antikanser etkileri, preklinik etki mekanizmaları ve klinik faz çalışmalarındaki kullanım amaçları Tablo 3’de özetlenmiştir.

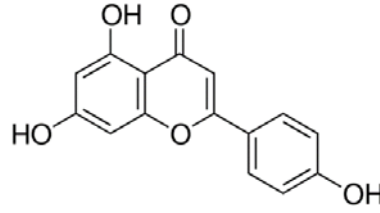
Tablo 3. Flavonoidlerin ROS-aracılı antikanser etkileri, prelinik etki mekanizmaları ve klinik faz çalışmalarındaki kullanım amaçları

Flavonoid	Araştırma düzeyi	Kanser türü	Prelinik çalışmalarda ROS-aracılı etki mekanizması/ Klinik çalışmalarda amaç	Referans
Genistein	Prelinik: <i>in vitro</i>	Mesane kanseri	ROS-bağımlı PI3K/Akt sinyal inhibisyonu	Park ve ark., 2019
Genistein	Prelinik: <i>in vitro, in vivo</i>	Meme kanseri	G2/M fazında hücre döngüsünün durdurulması ve ROS-aracılı apoptotik yolların aktifleşmesi	Kaushik ve ark., 2019
Daidzein	Prelinik: <i>in vitro</i>	Meme kanseri	ROS artışına bağlı mitokondriyal apoptotik yolağın aktifleşmesi	Jin, Zhang, Kang, Wang & Zhao, 2010
Hesperetin	Prelinik: <i>in vitro, in vivo</i>	Hepatosellüler karsinoma	ROS-bağımlı PI3K/AKT-Nrf2-ARE yolak inhibisyonu ile apoptoz	Li ve ark., 2021
Hesperetin	Prelinik: <i>in vitro, in vivo</i>	Mesane kanseri, özofagus kanseri, hepatosellüler karsinoma, meme kanseri	ROS artışına bağlı mitokondriyal apoptotik yolağın aktifleşmesi	Pandey, Sayyed, Tiwari, Siddiqui, Pathak & Bajpai, 2019 Wu, Zhang, Wang, Li, Liao & Dong, 2016 Zhang, Song, Wu, Wang & Dong, 2015 Palit, Kar, Sharma & Das, 2015
Naringenin	Prelinik: <i>in vitro</i>	Pankreatik kanser	ROS artışı sonucu ASK1 ile tetiklenen apoptotik yolak aktivasyonu	Park, Choi, Lee & Nam, 2017
Naringenin	Prelinik: <i>in vitro</i>	Prostat kanseri, koryokarsinoma, epidermoid karsinoma	ROS artışına bağlı proliferatif ve metastatik inhibisyon	Park, Lim, Bazer & Song, 2018 Ahamad, Siddiqui, Jafri, Ahmad, Afzal & Arshad, 2014 Lim, Park, Bazer & Song, 2017
Fisetin	Prelinik: <i>in vitro</i>	Hepatosellüler karsinoma	Apoptotik ve nekroptotik yolak aktivasyonu	Sundarraaj, Raghunath, Panneerselvam & Perumal, 2020
Kateşin	Prelinik: <i>in vitro</i>	Over kanseri	ROS-aracılı kaspaz-3 bağımlı apoptoz	Taparia & Khanna, 2016
Luteolin	Prelinik: <i>in vitro, in vivo</i>	Glioblastoma	ROS-aracılı ER stresi ve mitokondriyal disfonksiyon	Wang, Wang, Jia, Pan & Ding, 2017
Luteolin	Prelinik: <i>in vitro, in vivo</i>	Hepatosellüler karsinoma	ROS-aracılı mitokondriyal hasar	Seydi, Salim, Rasekh, Mohsenifar & Pourahmad, 2018
Kaempferol	Prelinik: <i>in vitro, in vivo</i>			

Quersetin	Prelinik: <i>in vitro</i>	Hepatosellüler karsinoma, meme, kolorektal kanserler	ROS-aracılı ferroptoz	Wang ve ark., 2021
Quersetin	Prelinik: <i>in vitro</i>	Hepatosellüler karsinoma	ROS-aracılı mitokondriyal hasar	Jeon ve ark., 2019
Epigallokateşin gallat (ECGC)	Klinik Faz II (NCT00666562)	Non-metastatik mesane kanserinin ameliyat öncesi tedavisi	ECGC'nin ameliyat öncesi tümör büyüklüğüne etkisi	Çalışma tamamlanmış ancak anlaşma gereği sonuçlar henüz tartışmaya açılmamıştır.
Green Tea Catechin, (Sunphenon® 90D)	Klinik Faz II (NCT04300855)	Aktif izlemdeki prostat kanseri hastaları	Aktif izlem süresinin arttırılması	Çalışmanın 2021 yılı içerisinde tamamlanması beklenmektedir.
Nanoyapılı lipid curcumin partikülü	Klinik Faz II (NCT02439385)	Unrezekeble metastatik kolorektal kanser hastaları	Avastin/FOLFIRI ile curcumin kombinasyonu, progresyonsuz yaşamın arttırılması	5 Haziran 2020'de tamamlanmış çalışmanın sonuçları henüz tartışmaya sunulacaktır.
Quersetin	Klinik Faz I (NCT01912820)	Prostatektomi ile tedavi edilen prostat kanseri hastaları	Cerrahi sonrası rekürrensiz yaşam süresini arttırma	Çalışma 23 Haziran 2021 tarihinde tamamlanmıştır.

2.5.8.1.2.1. Apigenin

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavone, C₁₅H₁₀O₅) flavonoidlerin flavon sınıfına ait, açık sarı renkli doğal bir polifenolik bileşiktir (Şekil 22). En bol kaynakları maydanoz, kereviz yaprağı ve kuru papatya çiçeği olup bu kaynaklarda total flavonoidlerin %68'ini tek başına Apigenin oluşturmaktadır. Apigenin içeren diğer besin kaynakları arasında ise soğan, biberiye, greyfurt, portakal, elma ve üzüm yer almaktadır (Imran ve ark., 2020; Salehi ve ark., 2019; Shukla & Gupta, 2010).



Şekil 22. Apigeninin kimyasal yapısı (Głowacki, Furmaniak, Kubalczyk & Borowczyk, 2016).

Günümüze kadar flavonoid sınıfına dahil diğer küçük moleküller gibi Apigeninin de sağlığın her alanında farklı biyolojik ve farmakolojik aktivitelerini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Preklinik çalışmalar sonucunda Apigeninin antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyal, antiviral, antifungal, antikanser aktiviteleri bulunan ve kan basıncını azaltıcı özelliğe sahip doğal bir molekül olduğu ortaya koyulmuştur (Salehi ve ark., 2019; Ali, Rahul, Jyoti & Siddique, 2017). Karaciğer, pankreas, kolorektal, kan, prostat, meme, akciğer, tiroid, cilt, baş-boyun ve kemik tümörleri dahil olmak üzere pek çok kanserde antikanser etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Imran ve ark., 2020; Salmani, Zhang, Jacob & Chen, 2017; Yan, Qi, Li, Zhan & Shao, 2017). Apigenin ile gerçekleştirilen *in vitro* ve/veya *in vivo* çalışmaların sonuçlarına göre ajanın pek çok kanser türünde tanımlanmış bulunan antikanser etki mekanizmaları arasında;

(i) Kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak apoptozu uyarma yoluyla hücre proliferasyonunu inhibe etme: Bu kapsamda pek çok kanser türünde tanımlanmış ortak hedefler bulunmaktadır; Siklin A, siklin B1, siklin D1, siklin D2, siklin bağımlı kinaz 1 ve 2 ile fosfotaz Cdc25 seviyelerinin baskılanması; Bcl-X_L ve Bcl-2 ekspresyonlarında azalma; Bax, Bad, Bak, p21 ve p27 seviyelerinde artış, kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 3 düzeylerinde ve aktivasyonlarında artış; PARP aktivasyonu;

TRAIL modülasyonu ile dış apoptotik yolağın deaktivasyonu; XIAP ve IAP-1 ekspresyonlarında azalma; DR4/5 aktivasyonunda artış (Yan ve ark., 2017),

(ii) Bazı kanser türlerinde otofajiyi uyarma: TF1 lösemi hücreleri ve BCPAP insan papiller tiroid karsinoma hücrelerinde asidik veziküler organellerin (AVOs) birikimi ve otofagozom oluşumu, LC3-II birikimi, Beclin 1, Atg5 ve Atg7 seviyelerinde artış, p62 degradasyonu (Cao ve ark., 2013; Yan ve ark., 2017),

(iii) Epigenetik düzeyde genomik instabiliteyi azaltma: Prostat kanserinde HDAC inhibisyonu (HDAC1 ve HDAC3) (Pandey, Kaur, Shukla, Abbas, Fu & Gupta, 2012),

(iv) Kanser hücrelerinin hareket yeteneğini azaltarak migrasyonu ve invazyonu baskılama: Prostat, melanoma, kolorektal ve akciğer kanserlerinde AKT/mTOR ilişkili olarak migrasyon potansiyelini baskılama; MMP-9 seviyesini azaltma; over kanserinde Src/FAK ekspresyonunda düşüş ile invazyonu azaltma (Javed ve ark., 2021; Yan ve ark., 2017),

(v) İmmünmodülatör ajan olarak kanser hücrelerine karşı bağışıklık sistemini uyarabilme: Meme kanserinde JAK/STAT ve PD-1/PD-L1 inhibisyonu (STAT1 aracılı olarak IFN- γ ile uyarılan PD-L1 ekspresyonunda baskılama) (İmran ve ark., 2010; Javed ve ark., 2021),

(vi) Çeşitli onkogenik proliferatif yollarda inhibisyon: PI3K/Akt/mTOR sinyalizasyonunu baskılama, GSK-3 β fosforilasyonunu azaltma; MAPK/ERK sinyalizasyonunda görevli aktif proteinleri baskılama; JAK/STAT (p-JAK1, p-JAK2 ve p-STAT3 düzeylerinde azalma) sinyalizasyonunda inhibisyon; NF- κ B p65 sinyal yolağını baskılama; Wnt/ β -katenin sinyal yolağını baskılama (siklin D1 ve c-myc düzeylerinde azalma); Smad2/3 inhibisyonu (Yan ve ark., 2017),

(vii) EMT mekanizmasını baskılama: E-kaderin seviyesini arttırma; Vimentin, Survivin, Snail, Slug, Twist1, MMP-2/9, VEGF proteinlerini baskılama yer almaktadır (Javed ve ark., 2021; Lee, Jung, Moon, Kang & Cho, 2019).

Apigeninin bu mekanizmaları hedef alan antikanser potansiyeline ek olarak kanser hücrelerinde endojen ROS miktarını arttırıcı etkileri ile ilgili ilk bulgular insan promiyelositik lösemi hücre hattı HL-60'da ROS artışına bağlı apoptoza neden olduğunun belirlenmesi ile ortaya çıkmıştır (Miyoshi, Naniwa, Yamada, Osawa & Nakamura, 2007). U2-OS insan osteosarkoma hücrelerinde 75 μ M dozda 48 saatte ve

in vivo osteosarkoma tümör modelinde 30 gün boyunca her üç günde bir 2 mg/kg uygulama sonucu Apigeninin ROS artışı ve mitokondriyal disfonksiyona bağlı apoptoza neden olduğu ve tümör boyutunu küçülttüğü belirlenmiştir (Lin ve ark., 2012). Apigenin uygulanmış çeşitli kanser hücrelerinde ROS-aracılı gerçekleşen hücre ölümlerini ve mekanizmalarını araştıran çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Apigeninin karaciğer, tiroid, pankreas, serviks kanseri, gastrik kanser, mesane kanseri, meme kanseri ve glioblastoma hücrelerinde apoptotik ya da otofajik aktivasyonları ROS-aracılı uyardığı tespit edilmiştir (Bai, Jin, Yang, Zhu & Cai, 2014; Choi, Jeong, Cho & Lee, 2007; Gilardini Montani ve ark., 2019; Sun, Lu & Feng, 2018; Shi, Shiao, Lee & Shih, 2015; Shendge, Chaudhuri & Mandal, 2021; Tavsan & Kayali, 2019; Zhang ve ark., 2015). İnsan malignant mezotelyoma hücrelerinde Apigenin uygulaması sonucu ROS-aracılı nekroptozun uyarıldığı saptanmıştır (Lee, Park, Nam, Cho & Lee, 2020; Masuelli ve ark., 2017). HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hattında Apigenin uygulaması sonucu endojen ROS oluşumunun NOX aracılı olarak arttığı gösterilmiştir (Choi ve ark., 2007). Ek olarak literatürde yer alan prelinik çalışmalarda özellikle flavon grubuna dahil olan flavonoidlerin (Apigenin, luteolin ve baicalein gibi) konsantrasyon bağımlı olarak hücrel antioksidanlar üzerinde hormetik (bifazik, ikili zıt) etkileri olduğu belirtilmiştir (Franco & Navarro, 2019; Suraweera, Rupasinghe, Dellaire & Xu, 2020). Örneğin Apigeninin toksik etkili olmayan konsantrasyonlarda ARPE-19 retinal epitel hücrelerinde ve renal tübüler epitel hücrelerde oksidatif stres ile tetiklenen hücre hasarını Nrf2/ARE yolağını aktive ederek önlediği gösterilmiştir (Xu, Li, Chen, Yu, Yang & Hang, 2016; Zhang, Zhao, Zhu, Wang, Ma & Gu, 2019). Buna karşılık Apigeninin yüksek konsantrasyonlarda (50 µM ve 100 µM) uygulandığında prooksidan etkileri uyumlu olarak HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hattında Nrf2'yi inhibe ettiği, CAT ve GPX aktivitesini baskıladığı ve hücrel GSH düzeyini azalttığı bildirilmiştir (Suraweera ve ark., 2020; Valdameri ve ark., 2011). Aynı hücre hattında 1.56-6.25 µM doz aralığında ise Apigeninin antioksidan etkiyle uyumlu olarak *Nrf2* ve hedef gen ekspresyonlarında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Paredes-Gonzalez ve ark., 2015). Sonuç olarak spesifik flavonların belirli konsantrasyonlarda Nrf2 inhibe edici özellikte etkilerinin bulunması bu ajanların kanserde tedavi amaçlı uygulamalarını araştırmak için ilginç bir noktayı oluşturmaktadır. Apigeninin bu kapsamdaki etkileri sadece hepatosellüler

karsinomada araştırılmıştır. Doxorubicin-dirençli BEL-7402/ADM ve HepG2 hepatoma hücre hatlarında Apigeninin *Nrf2*'yi mRNA düzeyinde inhibe ettiği, *Nrf2* hedefli faz II detoksifikasyon proteinlerini de hem mRNA hem de protein düzeyinde baskıladığı ve Doxorubicin etkinliğini arttırdığı belirlenmiş olup intraperitoneal Apigenin uygulanan *in vivo* hepatosellüler karsinoma tümör modelinde de Apigeninin BEL-7402 tümör boyutunu azaltıcı etkileri *Nrf2* inhibe edici etkileri ile uyumlu bulunmuştur (Gao, Zhang & Ke, 2017). Bu veriler Apigeninin kanser hücreleri üzerindeki prooksidan etkilerine önemli katkılar sağlamasına rağmen prooksidan etki dozunun kanser seçiciliği ya da ajanın kanser seçici konsantrasyonda *Nrf2* üzerinde benzer etkilere sahip olup olmadığı hepatosellüler karsinoma dahil diğer kanser türlerinde de belirsizliğini korumaktadır.

Apigeninin prooksidan kanser terapi için potansiyel bir kemoterapötik aday olabileceğine ilişkin öngörüler ise, A375 insan melanoma hücre hattı, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ve kanserli hepatositlerde gerçekleştirilen iki çalışma ile gelişme göstermiştir. A375 ve A549 hücre hatlarında Apigeninin *in vitro* selektif sitotoksik etkilerini kanser hücrelerinde oksidatif fosforilasyon mekanizmasını ve mitokondriyal membran fonksiyonlarını bozarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Das, Das, Samadder, Boujedaini & Khuda-Bukhsh, 2012). Benzer olarak, kanserli hepatositlerde Apigeninin sadece kanser hücrelerinde mitokondriyal hasara bağlı olarak selektif sitotoksisite gösterdiği tespit edilmiştir (Seydi, Rasekh, Salimi, Mohsenifar & Pourahmad, 2016). Bu bulgular, Apigeninin prooksidan etkili bazı kemoterapötiklere (5-FU ve Doxorubicin) karşı kanser hücrelerinin duyarlılığını arttırdığının saptanması ile de uyum göstermektedir (Choi & Kim, 2009). Literatürde yer alan bu veriler Apigeninin kanser seçici prooksidan özelliklerinin bulunduğu işaret etmesine rağmen ajanın prooksidan kanser terapide kullanılabilir ideal bir kemoterapötik olabileceğine yönelik bulguların sınırlı olduğu görülmekte ve çeşitli kanser türlerinde Apigeninin bu yöndeki moleküler etki mekanizmalarını da kapsayan prelinik çalışmaların artırılması gerekmektedir.

Apigeninin prostat kanserindeki antikanser etkileri de çeşitli çalışmalarda araştırılmış ve genel antikanser mekanizmalarında açıklandığı şekliyle prostat kanseri hücrelerinde de major onkogenik sinyal yollarını, hücre döngüsü ve apoptoz regülatörlerini ve anjiyogenezde rol oynayan proteinleri regüle ederek apoptozu

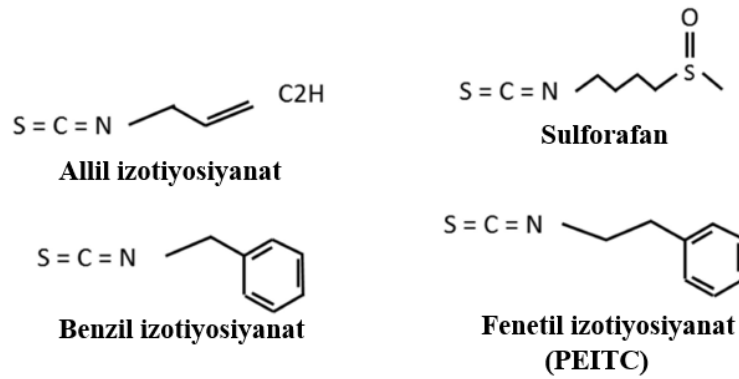
uyaran etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Mirzoeva, Franzen & Pelling, 2014; Shukla & Gupta, 2007; Shukla, Fu & Gupta, 2014; Shukla, Bhaskaran, Babcook, Fu, MacLennan & Gupta, 2014; Shukla ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2015). Ancak literatürde prostat kanserinde Apigeninin prooksidan etkilerinin değerlendirildiği çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. İlişkili olabilecek kapsamda gerçekleştirilen tek çalışmada 22Rv1 prostat kanseri hücre hattında ve *in vivo* 22Rv1 tümör modelinde Apigeninin neden olduğu ROS aracılı mitokondriyal hasarın p53 bağımlı apoptotik aktivasyon ile ilişkisi incelenmiştir (Shukla & Gupta, 2008). Apigeninin ROS artışına bağlı apoptotik etkileri prostat kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde doğrulanmış olmasına rağmen ajanın prooksidan kanser terapide kullanılabilirliği seçici prooksidan etkiye sahip potansiyelde aday bir kemoterapötik olup olmadığı henüz aydınlatılmamış ve kanser hücrelerinde onkogenik redoks adaptasyonu üzerine olası etkileri hiçbir kanser türünde incelenmemiştir. Apigeninin kanserde prooksidan potansiyeli ile ilişkin başlatılan herhangi bir klinik faz çalışması da henüz mevcut değildir. Sonuç olarak bu kapsamda detaylı prelinik çalışmaların artırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Mevcut tez çalışmasında prostat kanserinin seçici olarak prooksidan mekanizmalar ile hedeflenebilirliğine yönelik oluşturulan *in vitro* prooksidan kanser terapi modelinde hücrelerde endojen ROS artışını uyarıcı ajan olarak Apigenin kullanılmış ve böylece Apigeninin kanser hücrelerinde redoks adaptasyonu üzerindeki etkileri ve redoks adaptasyon mekanizmasının hedeflenmesinin apoptotik aktivasyon ile ilişkisi farklı fenotiplere sahip prostat kanseri hücrelerinde ilk kez değerlendirilmiştir. Ayrıca oluşturulan terapi modelinde prostat kanseri hücrelerinde eş zamanlı olarak PEITC kullanılarak antioksidan kapasitenin de GSH deplesyonu yolu ile baskılanması sağlanmış ve böylece Apigeninin hem tek başına ve hem de PEITC ile kombin etkileri ilk kez incelenerek prooksidan etkileri artırılmış bir terapi modelinde potansiyel bir terapötik aday olarak kullanılabilirliği incelenmiştir.

2.5.8.2. GSH deplesyonu sağlayıcı ajan olarak fenetil izotiyosiyanat (PEITC)

Biyoaktif organosülfür bileşikleri olan doğal izotiyosiyanatlar (ITC), R (yan zincir) $-N=C=S$ (izotiyosiyanat grubu) genel yapısı ile turpgiller familyasına (cruciferous) üye sebzelerde bol miktarda bulunan fitokimyasallardır (Şekil 21). Brokoli, brüksel lahanası, lahana, karnabahar, karalahana, hardal, vasabi ve su teresi

gibi farklı bitki kaynaklarından önemli miktarlarda elde edilebilmektedir (Kala, Ali, Ahmad, Gilani & Khan, 2018). Bu bitkilerde bulunan güçlü koku ve tat verici olan glukosinolatlar, ITC sentezindeki genel öncü moleküller olup hidrolizasyonları sonucunda çeşitli ITC türevleri oluşmaktadır (Gupta, Kim, Kim & Srivastava, 2014; Şekil 23). Hidrolizasyon reaksiyonları sonucu oluşan ITC'ler kimyasal yapılarının uygunluğu sayesinde kükürt, nitrojen ve oksijen bazlı biyolojik yapılar ile (proteinlerin tiyol ve amino grupları gibi) kolaylıkla reaksiyona girebilmektedir (Masuto ve ark., 2020; Miyoshi, 2016).

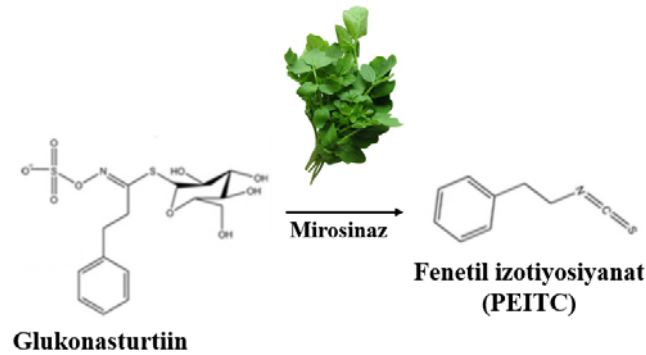


Şekil 23. Turpgiller familyasında bulunan ITC'lerin genel kimyasal yapıları (Mastuo ve ark., 2020).

ITC'lerin antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser ve antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle önemli farmakolojik özelliklere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Kubo, Chhunchha, Singh, Sasaki & Singh, 2017; Kumar, Tuli, Mittal, Shandilya, Tiwari & Sandhu, 2015; Wang & Bao, 2021). ITC'ler konsantrasyona bağlı olarak değişebilen antioksidan ve prooksidan potansiyelleri sayesinde de birçok kanser türü üzerinde kemo-koruyucu ve kemoterapötik etkilere sahiptir. ITC'lerin kemo-koruyucu etkisi Nrf2-Keap1-ARE sinyalizasyonunun aktivasyonu sonucu Faz II enzimlerinin nihai indüksiyonu ile gerçekleşmektedir (Chikara, Nagaprashantha, Singhal, Horne, Awasthi & Singhal, 2018; Kubo ve ark., 2017). Nrf2 prekarsinojenik ve karsinojenik süreçlerde sırasıyla tümör süprösör ve onkogenik rollerde ikili fonksiyon üstlenmektedir (Menegon ve ark., 2016). Bu nedenle, nutrisyon desteği ile ITC alımı, Nrf2'nin geçici aktivasyonunu sağlayarak sağlıklı veya potansiyel karsinojeniklere maruz kalan risk altındaki kişiler için faydalı olabilmektedir (NavaneethaKrishnan, Rosales & Lee, 2019). ITC'nin kemoterapötik etkileri ise

kanser hücrelerinde dolaylı ya da doğrudan ROS artışına neden olarak hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz indüksiyonu, anjiyogenez ve metastaz inhibisyonu ile ilişkilidir (Gupta ve ark., 2014; NavaneethaKrishnan ve ark., 2019). Böylelikle, ITC'ler büyük toksisite endişeleri olmaksızın umut vaat eden antikanser terapötik ajanlar olarak kabul görmekte ve bu kapsamda pek çok klinik faz çalışması (Faz I, Faz II ve Faz III) gerçekleştirilmektedir (Yuan ve ark., 2016; Wang & Bao, 2021; ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT00005883, NCT01228084, NCT04548193, NCT01568996, NCT03232138, NCT03934905, NCT02970682, NCT01948362, NCT02055716).

PEITC, antioksidan ve prooksidan etkilere sahip ITC grubuna dahil doğal bir bileşiktir. En önemli kaynağı su teresi (gerdema)'dir. Diğer önemli kaynakları arasında brokoli ve brüksel lahanası yer almaktadır (Chung, Morse, Eklind & Lewis, 1992). PEITC, su teresinde bulunan glukosinolat türevi glukonasturtiin hidrolizasyonu sonucu koku ve tat verici molekül olarak oluşmaktadır (Chikara ve ark., 2018; Şekil 24). PEITC'in hem kemo-koruyucu olarak hem de kemoterapötik açıdan etkileri çeşitli kanser türlerinde prelinik ve klinik düzeydeki çalışmalarda araştırılmaya devam etmektedir (Wang & Bao, 2021).



Şekil 24. Su teresinde bol miktarda bulunan PEITC glukonasturtiin mirosinaz enzimi tarafından hidrolizasyonu sonucu oluşmaktadır.

Prelinik çalışmaların sonuçlarına göre PEITC, çeşitli kanser türlerinde seçici olarak; (i) mTOR, HER2, AKT, MAPK, integrinler, STAT3 regülasyonu ile otonom büyüme sinyellerini inhibe etmektedir. (ii) Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar ile siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21, ölüm reseptörleri DR4,5 ve ana tümör süpressörler p53 ve Rb üzerinden anti büyüme sinyallerine karşı duyarsızlığı azaltarak hücre döngüsünü farklı evrelerde durdurabilmektedir. (iii) Bim, Bcl-2, survivin, Bid, PUMA, Bax regülasyonu ile proapoptotik sinyalleri aktifleştirmektedir. (iv) Telomeraz enzimi

üzerindeki etkileri ile sınırsız replikasyon potansiyelini bozmaktadır. (v) Hif- α , MMP ve VEGF üzerindeki inhibe edici etkileri ile anjiyogenezi baskılamaktadır. (vi) EMT düzenleyicileri üzerindeki etkileri nedeni ile invaziv ve metastatik yeteneği baskılamaktadır. (vii) Topoizomeraz ve miRNA regülasyonu ile genomik instabiliteyi azaltmaktadır. (viii) NF- κ B, STAT3 ve STAT1 inhibisyonu aracılı inflamasyonu düzenlemektedir. (ix) İmmünmodülatör etkileri ile kanser hücrelerinde immünojeniteyi arttırmaktadır (Aras, Gandhi, Masso-Welch & Morris, 2013; Gupta, Wright, Kim & Srivastava, 2014; Khor, Cheung, Prawan, Reddy & Kong, 2008; Lai ve ark., 2010; Malavolta ve ark., 2018; Mastuo ve ark., 2020; NavaneethaKrishnan ve ark., 2019; Shao, Yang, Yan, Huang, Liu & Zhang, 2017; Tang, Lin & Li, 2013; Wang, Govind, Sajankila, Mi, Roy & Chung, 2011). Preklinik çalışmalarda umut vaat eden antikanser özellikleri nedeniyle mutant p53 taşıyan oral kanserlerde, baş-boyun kanserlerinde ve sigara içen akciğer kanserli hastalarda PEITC'in dahil olduğu ve kemoterapötik ajan olarak farmakokinetik özelliklerinin tanımlanmaya çalışıldığı, tamamlanmış olan ve/veya devam eden klinik faz I, II ve III çalışmaları bulunmaktadır (Yuan ve ark., 2016; Wang & Bao, 2021; ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT00005883, NCT00691132, NCT01790204, NCT02468882).

Literatürde PEITC'in potansiyel bir kemoterapötik ajan olarak kanser hücrelerindeki selektif etkilerinin ajanın prooksidan özellikleri ile ilişkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. PEITC kanser hücreleri üzerindeki selektif sitotoksik etkileri yüksek olan bir maddedir (Trachootham ve ark., 2006). Bu etkisinin, ajanın prooksidan özellikleri ile uyumlu olabileceği düşünülmektedir ve farklı kanserlerde yapılan çalışmalar PEITC'in, seçici olarak kanser hücrelerinde GSH düzeyinde azalmaya neden olarak antioksidan savunma sistemini baskılama özelliğine sahip bir ajan olduğunu doğrulamaktadır (Zhang ve ark., 2008; Wang ve ark., 2017). PEITC kaynaklı GSH düzeyindeki azalma hücrelerde endojen ROS artışı ile mitokondriyal membran potansiyelini bozarak ölüme neden olmaktadır. PEITC'in prostat kanserindeki prooksidan etkileri de benzer şekilde mitokondriyal membran hasarı, oksidatif fosforilasyonun baskılanması ve ROS artışı aracılı gerçekleşmektedir (Xiao ve ark., 2010). Güncel çalışmalarda da PEITC'in prooksidan etkisi ile ilişkili olarak over kanseri hücrelerinde seçici şekilde ROS artışına neden olarak UPR-aracılı apoptotik etki gösterdiği (Hong ve ark., 2015), gefitinib dirençli NCI-H460 insan akciğer kanseri

hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon bağımlı iç apoptotik yolağı aktive ettiği (Hsia ve ark., 2018), akciğer kanseri kök hücrelerinde prooksidan etkileri nedeni ile *in vitro* ve *in vivo* kanser kök hücre karakteristiklerini bozabildiğı ve tümör büyümesini azalttığı (Wang ve ark., 2017), insan osteosarkoma hücrelerinde demir metabolizmasını ve redoks dengesini bozarak stresle indüklenen MAPK aktivasyonu aracılı apoptotik etkiye neden olduğı (Lv, Zhen, Liu & Shang, 2020a), K7M2 mürin osteosarkoma hücrelerinde GSH-demir-ROS dengesini bozarak ferroptozaya ve apoptozaya yol açtığı (Lv, Zhen, Liu & Shang, 2020b), kanserde fotodinamik terapi etkinliğini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda arttırdığı (Hu ve ark., 2019), kemoterapi dirençli CD44 pozitif kolon kanseri hücrelerinde redoks homeostazisini bozarak 5-FU ile sinerjistik etki gösterdiği (Ju ve ark., 2016) belirlenmiştir.

Prooksidan etkilerine ek olarak PEITC'in hücresele düzeyde koruyucu etkileri de bulunmaktadır. Daha düşük dozlarda PEITC'in bu etkileri antioksidan ve kanserde kemo-koruyucu nitelikleri ile ilişkilendirilmiştir. Örneğın PEITC uygulaması hücrelerde HSF1 ve Nrf2 aktivasyonunda artışa neden olmaktadır (Dayalan Naidu, Suzuki, Yamamoto, Mahey & Dinkova-Kostova, 2018). PEITC'in meme, prostat, servikal ve pankreas kanseri hücrelerinde Nrf2 transkripsiyonel aktivasyonunu arttırdığı ve böylece detoksifikasyondan sorumlu enzimlerin miktarında artışa yol açtığı belirlenmiştir. Buna rağmen, ilgili çalışmalarda ajanın bu etkilerinin kemo-koruyucu amaç doğrultusunda vurgulandığı görülmektedir (Chikara ve ark., 2018; Keum, Owuor, Kim, Hu & Kong, 2003; Ramirez ve ark., 2017; Soundararajan & Kim, 2018).

PEITC'in Nrf2 aktivasyonuna yol açtığı bilinmesine rağmen ileri evre kanserlerde tek başına ya da çeşitli kemoterapötik ajanlar ile birlikte seçici olarak kanser hücrelerinde sinerjistik sitotoksik etkileri bulunduğundan ve kemoterapötiklere karşı duyarlılığı arttırdığı için ajanın potansiyel kemoterapötik özellikleri en az kemo-koruyucu etkileri kadar dikkat çekmektedir (Denis, Cellerin, Gregoire & Blanquart, 2014; Ju ve ark., 2015; Koschorke ve ark., 2019).

Mevcut literatür verileri dikkate alındığında PEITC'in çeşitli kanserlerde tek başına ya da kombin halinde prelinik uygulamaların ve bu kapsamdaki moleküler mekanizmaların araştırılmaya devam ettiği görülmekte ve kanser terapide ajanın prooksidan özelliklerinden faydalanılabileceğı düşünülmektedir. Bu nedenle mevcut

tez çalışmasında PEITC, doğal bir bileşik olarak ve detaylandırılan potansiyel özellikleri nedeni ile Apigeninin kanser hücreleri üzerindeki prooksidan etkilerinin arttırılmasına olası katkıları öngörülen ajan olarak kullanılmıştır.

2.6. Prostat kanseri (PK)

Prostat kanseri (PK), dünya genelinde erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci en sık rastlanan solid doku kanseri olup kansere bağlı ölümler arasında altıncı sırada yer almaktadır. GLOBOCAN 2020 küresel kanser yükü istatistiklerine göre dünya genelinde yeni tanı alan vaka sayısı 1.414.259 ve PK nedenli ölüm sayısı ise 375.304 olarak tahmin edilmektedir. Ülkemizde de PK, akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür. Türkiye’de PK yükü istatistikleri 2020 yılı itibari ile 19.444 yeni vakaya ve 5.464 PK nedenli ölüme işaret etmektedir (Sung ve ark., 2021).

PK’lerin büyük çoğunluğu yavaş progresyon özelliğine sahip olup düşük risk ve düşük agresivite ile karakterizedir. Pek çok vakada erken semptomlar belirgin değildir. Hastalığın geç semptomları arasında ise anemiye bağlı yorgunluk, kemik ağrısı ve spinal metastazlardan kaynaklanan felç ve bilateral üretral obstrüksiyondan kaynaklanan böbrek yetmezliğini yer alabilmektedir (Roberts ve ark., 2018).

Hastalığın tanısında sıklıkla dijital rektal muayene (DRE), kandan prostat-spesifik antijen (PSA) testi ve transrektal ultrason eşliğinde prostat biyopsisi (TRUS)’nden faydalanılmaktadır. PSA testinin PK taramasında hastalık spesifitesi hala tartışmalı olmasına rağmen PSA rutin pratikte kullanımı çok yaygın olan PK belirteçidir. Daha yeni tanı modaliteleri arasında ise erken tanı şansını arttıran bazı parametrelerin kullanımı ve yeni tanı teknikleri yer almaktadır. Serbest ve total PSA’nın birlikte kullanımı, DRE sonrası idarardan prostat kanser antijen-3 (PCA3) testi, Prostat Health Index (PHI) skoru (total PSA, serbest PSA ve serbest PSA [-2] proPSA izoformu), 4K testi (total PSA, serbest PSA, tam PSA and insan kallikrein antijen 2), multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme, PIRADS (prostat görüntüleme rapor ve veri sistemi) skoru ve MRI-TRUS füzyon biyopsi gibi güncel teknikler PK’nde erken ve doğru tanı için daha olumlu sonuçlar sunmaktadır (Leslie, Soon-Sutton, Sajjad & Siref, 2021).

PK’li birçok erkek için hastalıkla yaşamak mümkündür. Yavaş büyüyen ve genellikle düşük progresif özellikte bir tümör için üroloji uzmanları tarafından özel bir

linik takip planının yönetilmesi gerekmektedir. PK, sadece prostat ile sınırlı alanı kapsadığında lokalize PK olarak tanımlanmaktadır. Klinikopatolojik parametreler göz önüne alınarak lokalize PK'li hastalar aktif izlem altında tedavisiz yaşamlarını devam ettirebilmekte ya da lokalize PK'leri çeşitli cerrahi teknikleri de içeren (radikal prostatektomi gibi) lokal küratif terapiler uygulanarak tedavi edilebilmektedir. Ancak erken teşhis edilemeyen ya da standart tedavilere cevap vermeyen, cerrahi tedavi sonrası %30-35 oranda gelişebilen nüks ile seyreden, hızlı ve yüksek progresif özellikli lokal ileri PK'li hastalarda henüz hastalık riskini öngörmede kullanılabilecek herhangi bir biyobelirteç tanımlanamadığı için hasta yaşına ve yaşam beklentisine, hastalık ilişkili sağlık sorunlarına, tümör patolojisine ve kanserin boyutuna bağlı olarak genellikle palyatif tedaviler uygulanmaktadır. Ağrı kesici ilaçlar, bifosfonatlar, nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü ligand inhibitörleri, radyoterapi, hormonal tedavi, kemoterapi, radyofarmasötikler, immünoterapi, odaklı radyasyon tedavisi ve diğer hedefe yönelik tedaviler lokal ileri PK'nde kullanılan çeşitli medikal tedaviler arasında yer almaktadır. Son yıllardaki gelişmeler ile metastatik PK'lerinde tedavi seçenekleri ciddi artış göstermesine rağmen henüz PK'nin letal formu olan metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK)'nin etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Leslie ve ark., 2021).

2.6.1. PK etiyolojisi

PK'nın en iyi bilinen risk faktörü yaştır. PK yaşa bağlı insidansı en hızlı artış gösteren kanser türüdür. Tanı alan bireylerin %85'i 60 yaşın üzerindedir. Bilinen diğer risk faktörleri arasında ise erkek cinsiyet ilişkili aktiviteler, pozitif aile öyküsü ve genetik yatkınlık, obezite, hipertansiyon, egzersiz eksikliği, batı tipi beslenme, yüksek testosteron seviyesi ve etnik köken yer almaktadır (Gann, 2002).

2.6.1.1. PK'nde aile öyküsü ve genetik yatkınlık

PK, yüksek-orta penetrans gösteren PK yatkınlık genlerindeki nadir genetik varyasyonlar ile düşük penetrans gösteren bazı gen lokuslarındaki varyasyonlardan kaynaklanan ve %40-50 oranında kalıtsal faktörlerle ilişkili olduğu düşünülen bir hastalıktır. Ancak diğer pek çok kanser türünde olduğu gibi PK'nde de aile öyküsü her koşulda belirli genetik faktörler ile açıklanamamaktadır. PK'lerin yalnızca %5-10'nun prostat kanserine yatkınlık genlerindeki germline varyasyonlar nedeni ile ortaya çıktığı bildirilmektedir. Bu nedenle hem aile öyküsünün ve hem de genetik yatkınlığın PK

için güçlü bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Genel popülasyon ile kıyaslandığında birinci derece yakınlarında (baba ya da erkek kardeş) PK tanısı olan kişilerin hastalığa yakalanma riski 2 kat; birinci derece iki yakınında PK hikayesi olan kişilerin ise hastalığa yakalanma riski 5 kat artmaktadır. Ailesinde güçlü PK hikayesi olan bireylerde ise daha erken yaşta (6-7 yıl önce) lokal ileri PK tanı riski ve cerrahi tedavi sonrasında rekürrens riski genel popülasyona göre anlamlı olarak yüksektir. Günümüze kadar PK riski ile ilişkili 100'den fazla tek nükleotid polimorfizmi ve pek çok gen lokusu tanımlanmıştır. Bu genler arasında herediter prostat kanseri geni 1 (*HPC1*), çeşitli androjen ve vitamin D reseptör varyantları, *HPC2*, *HPCX*, *HPC20* ve *HOXB13* genleri yer almaktadır. Son yıllardaki çalışmalar ailesel meme ve over kanseri sendromuna yatkınlıktan sorumlu *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki germline varyasyonların PK'nde de etkili olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle *BRCA2* geni varyasyonları ailesel PK'nde en sık bildirilen varyasyonlar olması nedeni ile en yüksek ailesel PK riskini (7-8 kat fazla) teşkil etmektedir. *BRCA1/2* dışında homolog rekombinasyon ile DNA tamir mekanizmasında görev alan diğer proteinleri kodlayan genlerin (*CHEK2*, *BRIP1*, *ATM*, *ATR*, *NBS1*, *PALB2* gibi) varyasyonlarının da PK için risk teşkil ettiği bildirilmiştir (Leslie ve ark., 2021; Tan, Petrovics & Srivastava, 2018). Son olarak yanlış eşleşme tamir mekanizmasında görev alan *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* ve *hPMS2* gen varyasyonlarının erken yaş yüksek riskli ve metastatik PK'lerinde değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir. Belirli ailesel kriterleri sağlayan kişilerde yapılması önerilen bu genetik testler, Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN)'nin 2018 PK yönergesine dahil edilmiştir (National Comprehensive Cancer Network, Prostate cancer version 4.2018). Son olarak 2021 yılında başlatılan klinik faz çalışması "The IMPACT Study" ile PK yatkınlığına sahip erkek bireylerin tanımlanması hedeflenmiştir (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00261456>).

2.6.1.2. Batı tipi beslenme

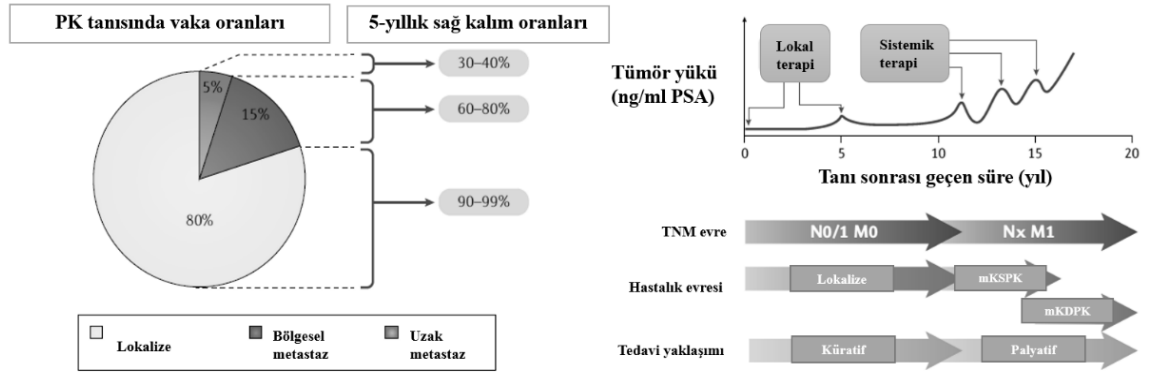
PK için diyet ilişkili bilinen risk faktörü iyi pişmemiş ve/veya işlenmiş kırmızı et yönünden zengin batı tipi beslenme alışkanlığıdır. Ayrıca, yüksek kalsiyum içeriğine sahip gıdaların lokal ileri PK için risk teşkil ettiği ve doymuş yağdan zengin gıdaların da PK riskini arttırdığı belirtilmektedir. Yüksek kalsiyum ve protein içeriği nedeni ile süt ve süt ürünlerinin fazla tüketimi ise PK tanılı hastalarda rekürrens riskini arttırmaktadır. Vejeteryan diyet, folik asit alımı ve balık tüketimi de beslenme ilişkili

olarak PK riskini azaltan faktörler olarak çalışmalarda yerini almıştır (Lin, Aronson & Freedland, 2015).

2.6.2. PK epidemiyolojisi

PK, dünya genelinde erkeklerde en sık rastlanan ikinci kanser türüdür ve gelişmiş ülkelerde daha sıklıkla gözlenmektedir. Tüm global kanserlerin %7'si PK iken bu oran gelişmiş toplumlarda %15'e çıkmakta ve hastalığın insidansı her geçen yıl artış göstermektedir (Sung ve ark., 2021). İnsidans artışındaki primer nedenlerin beslenme alışkanlıkları ve sosyal alışkanlıklar ile ilgili olduğu düşünülmektedir. PK genellikle 50 yaş üstü bireylerde ortaya çıkmaktadır ancak istisna olarak daha genç yaşta ortaya çıkan PK'leri de vardır ve hastalık daha erken yaşta daha agresif özellikler sergilemektedir. PK en fazla ABD'de ve Birleşik Krallık ülkelerinde, en az ise Afrika'da görülmektedir. PSA tarama testinin yaygın kullanımı nedeni ile insidansı ciddi oranda artış gösteren PK'nde gereksiz tanı ve tedaviyi önlemek amacıyla Ağustos 2018'de PK'nin klinik ve patolojik karakteristiklerinde bir dizi değişim gerçekleştirilmiştir. PSA tarama test sayısının azaltılması, yeni görüntüleme sistemlerinin kullanılması, düşük riskli PK'lerinin aktif gözetim altında tutularak radikal tedavilerden kaçınılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan yüzdeler orta ve yüksek dereceli PK'nin insidansına artış olarak yansımıştır (Leslie ve ark., 2021; Sung ve ark., 2021).

PK hastalarının %80'i tanı anında lokalize PK'ne sahiptir. Lokalize PK'nin 5-yıllık sağ kalım oranı %90'ın üzerinde olup hastalığın lokal terapisi net 5-yıllık sağ kalım avantajı sağlamakta ve sistemik terapiler ile birlikte lokalize PK'nde sağ kalım 15 yılı aşmaktadır. Ancak lokal ileri PK'li hastalarda ve uzak metastazlı (sıklıkla kemik) hastalarda 5-yıllık sağ kalım oranları sırasıyla %60-80 ve %30-40 arasında değişmektedir. Sistemik terapilerin metastatik PK'li hastalarda yaşam avantajı sınırlıdır (Rebello ve ark., 2021; Şekil 25).



Şekil 25. Tanı anında PK evrelerinin yüzdesi ve PK'li hastalarda evrelere göre tedavi destekli yaşam süreleri (Rebello ve ark., 2021).

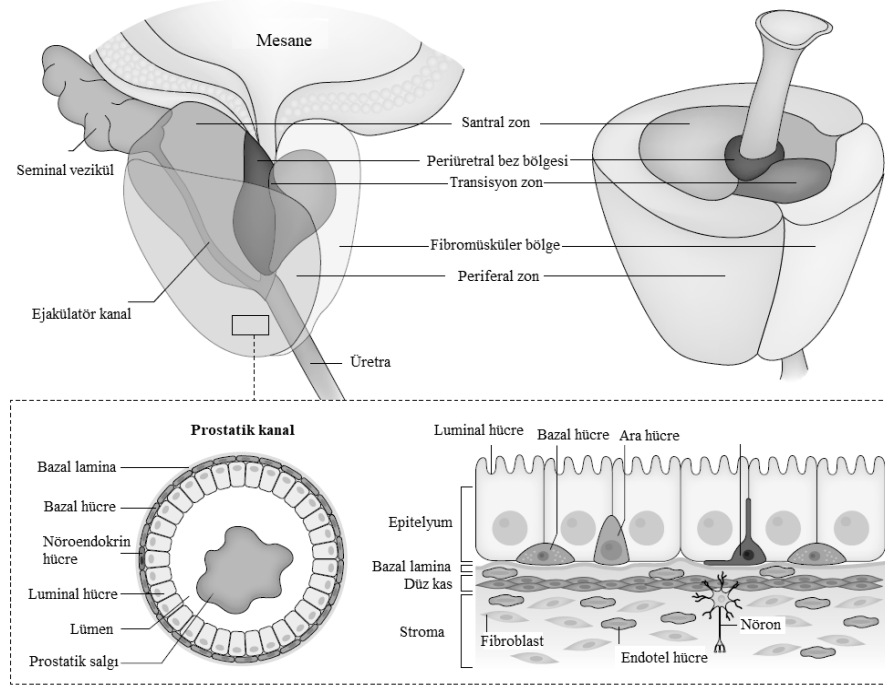
PK mortalite oranları ise hastalık evresine ve insidans sıklığına bağlı olarak değişim göstermektedir. Genel popülasyonda PK mortalite oranı 100.000'de 20.1 iken, siyahi Amerikanlarda oran 40.2'dir. Kafkas ve Asya toplumlarında ise daha düşük olmakla birlikte 100.000'de 8.8-18.7 arasında değişmektedir (Rawla, 2019; Rebello ve ark., 2021).

2.6.3. Prostat bezi anatomisi ve histolojisi

Prostat bezi yaklaşık olarak 3 cm uzunluğunda, ceviz büyüklüğünde ve 20 gram ağırlığında olup erkek ürogenital sisteminin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Pelvis boşluğunda bulunan, mesanenin altında ve rektumun hemen önünde konumlanan, prostatik üretranın etrafını saran koni biçiminde bir organdır. Üretranın prostat bezinin içine girdiği koninin taban kısmı bazis, prostatı terk ettiği koninin tepe bölümü ise apeks olarak adlandırılmaktadır. Prostat bezinin detaylı anatomik araştırmaları sonucu morfolojik, patolojik ve fonksiyonellik temelinde santral, transisyon ve periferal zon olmak üzere farklı bölgeler tanımlanmıştır (McNeal, 1981).

Genç erişkin erkeklerde periferik zon prostat glandüler dokusunun >%70'ini oluşturmakta ve normal prostat fonksiyonuna en büyük katkıyı sağlamaktadır. Normal bez, stromaya gömülü kanallardan ve asinilerden oluşmaktadır. Kanallar ve asiniler, bazal membranı oluşturan bir bazal epitel tabakası ile çevrili tek bir basit silindirik epitel tabakasından meydana gelmektedir. Ekstrasellüler matriks tabakası, ağırlıklı olarak düz kas miyositleri olan spontan kasılmayı teşvik eden stromal hücrelerle çevrelenmektedir. Stromada bulunan fibroblastlar ise parakrin sinyalizasyonu

sağlayarak prostatik kanalları desteklemektedir. Bu süreç prostat gelişiminde büyük öneme sahiptir (Timms, 2008; Verze, Cai & Lorenzetti, 2016; Şekil 26).

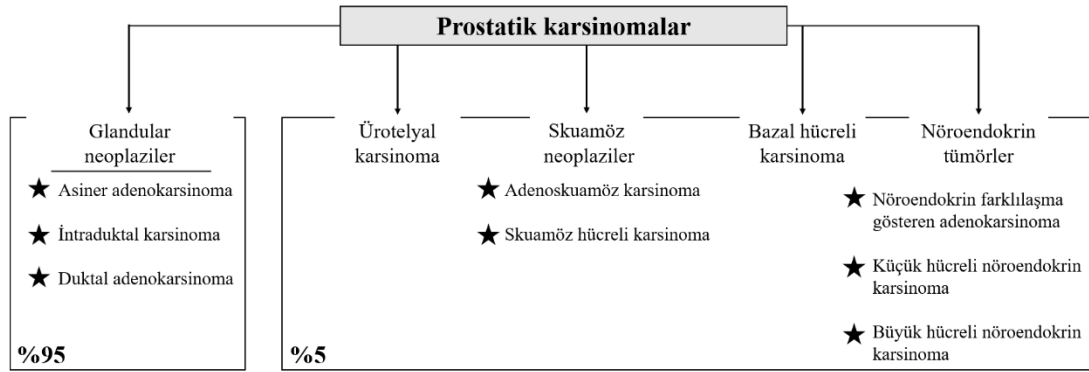


Şekil 26. İnsan prostat bezinin anatomisi ve histolojik yapısı

Prostat bezi esas olarak meninin yaklaşık %30-35'ini oluşturan sıvıyı üreten glandüler dokudan oluşmaktadır. Meninin prostatik kaynaklı bu kısmı spermleri beslemekte ve yüksek pH'ın korunmasına yardımcı olan alkali ortamı sağlamaktadır. Prostat bezindeki glandüler yapılanmayı oluşturan hücrelerin (prostat salgı epitelini oluşturan hücreler) yaşamsal fonksiyonları büyük ölçüde androjene bağımlıdır (Alukal & Lepor, 2016). Bu nedenle hem normal prostat epitel hücreleri hem de kanserleşme sürecine girmiş prostatik epitel hücreler yaşamsal fonksiyonlarının devamlılığı için yüksek seviyede androjen reseptörü (AR) eksprese etmektedir. AR, normal prostat epitelinin sağlığı için gerekli bir transkripsiyon faktörü iken kanserli prostat hücrelerinde hormon bağımlılığını devam ettiren onkogenik bir faktördür (Tan, Li, Xu, Melcher & Yong, 2015). Ek olarak bu hücreler AR tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen ve prostat kanserli erkeklerde sıklıkla yükselen bir serin proteaz olan PSA salgılamakta ve tümörün yükünü temsil eden bu parametre PK klinik tanısı ve takibinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Toivanen & Shen, 2017).

2.6.4. PK histopatolojisi

PK %80 oranında periferal zonda yer alan düzenli glandüler hücrelerdeki neoplastik değişimler ile başlamaktadır. Periferal zon prostatın DRE ile palpe edilebilen rektuma yakın kısmıdır (Şekil 26). PK çok yüksek oranda organın glandüler kısmından geliştiği için ve mikroskopik incelemede tipik glandüler paternler gösterdiğinden dolayı adenokarsinoma sınıfına dahil edilmekte olup PK'lerinin %95'ini prostatik adenokarsinomalar oluşturmaktadır. Kalan %5'lik kısımda ise daha nadir olarak görülen prostatik ürotelyal karsinoma, skuamöz hücreli neoplaziler, bazal hücreli karsinoma ve prostatın nöroendokrin tümörleri yer almaktadır (Inamura, 2018). Prostatik karsinomalar, WHO'nun 2016 yılında revize edilen sınıflamasına göre beş alt grup altında toplanmaktadır. Asiner adenokarsinomalar en sık görülen PK alt tipi oluştururken, ikinci en sık görülen alt tip ise prostatik duktal adenokarsinomalardır (Epstein ve ark., 2016; Şekil 27).



Şekil 27. WHO 2016'ya göre prostatik karsinomaların histopatolojik sınıflaması (Epstein ve ark., 2016)

2.6.4.1. Gleason skorum sistemi

Prostatik adenokarsinomaların klinik takibi ve tedavisinde kullanılan ve bilinen en iyi prognostik parametre Gleason skorum sistemidir. Bu sistemde prostatik glandüler paternler bez oluşturma becerisi ve stromadaki büyüme şekline göre iyi farklılaşmadan kötü farklılaşmaya doğru, patern içinde en sık görülen farklılaşma düzeyi ve en kötü görülen farklılaşma düzeyine göre 1-5 arasında 2 skor kullanılarak skorlanmakta (Şekil 28) ve böylelikle prostatik adenokarsinomalar WHO'nun 2016 yılındaki güncel derecelendirme sistemine göre histopatolojik olarak beş grade altında değerlendirilmektedir (Kweldam, van Leenders & van der Kwast, 2019). Buna göre;

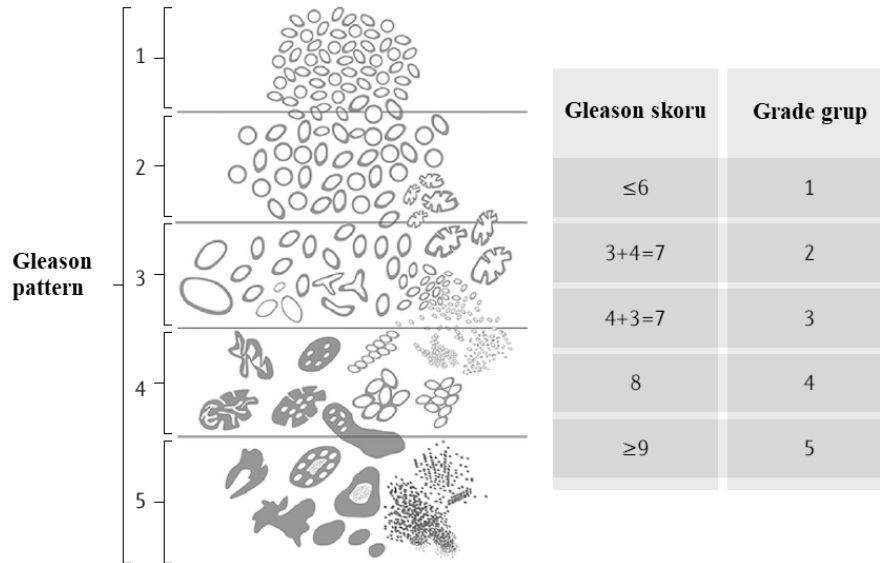
Grade grup 1 (Gleason skor 3+3=6 veya 6'dan az): Birbirinden belirli sınırlar ile ayrılmış iyi biçimli bez yapılarıdır.

Grade grup 2 (Gleason skor 3+4=7): Baskın olarak düzgün sınırlı nodüller bulunmasına rağmen kısmi olarak heterojenite gözlenir ancak bez yapıları hala yuvarlak ve düzgündür.

Grade grup 3 (Gleason skor 4+3=7): Tümöral nodül iyi sınırlara sahip değildir. Girinti ve çıkıntılara sahip kaynaşmış nodül yapıları sıklıkla gözlenir. En sık gözlenen gruptur.

Grade grup 4 (Gleason skor 8): Birleşik süngerimsi bez yapıları dikkat çeker, kaynaşmış, kribriform ve glomerüloid yapıdaki nodüller belirgindir.

Grade grup 5 (Gleason skor 9 ve üstü): Stroma tamamen dağınıktır ve bazı alanlarda nekrotik görüntüler bulunur. Glandüler yapı oluşturmaktan uzak solid hücre tabakaları çok belirgindir.

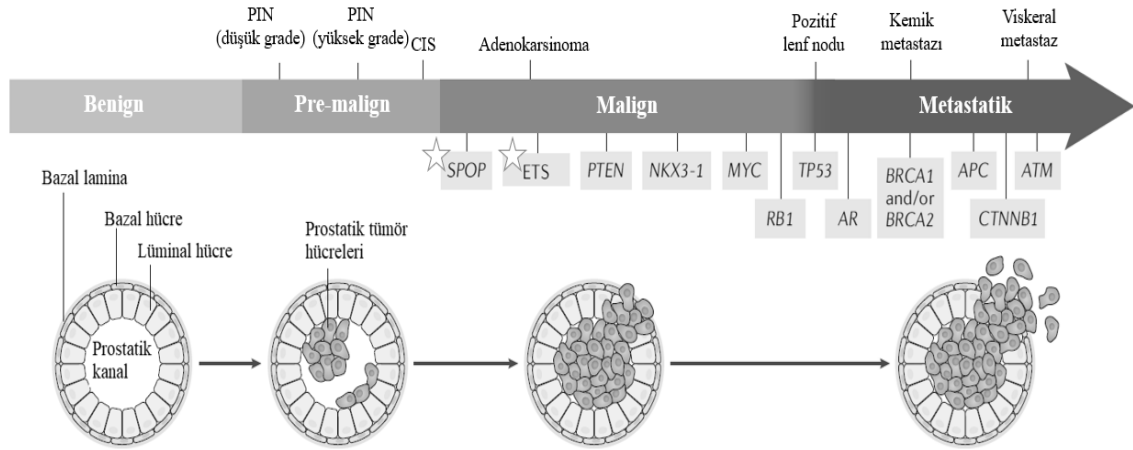


Şekil 28. Gleason skorlama ve grade grup şeması (Rebello ve ark., 2021)

Gleason skoru, klinik ve patolojik TNM evrelemesi, cerrahi tedavi kararı ve başarısı, cerrahi sonrası biokimyasal nüks, metastatik hastalığa progresyon ve hastalıksız sağkalım gibi PK'nin önemli klinikopatolojik parametreleri ile yakından ilişkili olarak tanımlanmış en iyi prognostik faktördür. Grade grup 3 ve üzeri PK'lerinin mevcut tedaviler ile yaşamsal avantajları daha sınırlıdır (Ertoyl Baydar, 2017).

2.6.5. PK patofizyolojisi ve hücresel düzeyde moleküler mekanizmalar

Son on yılda, PK'ne neden olan moleküler mekanizmaların, PK moleküler alt tiplerinin ve alt patolojilerinin aydınlatılmasına yönelik gerçekleştirilen tüm genom DNA dizilime, mRNA dizilime ve proteom profillemeye temelli çalışmalar PK'nin genetik temeline eşsiz bilgiler sağlamıştır. Prostatik adenokarsinomalarda tümör başlatıcı hücrelerin bazal hücreler veya lüminal hücrelerden kaynaklandığı düşünülmekte ve bu hücrelerde ortaya çıkan somatik genetik değişimlerin hastalığın primer itici gücünü oluşturduğu belirtilmektedir. Bu değişimler sonucu erken evrede prostatın pre-malign lezyonları, prostatik intraepitelyal neoplaziler (PIN) ya da atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP) gösteren malignite şüpheli odaklar oluşmaktadır. Süreç içerisinde pre-malign hücrelerde biriken genetik ve epigenetik değişimler ile adenokarsinomlar ortaya çıkmakta ve progresyona eşlik eden farklı moleküler değişimler sonucu da hastalık metastatik forma ilerlemektedir (Leslie ve ark., 2021; Rebello ve ark., 2021; Şekil 29).

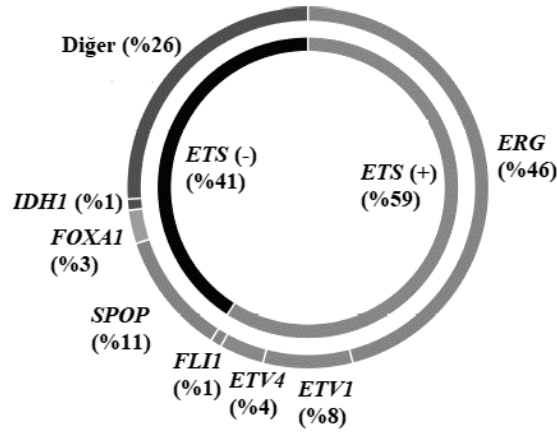


Şekil 29. PK'lerinin farklı evrelerine eşlik eden genetik varyasyonlar (Rebello ve ark., 2021)

2.6.5.1. Lokalize PK'nin moleküler mekanizmaları

Lokalize PK'leri genel olarak *PTEN* delesyonları (%12-17), *c-myc* amplifikasyonları (<%20), *p53* delesyonları ve mutasyonları (%8), *Rb1* kaybı (%1) ile *NKX3-1* kayıpları (<%18) ile karakterizedir (Rebello ve ark., 2021). Bu değişimlere ek olarak Kanser Genom Atlası Araştırma Ağı (TCGA) lokalize PK'lerini genom çapında analizlere dayanarak ve PK spesifik olarak 6 farklı moleküler alt tipe sınıflandırmıştır (Cancer Genome Atlas Research Network, 2015). Buna göre, lokalize

PK'lerinin %50'den fazlası sıklıkla AR ile düzenlenen PK spesifik onkogenik füzyonlar ile karakterizedir. Transmembran proteaz serin 2 (*TMPRSS2*) geni ile *ETS*-ilişkili gen ailesine üye *ERG* (%46), *ETV1* (%8) veya *ETV4* (%4) genlerinin kimerik formları ile karakterize gen füzyonları lokalize PK'lerinin %59'unu oluşturmaktadır. Bu grup genel olarak *PTEN* delesyonlarının daha sık görüldüğü moleküler alt gruptur (Carver ve ark., 2009). İkinci en sık lokalize PK'leri ise *ETS*-füzyon negatif adenokarsinomalar olup, speckle type POZ protein (*SPOP*) geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarının eşlik ettiği moleküler alt sınıf ile karakterizedir. *SPOP*-mutant PK'lerinde çeşitli tümör süpressör genlerin (*GSTP1* gibi) promotör bölgelerinde DNA metilasyonları, *E-kaderin* (*CHD1*) delesyonları ve *SPINK1* mRNA artışı dikkat çeken moleküler değişimler arasında yer almaktadır (Barbieri ve ark., 2012). Daha nadir olarak *FOXA1* geninde fonksiyon kazanımı mutasyonlarının ve *IDH1* geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarının eşlik ettiği lokalize PK'leri de farklı moleküler alt tipleri temsil etmektedir (Cancer Genome Atlas Research Network, 2015; Inamura, 2018; Şekil 30).



Şekil 30. TCGA'ya göre lokalize PK'lerinin moleküler alt tipleri (Inamura, 2018).

Lokalize PK'leri hormona duyarlı olmakla birlikte yaşamsal açıdan androjen ve AR sinyalizasyonuna bağımlıdır. Bu nedenle, *AR* geni amplifikasyonları ve fonksiyon kazanımı mutasyonları lokalize PK'lerinde nadir olarak gözlenmektedir. *AR* geninin sıklıkla PK progresyonunda ve metastatik hastalıkta sürücü rol oynadığı bilinmektedir (Mills, 2014; Rebello ve ark., 2021).

2.6.5.2. Lokal ileri ve metastatik PK'nin moleküler mekanizmaları

Lokal ileri PK, hastalığın artık prostat ile sınırlı olmadığı, yakın organ, lenf nodları ve/veya kemik tutulumlarının sıklıkla gözlendiği kısacası metastatik potansiyeldeki tüm PK'lerini ifade eden geniş bir tanımdır. Bu grup içerisinde metastatik kastrasyona duyarlı PK'leri (mKSPK) ve mKSPK'lerinin hormon duyarlılığını baskılayan androjen deplesyon terapisi (ADT) sonrasında gelişen ADT-dirençli metastatik kastrasyona dirençli PK'leri (mKDPK) yer almaktadır. Lokal ve sistemik terapi alan mKDPK'li hastalara ait biyopsi örneklerinde gerçekleştirilen çalışmalarda tümörün lokalize PK'lerinden farklı olan bir mutasyonel profilinin olduğu ve mevcut mutasyon profiline tedavi ilişkili genetik dalgalanmaların eşlik ettiği belirlenmiştir (Fraser ve ark., 2017; Rebello ve ark., 2021; Robinson ve ark., 2015).

2.6.5.2.1. Metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK)

Metastatik KDPK, tanı anında tüm PK'lerinin %5'lik dilimini oluşturan, %30-35 oranında da lokalize PK'lerinin lokal tedaviler sonrası nüksü sonucu gelişen lokal ileri PK'lerinde (sıklıkla mKSPK) ADT sonrası dirençle karakterize letal PK formudur. Hastalığın bilinen sistemik tedaviler ile klinik kontrolü henüz mümkün değildir (Grasso ve ark., 2012; Leslie ve ark., 2021).

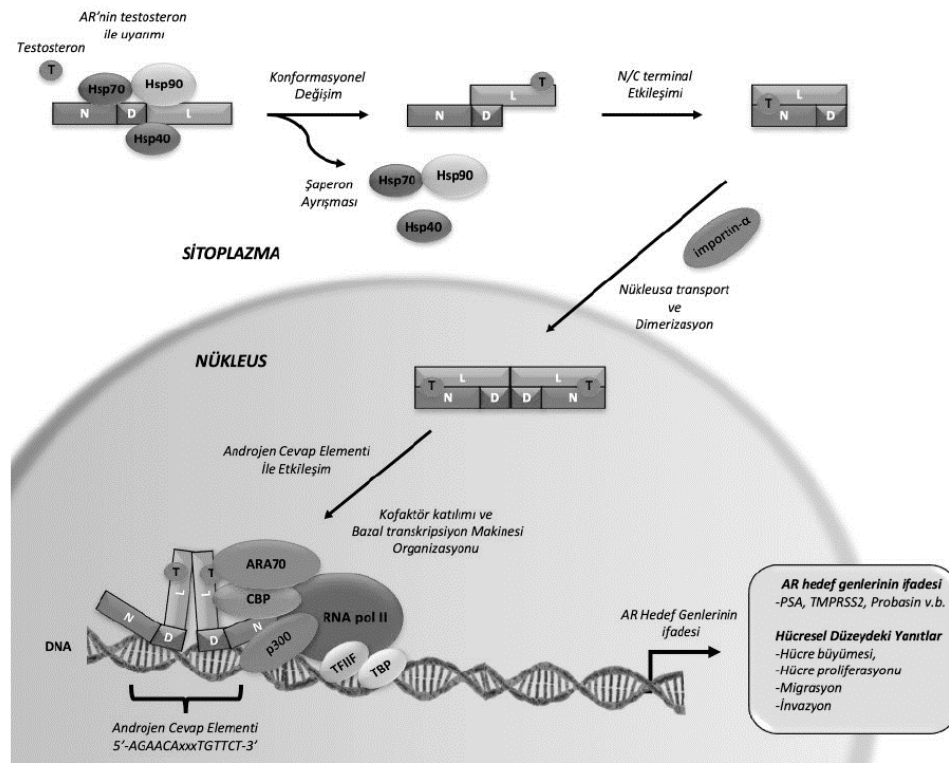
Metastatik KDPK'lerinde en yaygın görülen değişimler AR sinyalizasyonunu kapsayan çoklu disregülasyonlardır. Sıklıkla AR amplifikasyonları, AR fonksiyon kazanımı mutasyonları, AR geninin transkripsiyon regülatörlerinin (*FOXA1* gibi) amplifikasyonları, AR protümörojenik sinyalizasyonunun baskılayan repressörlerin inaktive edici mutasyonları ya da delesyonları gibi moleküler değişimler mKDPK'li hastaların %70'inde mevcuttur. Metastatik KDPK öncesi tedavi almamış mKSPK'li tümör örneklerinde ise AR ilişkili değişimler %2-6 sıklığında ortaya çıkmakta olup, bu süreç AR'nin tedavi sonrası edinilmiş fonksiyon bozukluklarına ve mKDPK progresyonuna olan katkısına işaret etmektedir (Mateo ve ark., 2020; Mills, 2014; Rebello ve ark., 2021; Stopsack ve ark., 2020).

2.6.5.2.1.1. Androjen reseptörü (AR) ve sinyalizasyonu

İnsan AR, X kromozomu üzerinde Xq11-12 lokalizasyonunda konumlanan ve 8 ekzondan oluşan AR geni tarafından kodlanan, ligand bağlanması ile aktifleşen nüklear reseptör süperailisine üye bir transkripsiyon faktörüdür. AR proteini basit

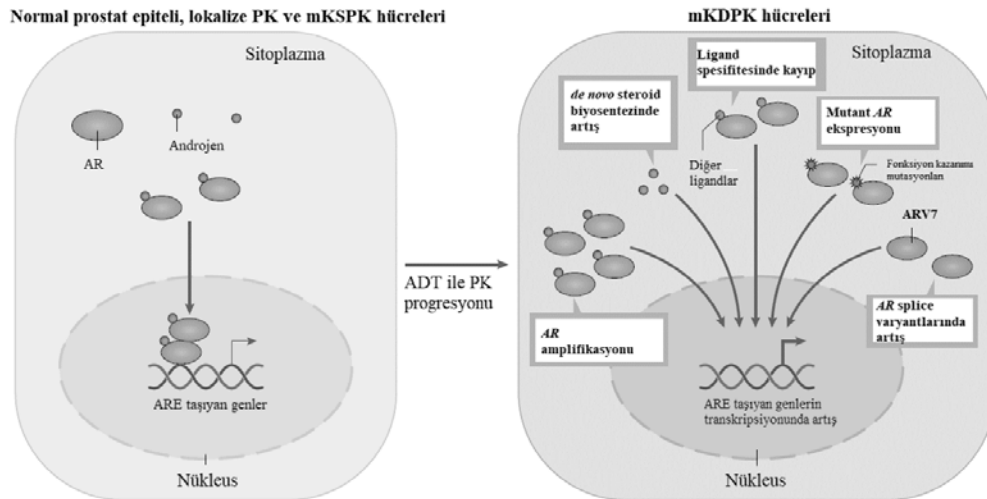
olarak N-terminal domain, DNA-bağlanma bölgesi ve ligand-bağlanma domaini ile sonlanan bir C-terminalden oluşmaktadır (Tan, Li, Xu, Melcher & Yong, 2015).

Prostatın normal luminal epitelyumunda androjenin aktif formu olan dihidrotestosteronun (DHE) AR'ne bağlanması sonucu ligand bağlı aktif AR'nin sitoplazmadan nükleusa translokasyonu gerçekleşmektedir. Aktif AR, nükleusta androjen cevap elementi (ARE) taşıyan genlerin promotör bölgelerine bağlanarak transkripsiyonel aktiviteyi başlatmaktadır. Prostatın luminal hücrelerinde normal seviyede düzenli olarak eksprese edilen AR'nin neoplastik farklılaşmalarda artış göstererek hücre proliferasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Böylece prostatik neoplazilerde, normal prostat dokusundaki büyüme kontrolü kaybolmaktadır. AR baskın olarak prostatik luminal ve bazal hücrelerde homeostaziye sağlayan ve normal prostat fonksiyonu için önemli görevlere sahip başta PSA gibi proteazlar olmak üzere pek çok hedef genin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Bu genler arasında PSA'yı kodlayan *KLK3* geni ve diğer önemli prostatik serin proteazı kodlayan *TMPRSS2* geni yer almaktadır (Erzurumlu, 2021; Tan ve ark, 2015; Şekil 31).



Şekil 31. Androjen reseptör sinyalizasyon mekanizması (Erzurumlu, 2021)

AR sinyalizasyon bozuklukları, ADT sonrasında mKSPK'nin mKDPK'ne ilerlemesinde etkinliği tanımlanmış en iyi moleküler mekanizmadır. Metastatik KSPK hücrelerinde AR, normal prostatik dokudan farklı olarak etkinliğini artan şekilde devam ettirdiğinden hala hedeflenebilir bir potansiyele sahiptir. Ancak mKDPK hücrelerinde ADT sonrasında edinilmiş dirençle ilişkili olarak AR sinyalizasyonu temelinde farklı moleküler değişimler ortaya çıkmaktadır. Metastatik KDPK'nde AR temelli moleküler değişimler arasında: (i) AR amplifikasyonları, (ii): *de novo* steroid biyosentezindeki artış sonucu ligand artışına bağlı AR aktivite artışı, (iii): ligand spesifitesindeki kayıp ile AR'nin testosteron dışı ligandlar ile de aktive edilebilir şekilde değişimi, (iv): AR geninin ligand bağlanma domaininde ortaya çıkan fonksiyon kazanımı mutasyonları sonucu ligand spesifitesi gözetmeksizin AR'nin aktifleşmesi, (v): alternatif splicing mekanizmaları ile ARV7 gibi ligand bağlanma domaininden yoksun AR varyant proteinlerinin eksprese edilmesi sonucu gelişen sürekli AR aktivasyonu gibi mekanizmalar yer almaktadır (Chan & Dehm, 2014; Rebello ve ark., 2021; Şekil 32). Tüm bu mekanizmalar AR sinyalizasyonunun mKDPK için hala yaşamsal olduğunu göstermekte ancak mKDPK'nın AR aksisinde farmakolojik hedeflenebilirliğini azaltan kötü prognostik faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna rağmen, mKDPK'nde yaşamsal faktörlerin temeli hala AR sinyalizasyonu olduğundan AR hedefli terapiler geliştirilmeye ve iyileştirilmeye devam etmektedir (Rebello ve ark., 2021).



Şekil 32. PK progresyonunda androjen/androjen reseptör bağımlılığı ve KDPK'nde AR sinyalizasyonu temelinde gerçekleşen moleküler değişimler (Rebello ve ark., 2021).

2.6.5.2.1.2. Metastatik kastrasyona dirençli PK (mKDPK) ilişkili diğer moleküler değişimler

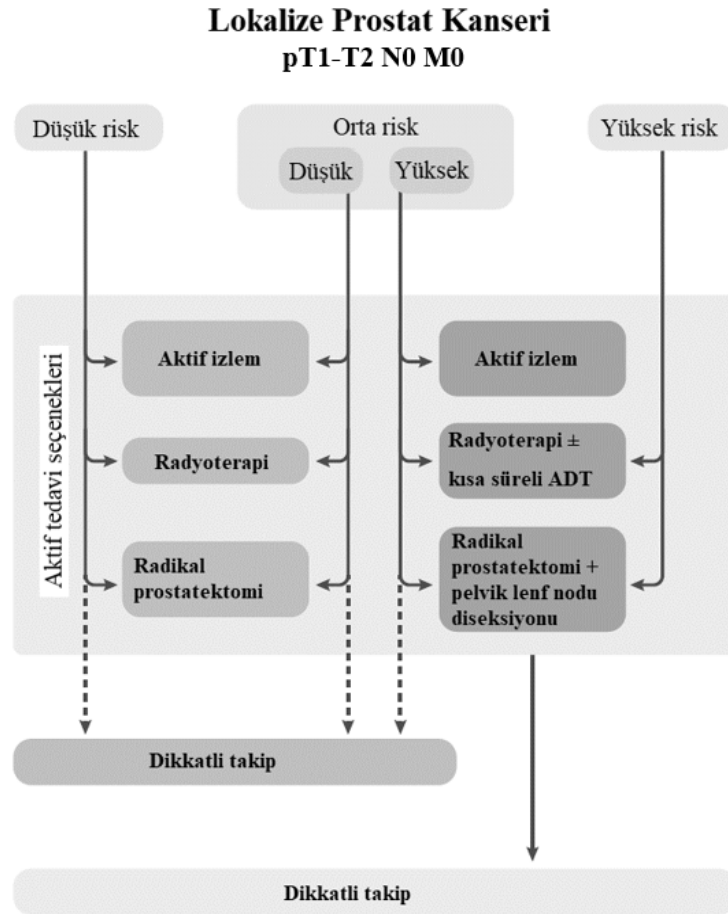
PK'nin lokalize formdan KSPK ve nihayetinde KDPK'ne ilerlemesinde, büyüme kontrolünde görev alan anahtar genler de etkilidir. Örneğin *PTEN* delesyon ve mutasyonları KDPK'lerinde %40 sıklığına ulaşmaktadır. *PTEN* kaybına ek olarak PI3K/AKT/mTOR yolağındaki disregülasyonlar ve aktivite artışı da ileri PK'larda dikkat çekmektedir. Lokalize PK'lerinde baskın olarak rol almayan Wnt sinyal yolağındaki değişimler de KDPK'lerinde belirgin olup, *APC* geni fonksiyon kaybı mutasyonları %9 ve *CTNNB1* geni fonksiyon kazanımı mutasyonları %4 oranında görülmektedir. *c-myc* ve *NKX3-1* geni mutasyonları da ileri PK'lerinde %20-30 sıklığında ortaya çıkmaktadır. Lokalize hastalıkta *p53* ve *Rb1* delesyon/mutasyonları ile kontrolden çıkan genom stabilizasyonunun lokal ileri PK'lerinde ciddi oranda instabil duruma ilerlediği bildirilmektedir. Örneğin mKSPK'lerinde *p53* ve *Rb1* mutasyon sıklıkları sırasıyla %27 ve %5 iken; mKDPK'lerinde bu oranlar sırası ile %50 ve %21'e ulaşmaktadır. Bu progresif onkogenik farklılıklar, PK'lerinde AR sinyalizasyonundan bağımsız olarak nöroendokrin farklılaşma gösteren adenokarsinoma fenotipinin ortaya çıkmasına ve böylece ADT cevabı bulunmayan agresif ve progresif özellikli tümörlerin oluşmasına neden olmaktadır (Cancer Genome Atlas Research Network, 2015; Robinson ve ark., 2015; Stopsack ve ark., 2020).

Son olarak, DNA tamir mekanizmalarında görevli genlerdeki somatik defektlerin de mKDPK'lerinde daha sık gözleendiği belirtilmektedir. Özellikle hastalığın ailesel yatkınlığında da tanımlı olan homolog rekombinasyon ile tamir mekanizmasında görevli *BRCA2* genindeki somatik mutasyonlar mKSPK'da %7 ve mKDPK'lerinde %12.5 oranında görülmekte ve ikinci sıklıkla *ATM* geni mutasyonları mKSPK'lerinde %5 ve mKDPK'lerinde %7 oranında baskın mutasyonlar arasında yer almaktadır (Mateo ve ark., 2020; Stopsack ve ark., 2020). Hastalığın genomik instabilite ile ilerleme gösteren bu formlarında ilgili değişimlerin rollerinin bulunduğu aydınlatılması ile son dönemde mKDPK'lerinde DNA zinciri interkalatörleri, iyonize radyasyon tedavisi ve PARP inhibitörlerinin kullanımı güncel tedaviler arasında yerini almıştır (Rebello ve ark., 2021).

2.6.6. PK tedavisi ve klinik uygulamalar

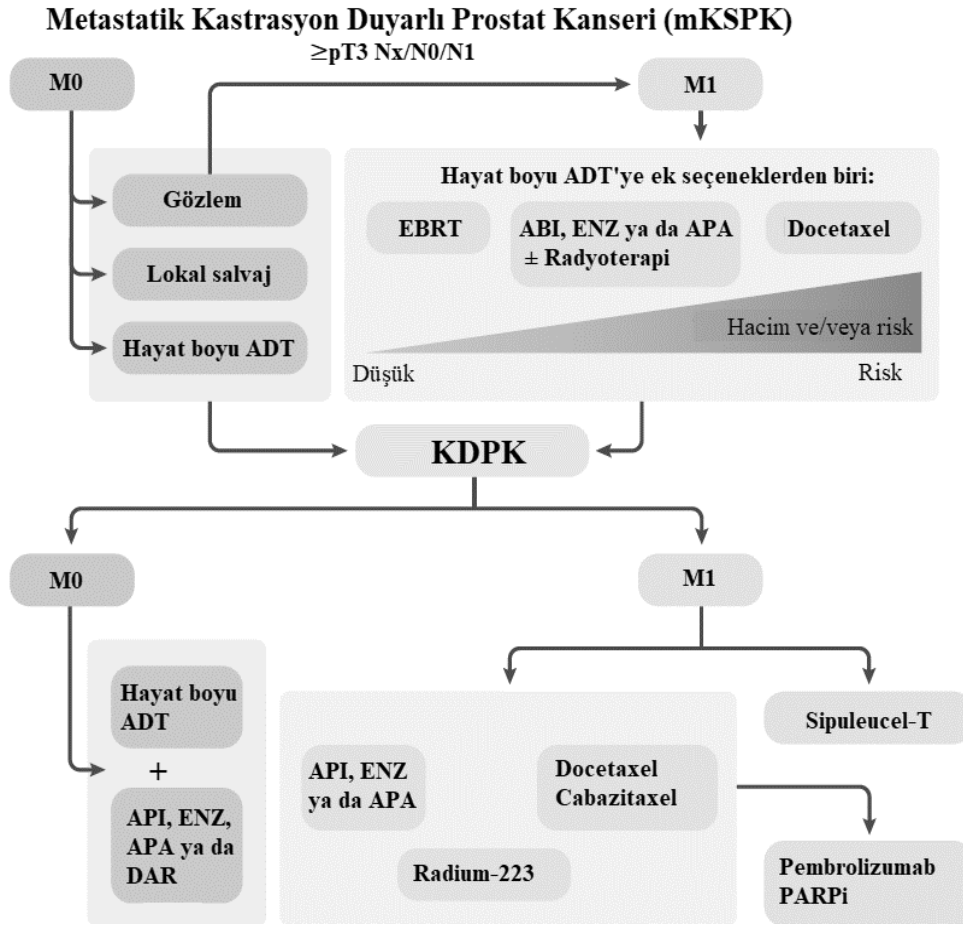
PK'inde erken teşhis kadar lokal ileri PK'lerinin klinik takibi ve tedavisi de hastaların sağ kalımını etkileyen önemli bir faktördür. Son yıllarda PK'lerinin tedavisinde ciddi ölçüde ilerlemeler yaşanmasına rağmen mKDPK tedavisinde başarı şansı hala oldukça sınırlıdır. MKDPK'li hastaların mevcut tedaviler ile 5-yıllık yaşam oranı %35 civarındadır (Rebello ve ark., 2021).

Lokal PK'lerinde küratif amaçlı uygulanan lokal terapiler sağ kalım avantajına sahip olmakla birlikte pek çok hastada kesin tedaviyi mümkün kılan tedavi modalitelerini içermektedir. Hastaların klinikopatolojik özelliklerine uygun olarak belirlenen klinik risk faktörleri (PSA değeri, klinik ve patolojik tümör evresi, Gleason skoru gibi) dikkate alınarak lokal hastalıkta aktif izlem, radyoterapi, cerrahi (radikal prostatektomi ve/veya pelvik lenf nodu diseksiyonu), kısa süreli ADT gibi tedaviler uygulanmaktadır (Kane, Eggener, Shindel & Andriole, 2017; Rebello ve ark., 2021; Şekil 33).



Şekil 33. Lokal PK'lerinde tedavi modaliteleri (Rebello ve ark., 2021)

Tedavi alan lokal PK'li hastaların yaklaşık %35'inde tedavi sonrası PSA seviyesinin artışı ile karakterize biyokimyasal nüks gözlenmektedir. Biyokimyasal nüks sonrası ilerleyen ve henüz tedavi edilmemiş olan PK, genellikle KSPK'i olup bu hastalarda birkaç yıl ADT ile cevap alınabilmektedir. Lokal ileri PK'li hastalarda 5-yıllık yaşam oranı %60-80 arasında değişmektedir. Tedavi seçeneklerini oluşturmada uzak metastaz varlığı (M0/M1) belirleyicidir (Gillissen ve ark., 2020; Şekil 34).



Şekil 34. Lokal ileri PK'lerinde tedavi modaliteleri (Rebello ve ark., 2021)

Metastatik KSPK'nde altın standart terapiler arasında cerrahi (bilateral orşiektomi) ve ADT yer almaktadır. İlk basamak ADT'de LHRH agonistleri kullanılmakta olup tedavi radyografik progresyona kadar devam etmektedir. Bunun yanında uzak metastaz varlığında LHRH agonistlerine ek olarak eksternal beam radyoterapi (EBRT), radyoterapi destekli yeni nesil anti-androjenikler veya AR sinyalizasyon inhibitörleri (ARSI) (ABI:Abirateron, ENZ: Enzalutamide, APA:

Apalutamide) ya da Docetaxel ile taksan bazlı birinci basamak kemoterapi uygulanmaktadır (Şekil 34). Metastatik KSPK hastalarında standart tedavi protokollerine ek olarak pek çok klinik faz çalışmasında (CHAARTED, STAMPEDE, LATITUDE, TITAN trials gibi) erken Docetaxel ya da ARSI kullanımının konvensiyonel ADT etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak kombin ya da sıralı terapilerin mKSPK'li hastalarda progresyonsuz yaşamı arttırdığı bildirilmiştir Cornford ve ark., 2017; Fizazi ve ark., 2017; Kyriakopoulos ve ark., 2018; Rebello ve ark., 2021).

Metastatik KSPK'li hastalarda sistemik terapilerin, standart ADT ve/veya ARSI & taksan kombin tedavilerin kısa dönem sonuçları oldukça iyi olmasına rağmen bir süre sonra hastaların tümünde serum testosteron düzeyini kastrasyon seviyesi indiren tüm yaklaşımlara rağmen PSA artışı ve radyografik progresyon ile karakterize bir klinik tablo ortaya çıkmaktadır. Metastatik KDPK'lerinde yaşam boyu ADT'ye ek olarak yeni taksan bazlı kemoterapötiklerin, ARSI ajanlarının, kemik hedefli ajan Radium-223 kloridin ve terapötik aşılamanın (Sipuleucel T) yaşam süresine üzerine anlamlı katkıları bulunmaktadır (Gillesen ve ark., 2020). Ancak ADT'ye ek hangi ajanın ya da ajanların hangi mKDPK hastalarında daha belirgin olarak fayda sağladığı henüz bilinmemektedir. Docetaxel ile ilk basamak kemoterapi veya ADT öncesi/sonrasında yeni nesil ARSI ajanlarının yaşam süresi üzerine avantajlarını araştıran klinik çalışmalar devam etmektedir.

Kemoterapi temelinde ise, TAX-327 ve SWOG 99-16 klinik çalışmalarında bağışıklık sistemini baskılayan ajan prednisolone ile Docetaxel'in mitoksantron & prednisolone kombinasyonuna göre üstünlüğü ile Docetaxel & Estramustine kombin etkinliğinin mitoksantrona göre üstünlüğü belirlendikten sonra mKDPK'li hastalarda ilk basamak standart kemoterapide Docetaxel kullanılmaya başlanmıştır (Petrylak; 2006; Tannock ve ark., 2004). Sonraki yıllarda Docetaxel başarısızlığında kullanılmak üzere yeni nesil taksan türevleri üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir ve TROPIC klinik faz çalışması ile Cabazitaxel'in Docetaxel-dirençli mKDPK'li hastalarda yaşam süresine sağladığı avantaj ortaya koyulmuştur (Oudard, 2011). Cabazitaxel, Docetaxel ile ilk basamak kemoterapiye ve ikinci nesil anti-androjeniklere dirençli mKDPK tedavisinde kullanılmak üzere onay alan son taksan türevidir. Son olarak yeni nesil immüterapi ajanı Pembrolizumab ve *BRCA2*-mutasyonlu mKDPK hastalarında

PARPi (Olaparib) güncel tedavi protokolleri arasında yerini almıştır (Antonarakis ve ark., 2020; Mateo ve ark., 2020). Bu gelişmelere rağmen mKDPK'li hastaların tedavisinde edinilen terapi direnci nedeniyle klinik zorluklar hala devam etmektedir (Leslie ve ark., 2021; Rebello ve ark., 2021).

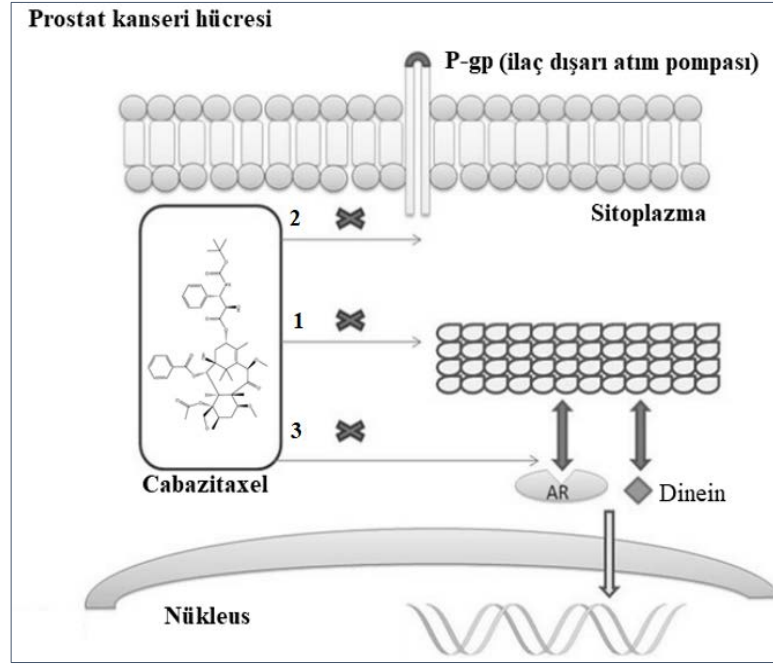
Yaşamsal avantajlarına rağmen mKDPK tedavi protokollerinin hastaların yaşam kalitesini bozan toksik yan etkileri de bulunmaktadır. Cerrahi tedavilerde sıklıkla erektil disfonksiyon ve üriner inkontinans; radyoterapide bağırsak irritabilitesi ve/veya dışkıda mukus veya kan, ishal, üriner irritabilite ve/veya aciliyet, hematüri ve üriner retansiyon, ikincil malignite gelişme riski; özellikle AR sinyalizasyonu hedefli tedavilerde bilişsel işlev bozukluğu, nöbetler, ateş basması, yorgunluk, hipokalemi, ödem, artiyal hipertansiyon, karaciğer fonksiyon artışı, kardiyovasküler olaylar; taksan bazlı kemoterapide (Docetaxel ve Cabazitaxel) miyelosupresyon (nötropeni, trombositopeni ve/veya anemi), nötropenik ateş, ishal, duyuşsal polinöropati, mide bulantısı ve/veya kusma, ödem, alopesi, döküntü, yorgunluk, asteni, alerjik reaksiyonlar gibi yan etkiler bildirilmektedir (Rebello ve ark., 2021). Uzun süreli tedavilerde ise yan etkilerin pek çoğu kronikleşmektedir. Bu durum hem tedavi sürekliliğini sınırlamakta hem de tedavi başarısını azaltmaktadır. Ek olarak, metastatik KDPK'li hastaların neredeyse %80'i 75 yaş üzerinde olduğundan yaşa bağlı artış gösteren yan etkiler de hastaların tedavi protokollerindeki başarı oranını düşürmektedir. Bu nedenle mKDPK'nde kullanılmak üzere minimal toksik etkili kanser spesifitesi yüksek yeni ajanların geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

2.6.6.1. Cabazitaxel

Cabazitaxel, ilk basamak kemoterapide Docetaxel ile tedavi edilen veya AR hedefli anti-androjenikler ile kombin hormon terapi alan ancak terapi yanıtı bulunmayan mKDPK hastalarında kullanılmak üzere ek sağkalım avantajı sağlayabilen ve FDA onayı bulunan ikinci nesil yarı sentetik taksan türevidir (de Bono ve ark., 2010; Nightingale & Ryu, 2012).

Taksanlar, *Taxus* cinsi bitkilerden elde edilen doğal diterpenoid bileşikleri olup, pek çok kanserin tedavisinde kullanılan Paclitaxel ile özellikle metastatik PK tedavisinde kullanılan Docetaxel ve Cabazitaxel'den oluşmaktadır. Cabazitaxel yarı sentetik bir mikrotübül inhibitörü olarak hücre döngüsü sırasında mikrotübül stabilizasyonu sağlayarak döngüyü G2/M evresinde duraklatmakta ve iç apoptotik

yolağı aktive etmektedir. Cabazitaxel'in mikrotübül ilişkili etki mekanizması diğer taksan türevleri olan Paclitaxel ve Docetaxel'e benzerlik göstermektedir (Fitzpatrick & de Wit, 2014).



Şekil 35. Cabazitaxel'in PK hücresindeki etki mekanizmaları (Tsao, Cutting, Martin & Oh, 2014)

Mikrotübüller, hücre şeklinin korunmasında, vezikül taşınmasında, hücre sinyalizasyonunda ve hücre bölünmesinde anahtar rolü olan α -tubulin ve β -tubulin heterodimerlerinden oluşan hücre iskeleti polimerleridir. Cabazitaxel, β -tubulin alt biriminin N-terminal amino asitlerini bağlayarak mikrotübül polimerizasyonunu desteklemektedir. Böylece depolimerizasyon önlenerek mikrotübül dinamiği bozulmakta ve hücre döngüsünde mikrotübül kontrollü süreçler inhibe edilmektedir (Nightingale & Ryu, 2012; Şekil 35).

Cabazitaxel, diğer taksan türevleri ile benzer fonksiyonu paylaşmasına rağmen, ilacın yapısı ve farmakolojisi belirgin şekilde farklılık göstermektedir. Cabazitaxel'in moleküler yapısı, hidroksil gruplarının metoksi yan zincirleri ile değiştirildiği bölgede Paclitaxel ve Docetaxel'in kimyasal yapısına göre farklılıklara sahiptir. Bu bölgedeki ekstra metil grupları, *ABCB* tarafından kodlanan adenosin-5'-trifosfata (ATP)-bağımlı

akış pompasını (P-glikoprotein, P-gp) devre dışı bırakarak taksanlara karşı gelişen edinilmiş bir direnç mekanizmasını ortadan kaldırmaktadır (Tsao ve ark., 2014; Şekil 35). Paclitaxel ve Docetaxel'in P-gp afiniteleri oldukça yüksek olduğundan kanser hücrelerinde artan P-gp düzeyi ve aktivasyonu, ilk nesil taksan türevleri için bilinen direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır. Bu nedenle P-gp substratı olmayan bir taksan türevinin sentezlenmesi için ciddi ölçüde çaba sarfedilmiştir. P-gp'ye düşük afinite gösteren Cabazitaxel, hücrede P-gp etkilerine karşı duyarlı olmadığından kanbeyin bariyerini geçebilir özelliktedir ve bu nedenle hem merkezi sinir sistemi metastazlarında hem de kemik metastazlarında etkinliği bulunmaktadır (Fitzpatrick & de Wit, 2014). Cabazitaxel, Docetaxel terapisi almış mKDPK'lı hastalarda kullanım onayı almış bir ilaç olmasına rağmen yeni klinik çalışmalar, yeni nesil anti-androjenik tedavilerinden sonra da Cabazitaxel'in kullanılabilmesine işaret etmektedir (Barqawi ve ark., 2019).

Taksan türevlerinin mikrotübül ilişkili fonksiyonlarına ek olarak PK'lerinde AR sinyalizasyonunu düzenleyici rollerinin de bulunduğu ortaya koyulmuştur. Paclitaxel ve Docetaxel'in PK hücrelerinde AR ekspresyonunu, AR transkripsiyonel aktivitesini ve nükleer birikimini azalttığı gösterilmiştir (Gan ve ark., 2009; Martin & Kyprianou, 2015). Cabazitaxel'in AR sinyalizasyonu üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların sonuçları ise diğer taksan türevlerinden farklı olarak ilacın AR aksisindeki etkinliğinin düşük olduğunu ve taksanlar içerisindeki üstün etkinliğinin AR-bağımsız mekanizmalar ile sağlandığını ortaya koymaktadır (van Soest ve ark., 2015). Cabazitaxel'in metastatik hormona duyarlı AR pozitif PK hücre hattı LNCaP'da AR ve AR-ilişkili ısı şok faktörleri HSP90 α , HSP40 ve HSP70/HSP90'nın ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, mevcut etki ileri evre tümörlerde Docetaxel ile karşılaştırıldığında daha düşük düzeydedir (Rottach ve ark., 2019; van Soest ve ark., 2015). Cabazitaxel, AR ekspresyon seviyesinde azalmaya neden olmasına rağmen, Cabazitaxel uygulaması sonrasında AR nükleer birikiminde daha fazla artış gözlenmektedir (Martin & Kyprianou, 2015; van Soest ve ark., 2015). Gerçekleştirilen klinik çalışmalarda da anti-androjenik ilaç (Enzalutamide) dirençli-duyarlı hastalarda Cabazitaxel etkinliğinde anlamlı bir fark bulunmaması ve *in vitro* deneylerde bulguların desteklenmesi Cabazitaxel'in direkt olarak AR ilişkili etkilerinin düşük olduğunu

doğrulmaktadır. Enzalutamide ve Docetaxel çapraz direnci *in vivo* çalışmalarda AR-ilişkili mekanizma üzerinden açıklanabilirken, Cabazitaxel'in Enzalutamide dirençli hücrelerde AR-bağımsız etkinliğini sürdürmesi ilacın AR-ilişkili direnç mekanizmalarından etkilenmediğini düşündürmektedir (Al Nakouzi ve ark., 2015).

Cabazitaxel, mKDPK'li hastalarının sağ kalım sürelerinde anlamlı avantaja sahip bir ilaç olmasına rağmen, Cabazitaxel kullanımı sonrasında kanser hücrelerinde gelişen direnç mekanizmaları mKDPK tedavisinde sınırlamalara neden olmaktadır (Duran ve ark., 2015). Cabazitaxel, kimyasal yapısı nedeni ile detaylandırılan mekanizmalarda açıklandığı gibi kanser hücrelerinde P-gp aktivasyonu ve AR-ilişkili edinilmiş direnç mekanizmalarından etkilenmemektedir. Ancak progresif özellikte farklı moleküler mekanizmalar Cabazitaxel etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. Son yıllarda bildirilen iyi tanımlanmış Cabazitaxel direnç mekanizmaları arasında onkogenik proliferatif yollarda aktivite artışı (PI3K/Akt/mTOR aktivasyonu ve MAPK/ERK aktivasyonu), β -tubulin gen mutasyonları, mikrotübül dinamiklerindeki değişimler, tubulin beta sınıf III (*TUBB3*) yüksek ekspresyonu, *BRCA1* düşük ekspresyonu ve EMT aktivasyonu gibi mekanizmalar yer almaktadır (Duran ve ark., 2015; Kroon, Kooijman, Cho, Storm & van der Pluijm, 2016). Alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmakla birlikte Cabazitaxel güncel PK tedavisinde yaygın klinik kullanıma sahiptir.

Mevcut tez çalışmasında ilk nesil taksan Docetaxel ve AR hedefli anti-androjeniklerin kullanımı ile oluşturulan kombinasyonlu hormon terapilere direnç gösteren mKDPK hastalarının kemoterapisinde son seçenek olarak onaylanan taksan türevi Cabazitaxel'in seçici prooksidan etkileri ve PK'nde redoks adaptasyonu üzerine etkileri ilk kez belirlenerek, ilacın potansiyel sitotoksik ve prooksidan etkileri, Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile oluşturulan prooksidan kanser terapi modelinin ilgili süreçlerdeki etkinlikleri ile karşılaştırılmıştır.

Taksan grubunda yer alan Paclitaxel ve Docetaxel'in kanser hücrelerinde endojen ROS artışına neden oldukları ve böylece prooksidan etkiye sahip yapıdaki kemoterapötikler arasında yer aldıkları bilinmektedir (Conklin, 2004; Yang ve ark., 2018). Ancak bu ilaçlar kanser hücrelerinde klasik taksan fonksiyonlarını gerçekleştirebildikleri konsantrasyonlarda seçici sitotoksik ve prooksidan etkileri düşük olduğundan hücre ölümünü seçici olmayan şekilde aktive etmekte ve böylece

kanser hücrelerinin yanısıra sağlıklı hücrelerde de toksik düzeyde etki göstermektedir (Conklin, 2004). Ayrıca kanser hücrelerinde taksanların neden olduğu ROS artışı, taksan kaynaklı hücre ölümünün yanısıra ilaç direnci mekanizmalarını da etkileyebilmektedir (Kosaka, Hongo, Miyazaki, Nishimoto, Miyajima & Oya, 2017). Literatürde Cabazitaxel'in PK hücrelerinde endojen ROS artışına etkilerini ve mekanizmalarını araştıran tek çalışmada Docetaxel dirençli C4-2AT6 PK hücre hatlarında ilacın Docetaxel'e göre daha fazla endojen ROS artışını uyardığı ve Cabazitaxel'in prooksidan etki mekanizmasının mKDPK hücrelerinde stres ile indüklenen sestrin protein ailesine üye Sestrin-3 (SESN3) inhibisyonu aracılı gerçekleştiği rapor edilmiştir (Kosaka ve ark., 2017). Ancak Cabazitaxel'in kanser hücrelerinde SESN3 inhibisyonu ile ROS eliminasyonunu baskılamasının kanser hücrelerine spesifik bir etki mekanizması olup olmadığı, Cabazitaxel'in seçici prooksidan etkileri ile kanser hücrelerinde redoks adaptasyon mekanizması üzerine etkileri henüz bilinmemektedir.

2.6.7. PK'nde redoks adaptasyonunun kanser progresyonuna ve agresifliğine etkileri

Kanserde redoks adaptasyonu, özellikle ileri evre kanserlerde tümör uyarıcı inflamasyon artışı ve mikroçevre ile kanser hücreleri arasındaki iletişimin kanser hücresi lehine sürdürülmesini sağlayan bir mekanizma olarak, erken evrede sadece kanser hücresini ilgilendiren bir süreçken, geç evrede anjiyogenez, invazyon ve metastatik potansiyeli uyararak progresif roller üstlenen önemli bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. İlmli ROS düzeyinin hormona duyarlı ve lokalize PK hücrelerinde ROS'a bağımlı oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarının gerçekleştirilebilmesi için elzem olduğu ve kanser hücresinin yaşamı için gerekli diğer bazı sinyalizasyonlarda tümörojenik düzeyde ROS'un görev aldığı belirtilmiştir (Han ve ark., 2020). PK'nde redoks adaptasyonu üzerine gerçekleştirilen klinik çalışmalar incelendiğinde ise prostatik adenokarsinomaların klinik sessiz formdan klinik önemli forma geçişini takiben ADT uygulanmaya başlaması ile kanserli dokuda endojen ROS üretiminin artış gösterdiği, kanser hücrelerinde redoks sinyalizasyon ağlarının amplifiye olduğu ve bu süreçlerin KDPK hücrelerinin yaşamsal avantaj kazanmasına ve PK'ni oluşturan hücre popülasyonu içerisinde seçimlerine katkı sağladığı bildirilmektedir (Mondal, Narwani, Notta, Ghaffar, Mardhekar & Quadri, 2021). Bu

süreçler, PK'nde ADT sonrası gelişen/ilerleyen redoks adaptasyonunun hastalığın mKDPK progresyonuna katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada ise ilk kez çeşitli evrelerde olan farklı agresif özelliklere sahip PK hücre hatları ve sağlıklı prostatik epitel hücreleri endojen oksidatif stres düzeyleri açısından karşılaştırılmış ve hücrelerin malignite ilişkili agresif özelliklerinin endojen ROS ve oksidatif stres artışı ile uyum gösterdiği tespit edilmiştir (Freitas, Baldeiras, Proença, Alves, Mota-Pinto & Sarmiento-Ribeiro, 2012; Kumar, Koul, Khandrika, Meacham & Koul, 2008). Cabazitaxel direnç mekanizmalarının araştırıldığı yeni bir çalışmada ise PK hücrelerinde artmış aktivite gösteren Nrf2 sinyalizasyonunun Cabazitaxel duyarlılığının artırılmasında bir hedef olarak baskılanabilirliği gösterilmiştir (Endo ve ark., 2021). Bu veriler ışığında mevcut tez çalışmasında redoks adaptasyonu ile ilişkili olarak farklı fenotipleri yansıtacakları düşünülerek bir prostat normal epitel hücre hattı, bir metastatik hormona duyarlı PK hücre hattı, metastatik hormona duyarlı PK hücre hattının hidrojen peroksit dirençli redoks adapte modeli ve bir metastatik KDPK hücre hattı kullanılmıştır.

2.6.8. Apigenin ve PEITC'in AR aksisinde PK spesifik etki mekanizmaları

Apigeninin anti-androjenik etkilerini inceleyen tek çalışmada, daha önce çeşitli kanser türlerinde de ortaya koyulan pro-apoptotik aktiviteyi uyarıcı ve hücre döngüsünü inhibe edici sitotoksik moleküler etki mekanizmalarına ek olarak, insan metastatik PK hücre hattı LNCaP'da doza ve zamana bağlı AR protein düzeyini ve hem eksprese edilen hem de sekrete edilen PSA miktarını azalttığı belirlenmiştir (Gupta, Afaq & Mukhtar, 2002). Mevcut veri, Apigeninin bir prooksidan kemoterapötik aday olarak kullanılabilirliğine PK özelinde ek katkılar sunmaktadır. PEITC'in PK'ndeki anti-androjenik etkileri incelendiğinde ise ajanın tek başına hem hormona duyarlı hem de hormona duyarsız AR (+) PK hücrelerinde AR mRNA ve protein seviyesini azalttığı, AR koregülatörünü inhibe ettiği ve PSA salgısını azalttığı gösterilmiştir (Yu, Gong, Chen, Solelo Leon, Young & Chen, 2013; Wang, Liu & Chiao, 2006). Mevcut tez çalışması kapsamında ise Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile ilk kez oluşturulan *in vitro* prooksidan kombin terapi modelinin farklı fenotiplerdeki AR (+) PK hücrelerinde prooksidan yönde etkilerinin analiz edildiği konsantrasyonlarda, olası sinerjistik anti-androjenik etkilerinin de ilk kez birlikte değerlendirilmesi planlanmıştır.

2.7. Tez çalışmasının amacı

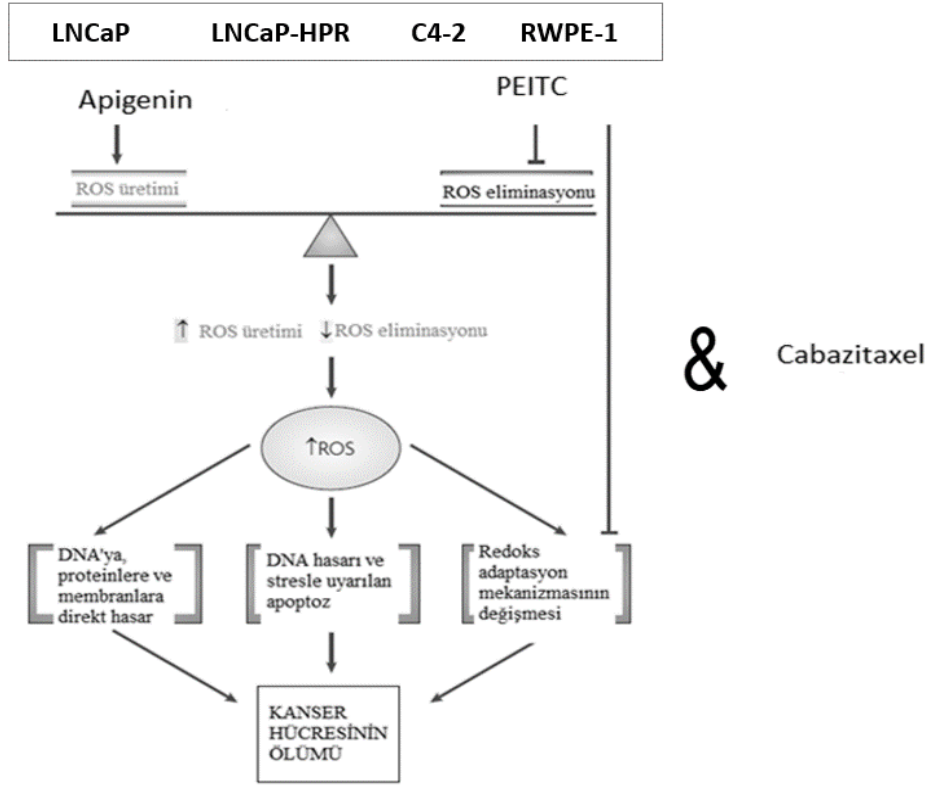
Mevcut tez çalışmasının amacı, doğal bileşiklerin (Apigenin ve PEITC) kombinasyonu ile oluşturulan ve arttırılmış prooksidan etkileri öngörülen *in vitro* terapi modeli etkinliğinin/kullanılabilirliğinin/hedeflerinin farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücre hatlarında hedef moleküler mekanizmalar araştırılarak belirlenmesi ve belirlenen *in vitro* terapi etkinliğinin mKDPK kemoterapisinde kullanılan Cabazitaxel monoterapi etkinliği ile karşılaştırılmasıdır.

Bu kapsamda tez çalışmasının ana materyalini farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücre hatları oluşturmaktadır. (i): LNCaP insan PK hücre hattı: AR (+) hormona duyarlı metastatik PK hücre hattıdır. (ii) LNCaP-HPR hücre hattı: Tez çalışması kapsamında LNCaP hücre hattında hidrojen peroksit direnci oluşturulması ile elde edilen ve yedi farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilen direnç validasyonları ile redoks adapte fenotipi yansıttığı belirlenen metastatik AR (+) PK hücre hattıdır. (iii): C4-2 insan mKDPK hücre hattı: AR (+) metastatik kastrasyona dirençli PK hücre hattıdır. (iv): RWPE-1: İnsan sağlıklı prostat epitel hücre hattıdır.

PK'nin redoks adaptasyonu ve PK agresifliği ile ilgili olarak dört farklı fenotipini yansıtan bu hücre hatlarında Apigenin, Apigenin + PEITC ve Cabazitaxel'in;

Hücre canlılığı ve sağlığı üzerine etkileri belirlenerek seçici oldukları ve olası prooksidan etkilerinin belirlenmesi için optimum konsantrasyon ve zaman dilimlerinin tespiti/validasyonu amacıyla farklı konsantrasyon ve zaman aralıklarında hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve hücre döngüsü analizleri gerçekleştirilmiştir. En etkin oldukları saptanan konsantrasyonlarda ve zaman dilimlerinde ajanların ve kombinasyonun, genel prooksidan etkileri ve ilişkili hücre sağlığı üzerine etkileri sırası ile akış sitometrik endojen oksidatif stres analizi, floresan mikroskopik ROS analizleri, total GSH miktarının tespiti ve mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi ile incelenmiştir. Kanser hücrelerinde redoks adaptasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörleri (*Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α*), majör antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan genler (*SOD*, *CAT* ve *GR*) ile PK-ilişkili *AR* ve *PSA*'nın mRNA seviyeleri üzerine etkileri gerçek zamanlı kantitatif PCR ile tespit edilmiştir. Redoks adaptasyonunu sağlayan aktif transkripsiyon faktörlerinin (p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α) ve PK-ilişkili *AR* ve *PSA*'nın Western Blot ile protein düzeyinde ekspresyon analizleri

gerçekleştirilmiş; immüno floresan analiz ile de proteinlerin hem ekspresyon değişimleri hem de subsellüler lokalizasyonlarındaki değişimler incelenmiştir. Tez çalışmasının sıralı hedefler doğrultusundaki amacı Şekil 36’da şematize edilmiştir.



Şekil 36. Tez çalışmasının sıralı hedefleri doğrultusundaki amacı ve şematize hali

Mevcut tez çalışmasında (i): PK için ilk kez redoks adaptasyonuna sahip bir *in vitro* metastatik kanser hücre hattı (LNCaP-HPR) geliştirilmiştir. Bu hücre modeli, PK'lerinde redoks adaptasyonunun moleküler mekanizmalarının bir kısmının aydınlatılabildiği bir model olup, ileriki çalışmalarda redoks adaptasyon mekanizmaları üzerinde daha geniş çalışmaların planlanabileceği potansiyel bir seçenek oluşturmaktadır. Ek olarak PK için geliştirilen/iyileştirilen tüm tedavilerde redoks adaptasyonunun terapi yanıtına etkisi bu model üzerinde incelenebilecektir. (ii): LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında redoks manipülasyonlarını hedef alan bir terapi modeli sonrasında redoks adaptasyon mekanizmalarının değişimi açısından farklılıklar ilk kez belirlenmiştir (iii): LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarının klasik Cabazitaxel monoterapisine karşı duyarlılıkları moleküler düzeyde karşılaştırılmış ve PK'nde gelişen redoks adaptasyonunun Cabazitaxel yanıtı üzerine etkisi ve bu sürecin

ilacın etkinliği ile olan ilişkisi ilk kez belirlenmiştir. (iv): Apigeninin PK'nde redoks adaptasyon mekanizmaları üzerine etkileri ilk kez incelenmiştir. Tez alışması kapsamında dört farklı fenotipte *in vitro* PK hücre modeli kullanıldığından mevcut verilerin bu bileşiğin de curcumin, quersetin ve epigallokateşin gallat gibi klinik faz aşamasındaki flavonoid türleri arasına girebilme potansiyelini yükseltecek olan preklinik çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. (v): Herhangi bir kanser türü için direkt olarak hücre içi oksidatif stres ve total antioksidan kapasiteyi hedef alan (redoks manipülasyonu sağlayan) bitkisel bazlı (Apigenin + PEITC) bir *in vitro* kombin terapi modeli ilk kez oluşturulmuş ve modelin etkinliği kanser hücreleri ile normal epitel hücrelerinde ilk kez birlikte değerlendirilmiştir. Bu nedenle elde edilen veriler kombin modelin hedef olarak kanser seçici etkilerini de ortaya koymuştur. Oluşturulan modelde PEITC'in GSH depleksiyonunu sağlayıcı etkileri bilindiğinden potansiyel olarak Apigeninin prooksidan etkilerini arttırabileceği ve kanser spesifitesi yüksek olan bu doğal ITC türevinin kurgu kapsamında oluşturulan kombin model için ideal bir aday olabileceği öngörülmüştür. (vi): Apigenin ve PEITC kombinasyonunun PK'nde anti-androjenik etkileri ilk kez birlikte değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerin tek başlarına PK'nde anti-androjenik etkileri olduğu bilinmesine rağmen sinerjistik anti-androjenik etkinin belirlenmesi ajanların PK'nde birlikte kullanılabilirliğinin daha efektif olduğunu gösterecektir. Sıralı maddelerde açıklanan süreçler tez çalışmasının özgünlüğünü ortaya koymakta olup, elde edilen verilerin güncel literatüre katkı potansiyelini yansıtılmaktadır. Ayrıca tez çalışmasından elde edilen bulgular ile Apigenin ve PEITC bazlı prooksidan kombin terapi modelinin stres adaptasyonu artmış olan agresif fenotipteki PK hücrelerinde klasik kemoterapiye göre toksik yan etkiler açısından daha üstün ve etkin olarak kullanılabilirliğinin gösterilmesi, KDPK tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilecek yeni prooksidan kanser terapi stratejilerine işik tutacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Laboratuvar donanımı ve cihazlar

- 152°C yatay tip derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- 86°C dikey tip ultra derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- 20°C dikey tip derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- 20°C yatay tip derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- +2°C - +8°C buzdolabı (Alaska, Türkiye)
- +2°C - +8°C dik tip şişe soğutucu (AsTerm, Türkiye)
- CO₂ inkübatör (Panasonic, Japonya)
- Class II biyogüvenlik kabini (Laminar flow) (ScanLaf, Labogene, Danimarka)
- Inverted ışık mikroskobu (Euromex, Hollanda)
- Muse[®] Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- EVOS FLoid-FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Etüv (Ecocell, Siemens, Almanya)
- Santrifüj (NF 800R, Nüve, Türkiye)
- Şarjlı pipetör (Axygen MotoPet, Canadawide Scientific, Kanada)
- Mikropipet seti (Axygen, ABD)
- Çok kanallı pipet (Accumax, Hindistan)
- Mikropor şırınga filtresi (0.22 µM) (Merck Millipore, Almanya)
- Stericup[®] filter units PVDF kapaklı (Merck Millipore, Almanya)
- Cell scraper small (Corning, ABD)
- Sterile 13mm diameter coverslips (Sarstedt, Almanya)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Microfuge 20R, Beckman Coulter, ABD)
- Vorteks (VELP Scientifica, İtalya)
- Orbital çalkalayıcı (Clever Scientific, Birleşik Krallık)
- Manyetik ısıtmalı karıştırıcı (Clever Scientific, Birleşik Krallık)
- Mini rotatör (Biosan, Letonya)
- Combi-spin & vorteks (Biosan, Letonya)
- Hassas terazi (Radwag, ABD)
- Buz makinesi (Scotsman, ABD)

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

3.1.2. Kimyasallar ve sarf malzemeler

Insulin (Sigma-Aldrich, Almanya)
Sodyum Hidrojen Karbonat (Sigma-Aldrich, Almanya)
3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (Sigma-Aldrich, Almanya)
Apo-Transferrin Human (Sigma-Aldrich, Almanya)
Biotin (Sigma-Aldrich, Almanya)
Adenine Hidroklorid Hidrat (Sigma-Aldrich, Almanya)
Dimetil sülfoksit (DMSO) (VWR International, ABD)
Kloroform (Merck, Almanya)
Izopropanol (Merck, Almanya)
Etanol (Isolab, Almanya)
Metanol (Merck, Almanya)
Paraformaldehit (Merck, Almanya)
2-Merkaptoetanol (Merck, Almanya)
Tris Base, Molecular Biology Grade (Merck, Almanya)
Hidroklorik asit (HCl) 30% (Sigma-Aldrich, Almanya)
Hidrojen peroksit solüsyonu %30 (w/w) H₂O (Sigma-Aldrich, Almanya)
Triton X-100 (VWR International, ABD)
Tripin Blue solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, ABD)
MycoProbe Mycoplasma Detection Kit (R&D Systems, ABD)
Hoechst 33258 (Merck, Almanya)
Pierce™ 16% Formaldehyde (w/v), Methanol-free (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Cabazitaxel %99.87 (S3022, Selleck Chemicals, ABD)

Apigenin %99.07 (S2262, Selleck Chemicals, ABD)
Fenetil izotiyosiyanat (PEITC) %99 (Merck, Almanya)
F-12 Nutrient Mixture (Ham's) (Biological Industries, ABD)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-low glucose with L-glutamine (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-high glucose with L-glutamine (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium with L-glutamine (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Keratinocyte serum-free medium (1X) kit (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X (Capricorn Scientific, Almanya)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum (CS FBS) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Antibiyotik/Antimikotik solüsyonu (100x) (Capricorn Scientific, Almanya)
Sodyum pirüvat (100 mM) (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
Cell Proliferation Colorimetric Reagent, WST-1 (BioVision, ABD)
Muse® Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya)
Muse® Cell Cycle Kit (Merck Millipore, Almanya)
Muse® Oxidative Stress Kit (Merck Millipore, Almanya)
Muse® Mitopotential Assay Kit (Merck Millipore, Almanya)
Invitrogen™ CM-H2DCFDA 20x50µg (General Oxidative Stress Indicator) (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Dihydroethidium (Hydroethidine) 10x1mg (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Glutathione Colorimetric Assay Kit (BioVision, ABD)
E.Z.N.A.® Blood RNA Kit (Omega Bio-tek, ABD)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, ABD)
TaqMan® Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Boster Bio, ABD)
Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Abcam, Birleşik Krallık)

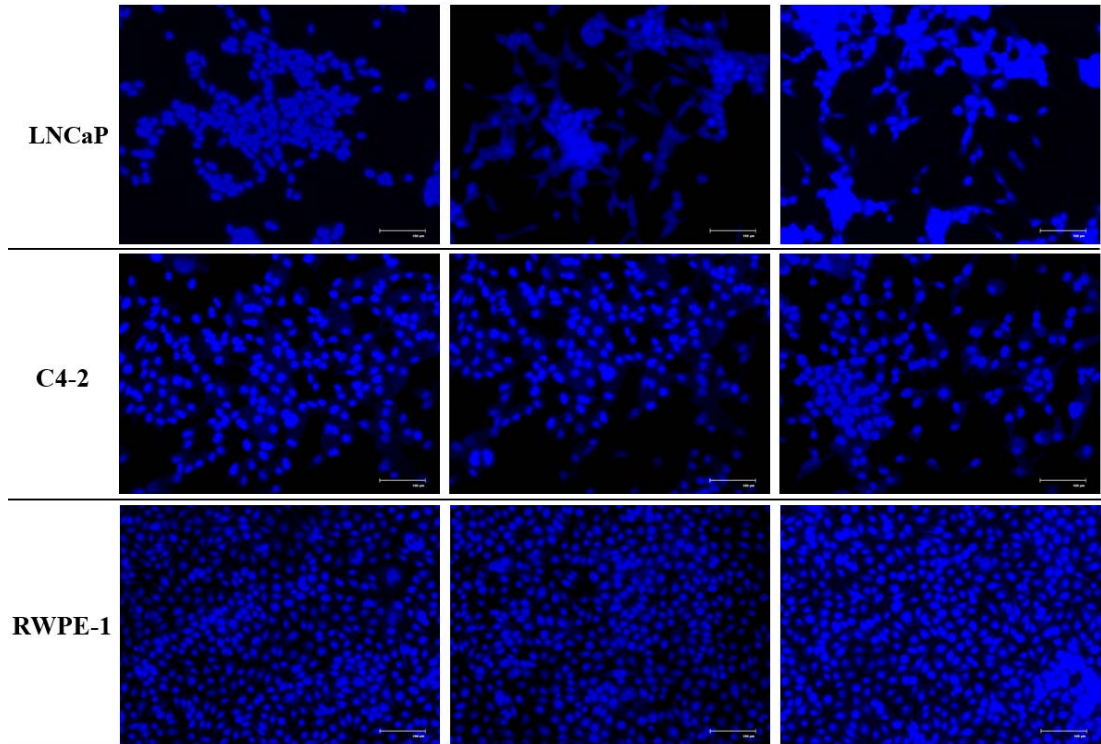
EZBlock™ Universal Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (BioVision, ABD)
Qubit™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Precast Gels (Bio-Rad, ABD)
2X Reducing Protein Loading Buffer (Advansta, ABD)
Prestained Protein Ladder (5-245 kDa) (Abcam, Birleşik Krallık)
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0.45µm (Bio-Rad, ABD)
10X Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad, ABD)
10X Tris/Glycine Buffer (Bio-Rad, ABD)
Ponceau S solüsyonu (Sigma-Aldrich, Almanya)
Nonfat dry milk (Cell Signaling Technology, ABD)
Tris Buffered Saline with Tween 20, 20X (Santa Cruz Biotechnology, ABD)
Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich, Almanya)
SuperSignal™ Western Blot Enhancer (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Normal Goat Serum (Abcam, Birleşik Krallık)
Fluoroshield Mounting Medium with DAPI (Abcam, Birleşik Krallık)
Androjen Reseptör (AR), Prostat Spesifik Antijen (PSA) ve Histon H3 Rabbit
Monoklonal Primer Antikorları (Cell Signaling Technology, ABD)
Nüklear faktör-κB p65 (p-p65 NF-κB) fosfo S536 rabbit poliklonal, hipoksi ile
uyarılan faktör-α (Hif-α) rabbit monoklonal, nüklear faktör eritroid 2p45-ilişkili faktör
2 fosfo S40 (p-Nrf2) rabbit monoklonal ve Aktin-β rabbit poliklonal Primer
Antikorları (Abcam, Birleşik Krallık)
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)-konjuge sekonder antikor (Abcam, Birleşik
Krallık)
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) poliklonal sekonder antikor (Abcam,
Birleşik Krallık)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. Kullanılan hücre hatları

Androjen reseptör (AR) pozitif hormon duyarlı insan metastatik prostat karsinoma hücre hattı LNCaP (CRL-1740™) ve prostat normal epitel hücre hattı RWPE-1 (CRL-11609™) uygun taşıma koşullarında American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edildi. LNCaP'dan köken alan androjen reseptör (AR) pozitif kastrasyon dirençli prostat kanseri hücre hattı C4-2 ise Bern Üniversitesi Translasyonel Androloji & Üroloji Bölümü'nde görev yapan Prof. Dr. George Thalmann tarafından Texas Üniversitesi M.D. Anderson Cancer Centre'dan ücretsiz olarak sağlandı. Hücre hattı stokları kültür aşamasına kadar -152°C'de saklandı. Tüm hücre hatları 10 günlük kültür sonrasında Hoechst boyama gerçekleştirilerek (Şekil 37) ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda MycoProbe Mycoplasma Detection Kiti kullanılarak mikoplazma kontaminasyonu açısından kontrol edildi (Şekil 38).



Şekil 37. Tez kapsamında kullanılan hücre hatlarının mikoplazma kontaminasyonu açısından negatif olduğunu gösteren 10 günlük kültür sonrasındaki Hoechst boyama görüntüleri



Şekil 38. Tez kapsamında kullanılan hücre hatlarının mikoplazma kontaminasyonu açısından negatif olduğunu gösteren test kiti sonuçları

3.2.1.2. Hücre stoklarının açılması

-152°C’de saklanan dondurulmuş hücre stokları 37°C’de sıvı hale getirildikten sonra steril koşullarda 15 ml’lik falkon tüpe aktarıldı ve 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj (Microfuge 20R, Beckman Coulter, ABD) edildi. Hücre pelletleri üzerine her bir hücre hattı için uygun olan besiyeri eklenerek süspanse edildi. Süspanse hücreler 5 ml taze besiyeri içeren 25 cm²’lik filtreli hücre kültürü flasklarına aktarıldı. Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ile desteklenen nemli inkübatör içerisinde steril ortamda kültüre edildi.

3.2.1.3. Hücre kültürü koşulları

3.2.1.3.1. LNCaP hücre kültürü

LNCaP hücre hattı, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodyum pirüvat, %10 FBS, 100 µg/ml Streptomisin, 100 U/ml Penisilin ve 2.5 µg/ml Amphoterasin B içeren RPMI-1640 besiyerinde kültüre edildi. Her 4-7 günde bir besiyeri değişimi yapılarak kültürün devamlılığı sağlandı.

3.2.1.3.2. C4-2 hücre kültürü

C4-2 hücre hattı, %80 1 g/L glukoz ve L-glutamin içeren DMEM besiyeri, %20 F-12 Nutrient Mixture (Ham's), %10 FBS, 100 U/ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin, 25 µg/ml Adenin Hidroklorid Hidrat, 0.25 µg/ml Biotin, 5 µg/ml Apo-Transferrin, 13.6 pg/ml 3,3',5-Triiodo-L-thyronin sodyum tuzu ve 5 µg/ml insülin

içeren 500 ml “T-medium” içerisinde kültüre edildi. Her 2-3 günde bir besiyeri değişimi yapılarak kültürün devamlılığı sağlandı.

3.2.1.3.3. RWPE-1 hücre kültürü

RWPE-1 hücre hattı L-glutamine, epidermal büyüme faktörü (rEGF) and bovine pituitary extract (BPE) ile desteklenmiş Keratinocyte serum-free medium içerisinde kültüre edildi. Her 3-4 günde bir besiyeri değişimi yapılarak kültürün devamlılığı sağlandı.

3.2.1.4. Hücrelerin pasajlanması

Hücre üremesinin sağlandığı flask içerisinde hücre yoğunluğu %80’in üzerine ulaştığında hücrelerin üreme ortamı şarjlı pipetör kullanılarak uzaklaştırıldı. Hücrelerin tutunduğu flask yüzeyi steril PBS ile 1 kez hafifçe yıkandı. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmaları için flask boyutuna uygun miktarda Tripsin-EDTA (0.25%) solüsyonu eklendi ve hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ortamında 3-5 dakika bekletildi. Süre sonunda hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop altında kontrol edildi. LNCaP ve RWPE-1 hücre hatları için tripsin miktarının 2 katı kadar saf FBS; C4-2 hücre hattı için aynı miktarda T-medium kullanılarak flasklarda tripsin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonları 15 ml’lik falkonlara alınarak 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak hücre pelleti üzerine uygun miktarda taze besiyeri eklenerek hücreler yeni flasklara pasajlandı.

3.2.1.5. Hücre stoklarının hazırlanması

Hücre stoklama işlemi gerçekleştirileceği zaman pasajlama işlemi sırasında pellet haline getirilen hücre süspansiyonu üzerine hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak vial başına LNCaP hücre hattı için 950 µl FBS + 50 µl DMSO; C4-2 hücre hattı için 900 µl T-medium + 50 µl DMSO ve RWPE-1 hücre hattı için 750 µl medium + 150 µl FBS + 100 µl DMSO koyularak hücreler oda sıcaklığından -20°C’ye kaldırıldı. Ardından 1 saat içinde -152°C’ye alınarak stoklandı.

3.2.1.6. Hücre sayısının belirlenmesi

Hücre pelleti elde edildikten sonra pellet üzerine her bir hücrenin kendi besiyerinden 1 ml eklenerek hücreler süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonlarından 10 µl çekilerek üzerine eşit miktarda tripan blue solüsyonu eklendi ve thoma lamı kullanılarak inverted mikroskop (Euromex, Hollanda) altında sayım işlemi

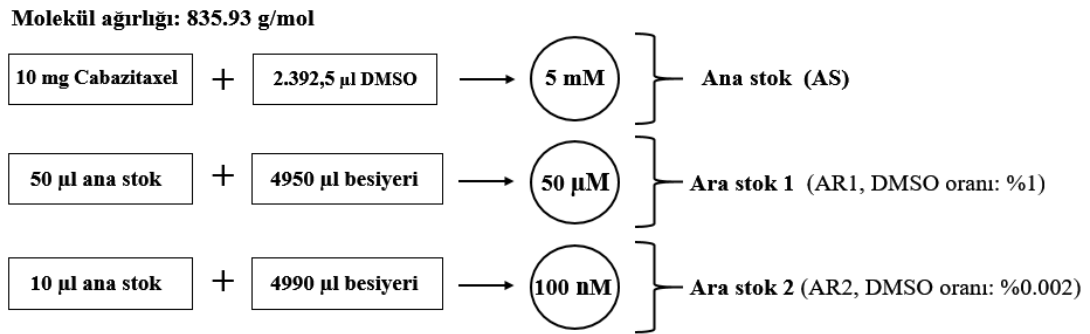
gerçekleştirildi. Thoma lamının üzerinde çizgilerle belirlenmiş ve toplam hacmi 0.1 mm³ olan yüzeyde bulunan 16 büyük kare ve her büyük karede bulunan 25 küçük kare olmak üzere toplamda 400 kare içindeki, kare çizgilerine teğet olan ve karelerin çizgilerini kesen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak ml başına düşen toplam hücre sayısı belirlendi;

Hücre sayısı = 16 karede sayılan hücre sayısı toplamı x dilüsyon faktörü x 10⁴ (mm³'ün ml'ye çevrilmesinde kullanılan sabit sayı)

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

3.2.2.1. Cabazitaxel

Cabazitaxel %99.87 saflıkta 10 mg/vial olmak üzere liyofilize şekilde Selleck Chemicals'dan (Katalog no: S3022) temin edildi. İlacın ana stoğu DMSO içerisinde hazırlandıktan sonra çözülmüş haldeki ilaç solüsyonu 0.22 µm'lik mikropor filtreden geçirildi. 50 µl'lik hacimlerde tüpler içine alikotlanan stok ilaç solüsyonları deney aşamasına kadar -80°C'de saklandı. Her bir deney öncesi taze ana stoktan Şekil 39'da belirtilen uygun dilüsyonlar her bir hücrenin kendi besiyeri ile gerçekleştirilerek ilaç hücrelere uygulanabilir hale getirildi. Literatür taraması sonucu Cabazitaxel uygulama dozları 0.5 nM, 1 nM, 5 nM ve 10 nM olarak belirlendi. En yüksek uygulama dozunda saf DMSO oranı %0.002'nin altında tutuldu (Şekil 39).



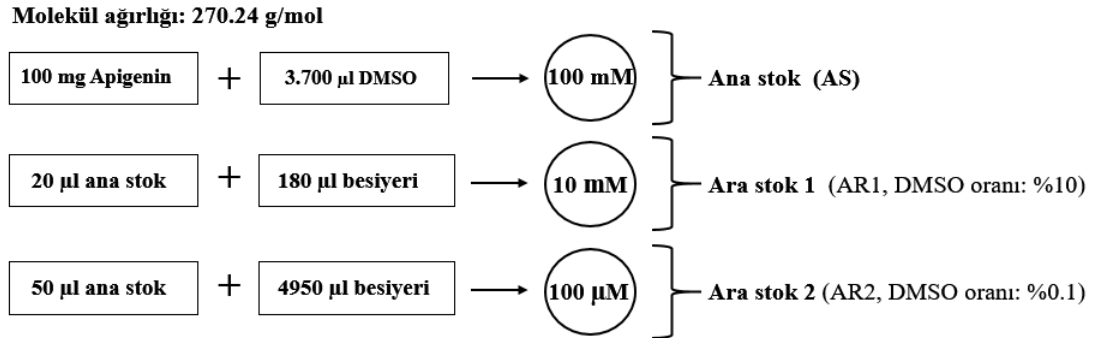
100 µl'de hücrelere uygulanan doz & hacim hesabı;

0.5 nM	1 nM	5 nM	10 nM
0.5 µl AR2	1 µl AR2	5 µl AR2	10 µl AR2
+ 99.5 µl besiyeri	+ 99 µl besiyeri	+ 95 µl besiyeri	+ 90 µl besiyeri

Şekil 39. Cabazitaxel stok solüsyonlarının hazırlanması ve uygun konsantrasyonlarda dilüe edilmesi

3.2.2.2. Apigenin

Apigenin %99.07 saflıkta 100 mg/vial olmak üzere liyofilize şekilde Selleck Chemicals'dan (Katalog no: S2262) temin edildi. Maddenin ana stoğu DMSO içerisinde hazırlandıktan sonra çözünmüş haldeki solüsyon 0.22 µm'lik mikropor filtreden geçirildi. 20 µl'lik hacimlerde tüpler içine alikotlanan stok solüsyonlar deney aşamasına kadar -80°C'de saklandı. Her bir deney öncesi taze ana stoktan Şekil 40'da belirtilen uygun dilüsyonlar her bir hücrenin kendi besiyeri ile gerçekleştirilerek solüsyon hücrelere uygulanabilir hale getirildi. Literatür taraması sonucu Apigenin uygulama dozları 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM ve 80 µM olarak belirlendi. En yüksek uygulama dozunda saf DMSO oranı %0.1'in altında tutuldu (Şekil 40).



100 µl'de hücrelere uygulanan doz & hacim hesabı;

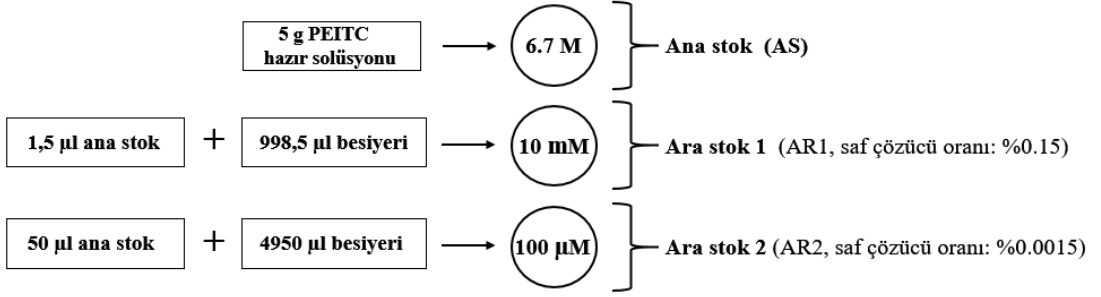
<u>5 µM</u>	<u>10 µM</u>	<u>20 µM</u>	<u>40 µM</u>	<u>80 µM</u>
5 µl AR2	10 µl AR2	20 µl AR2	40 µl AR2	80 µl AR2
+ 95 µl besiyeri	+ 90 µl besiyeri	+ 80 µl besiyeri	+ 60 µl besiyeri	+ 20 µl besiyeri

Şekil 40. Apigenin stok solüsyonlarının hazırlanması ve uygun konsantrasyonlarda dilüe edilmesi

3.2.2.3. Fenetil izotiyosiyanat (PEITC)

Fenetil izotiyosiyanat (PEITC) %99 saflıkta cam şişe içerisinde 5 g olmak üzere hazır solüsyon şeklinde Merck'den (Katalog no: 253731) temin edildi. Maddenin şişe içerisindeki ana stoğunun konsantrasyonu 6.7 M olarak belirlendi. Çözünmüş haldeki ana stok solüsyon 0.22 µm'lik mikropor filtreden geçirildi ve +4°C'de saklandı. Her bir deney öncesi taze ana stoktan Şekil 41'de belirtilen uygun dilüsyonlar her bir hücrenin kendi besiyeri ile gerçekleştirilerek madde solüsyonu hücrelere uygulanabilir hale getirildi. Literatür taraması sonucu PEITC uygulama dozları 5 µM, 10 µM, 15 µM ve 20 µM olarak belirlendi. En yüksek uygulama dozunda saf çözücü oranı %0.0015'in altında tutuldu (Şekil 41).

Molekül ağırlığı: 163.24 g/mol



100 µl'de hücrelere uygulanan doz & hacim hesabı;

5 µM	10 µM	15 µM	20 µM
5 µl AR2	10 µl AR2	15 µl AR2	20 µl AR2
+ 95 µl besiyeri	+ 90 µl besiyeri	+ 85 µl besiyeri	+ 80 µl besiyeri

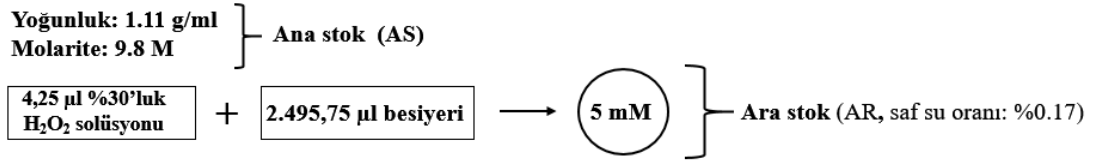
Şekil 41. PEITC'in stok solüsyonu ve uygun konsantrasyonlarda dilüe edilmesi

3.2.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂) dirençli LNCaP hücre hattı (LNCaP-HPR) eldesi

Hidrojen peroksit dirençli LNCaP hücre hattının elde edilebilmesi için literatürde kolanjiokarsinoma hücre hattı MMNK1-L'de (Thanan ve ark., 2015) ve akciğer kanseri hücre hattı A549'da (Onul ve ark., 2012) gerçekleştirilen sırası ile 72 günlük ve 70 günlük *in vitro* hidrojen peroksit adaptasyon protokolleri temel alınarak LNCaP hücre hattının üreme patternine göre oluşturulan uygun bir protokol izlendi.

3.2.3.1. H₂O₂ stok solüsyonunun hücrelere uygulanmak üzere uygun konsantrasyonlarda dilüe edilmesi

Distile su içerisinde hazır halde süspansiyon edilmiş %30'luk (w/w) H₂O₂ solüsyonu Sigma-Aldrich'den (Katalog no: H1009) 100 ml şişe olarak temin edildi ve +4°C'de saklandı. Ürünün belirtilmiş olan stok konsantrasyonuna göre LNCaP hücresinin besiyeri ile uygun dilüsyonlar gerçekleştirilerek H₂O₂ solüsyonu hücrelere uygulanabilir hale getirildi (Şekil 42). Literatür taraması sonucu H₂O₂ uygulama dozları 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 250 µM olarak belirlendi. En yüksek uygulama dozunda saf su oranı %0.17'nin altında tutuldu (Şekil 42).



100 µl'de hücelere uygulanan doz & hacim hesabı;

25 µM	50 µM	100 µM	250 µM
0.5 µl AR	1 µl AR	2 µl AR	5 µl AR
+ 99.5 µl besiyeri	+ 99 µl besiyeri	+ 98 µl besiyeri	+ 95 µl besiyeri

Şekil 42. Hidrojen peroksitin stok solüsyonu ve uygun konsantrasyonlarda dilüe edilmesi

3.2.3.2. LNCaP-HPR eldesi için direnç gruplarının oluşturulması ve uygulanan protokol

Bu kapsamda ilk olarak parental LNCaP hücre hattına 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 250 µM H₂O₂ uygulanarak hücrelerin doza ve zamana bağlı H₂O₂ duyarlılıkları belirlendi. LNCaP hücre hattına 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde belirlenen dozlarda H₂O₂ uygulanması sonucunda, 25 µM, 50 µM ve 100 µM dozlarda 24 saatlik H₂O₂'nin hücre canlılığını sırası ile %93'e, %75'e ve %50'ye azalttığı tespit edildiğinden direnç protokolünde 24 saatlik 50 µM ve 100 µM H₂O₂ dozları kullanıldı. LNCaP hücreleri 6 farklı yoğunlukta (1x10⁶, 1.5x10⁶, 2x10⁶, 3x10⁶, 4x10⁶ ve 5x10⁶) ve her bir doz grubu için birer adet olmak üzere toplam 12 adet 25 cm²'lik filtreli hücre kültürü flasklarına ekildi. Oluşturulan 12 ayrı gruba ilk 30 günlük süre boyunca her 3-4 günde bir 24 saatlik süre için 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulanmaya başlandı. 100 µM H₂O₂ uygulanan hücre gruplarından 5x10⁶ dışındaki tüm gruplar ilk 15 gün içerisinde kaybedildiğinden ve 5x10⁶ 100 µM grubunun H₂O₂ yanıtı ve toparlanma arasında geçen zamanı oldukça uzun olduğundan direnç protokolüne 50 µM doz grupları ile devam edildi. 30 günlük süre sonunda sitotoksosite analizi yapılarak parental hücelere göre direnç katsayısı en fazla olan 50 µM'lik doz grupları (1.5x10⁶, 2x10⁶ ve 3x10⁶), 2. 30 gün için aynı protokolde devam ettirildi. 2. 30 gün sonunda sitotoksosite analizi yapılarak parental hücelere göre direnç katsayısı en fazla olan 50 µM'lik doz grupları (2x10⁶ ve 3x10⁶), 3. 30 gün için aynı protokolde devam ettirildi. Son olarak, parental LNCaP hücrelerinin canlılığını ~%50 oranında azaltan (IC₅₀) 100 µM doz için yaklaşık 2.0-kat direnç elde edildiği 90 gün (3. 30 gün) sonunda direnç protokolü 2x10⁶ 50 µM'lik doz grubunda tamamlandı. Elde edilen hücre hattı LNCaP-HPR olarak isimlendirildi.

3.2.4. Sitotoksisite analizi

Sitotoksisite analizi WST-1 reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. WST-1, hücre canlılığının spektrofotometrede ölçülebilmesini sağlayan kolorimetrik temelli bir reaktif olup sitotoksisite testlerinde sıklıkla ve güvenle kullanılmaktadır. Yöntemin temeli, canlı hücrelerde WST-1 reaktifinin mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine bağlı olarak koyu renkli formazan kristalleri oluşturmaya ve renk değişiminin kolorimetrik ölçüm ile sayısal değere dönüştürülmesine dayanır. Hücre canlılığı fazla olduğunda oluşacak kristal miktarı ve renk skalasındaki koyuluk da fazla olacağından hücre canlılığındaki azalma renk skalasında açık renge doğru geçiş ile orantılı sayısal olarak ölçülebilmektedir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen literatür taramasına göre LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında Apigenin için 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde 5 farklı dozda (5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM ve 80 µM); PEITC için 24 saatlik zaman diliminde 4 farklı dozda (5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM); Cabazitaxel için 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde 4 farklı dozda (0.5 nM, 1 nM, 5 nM ve 10 nM) sitotoksisite analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla LNCaP, LNCaP-HPR ve RWPE-1 hücre hatlarından kuyu başına 2×10^4 ; C4-2 hücre hattından ise kuyu başına 15×10^3 olmak üzere 96-kuyulu hücre kültür plaklarına ekimi yapılan hücrelere belirlenen süreler için ilgili dozlarda ajanlar uygulandı. Süre sonlarında kuyu başına 10 µl WST-1 reaktifi eklenerek 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde hücreler 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından multimode mikropate okuyucuda (Berthold Technologies, Almanya) 520 nm referans alınarak her bir kuyudan 440 nm dalga boyunda absorbans ölçümü alındı. Her bir doz için uygulama en az 3 kuyuda tekrar edildi. Ajan uygulanmamış olan hücre grubunun (negatif kontrol) canlılığı %100 olarak kabul edilerek doz uygulanmış hücre gruplarının canlılığı absorbans değerlerine göre negatif kontrol ile karşılaştırıldı ve hücre canlılığı her bir doz grubu için % cinsinden aşağıdaki formül kullanılarak ifade edildi;

$$\% \text{ Canlhhk} = \frac{\text{Her bir doz grubunun absorbans ortalaması}}{\text{Negatif kontrol grubunun absorbans ortalaması}} \times 100$$

3.2.4.1. LNCaP-HPR hücrelerinde sitotoksosite analizi ile direnç katsayısının belirlenmesi

Her bir 30 günlük doz periyodunun sonunda LNCaP hücrelerinin kazandığı H₂O₂ direnci sitotoksosite analizi gerçekleştirilerek katsayı olarak ifade edildi. Bu amaçla 30 günlük süre sonunda canlılık analizi yapılacak olan direnç gruplarından her biri kuyu başına 2x10⁴ hücre olacak şekilde 96-kuyulu hücre kültür plaklarına ekildi ve hücrelere 24 saat boyunca 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 250 µM H₂O₂ uygulandı. 24 saat sonunda WST-1 ile sitotoksosite analizi gerçekleştirildi ve sitotoksosite analizinde belirtilen % canlılık hesabı yapıldı. Böylece, her bir doz grubu için hücrenin kazandığı direnç katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Direnç katsayısı} = \frac{\text{Her bir doz için LNCaP-HPR hücrelerinin \% canlılığı}}{\text{Her bir doz için parental LNCaP hücrelerinin \% canlılığı}}$$

Her bir 30 günlük doz periyodunun sonunda yukarıdaki formül kullanılarak hücrelerin 1. 30 gün, 2. 30 gün ve 3. 30 günlük periyotlarda ilgili dozlar için kazandıkları direnç katsayıları belirlendi.

3.2.5. Apoptotik etkinin belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılan ajanlardan Apigenin için 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde 4 farklı dozda (10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM); PEITC için 24 saatlik zaman diliminde 4 farklı dozda (5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM); Cabazitaxel için 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde 3 farklı dozda (1 nM, 5 nM, 10 nM) uygulama yapılarak LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında ajanların apoptotik etkileri belirlendi. Tüm hücreler için apoptotik etkinin belirlendiği zaman dilimleri ajanların aynı dozlarda gerçekleştirilen sitotoksik analiz sonuçlarına göre seçildi. Apoptotik etkinin belirlenmesi amacıyla Annexin V & Dead Cell Kit protokolü uygulandı. Yöntemin temeli apoptotik hücre ölümünün erken evresinde gerçekleşen önemli bir fizyolojik değişim olan fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine translokasyonuna dayanmaktadır. Annexin V, fosfolipidlere bağlanma özelliğinde kalsiyum bağımlı bir protein olup fosfatidilserin bakiyelerine oldukça yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Bu sayede apoptotik hücrelerin dış yüzeyinde konumlanan fosfatidilserinlere Annexin V'ın bağlanması ile apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir. Ayrıca hücre membranının yapısal bütünlüğünün ve ölü hücrelerin

belirteci olarak kullanılan 7-AAD boyası sayesinde de ölü hücreler, sağlıklı ve erken apoptotik hücrelerden ayırt edilebilmektedir. Böylece total hücre popülasyonu 4 farklı popülasyonda analiz edilebilir şekilde ayrılabilir;

1. Canlı hücreler: Annexin V (-), 7-AAD (-)
2. Erken apoptotik hücreler: Annexin V (+), 7-AAD (-)
3. Geç apoptotik hücreler: Annexin V (+), 7-AAD (+)
4. Ölü hücreler (nüklear debris): Annexin V (-), 7-AAD (+)

Bu amaçla 6-kuyulu hücre kültür plaklarına LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından 1×10^5 - 5×10^5 /ml yoğunlukta olacak şekilde ekim gerçekleştirildikten sonra hücrelere belirlenen süreler için ilgili dozlarda ajanlar uygulandı. Süre sonunda hücreler Tripsin-EDTA (0.25%) kullanılarak 15 ml'lik falkon içerisinde süspanse hale getirildi ve 1 kez PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında 100 µl PBS ile süspanse edilen hücrelerin üzerine eşit hacimde Annexin V & Dead Cell reaktifi eklenerek pipetaj yapıldı. Hücreler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edildi. Tüm hücrelerde her bir ajan ve her bir doz grubu için 3 farklı analiz gerçekleştirildi.

3.2.5.1. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için apoptotik etkinin belirlenmesi

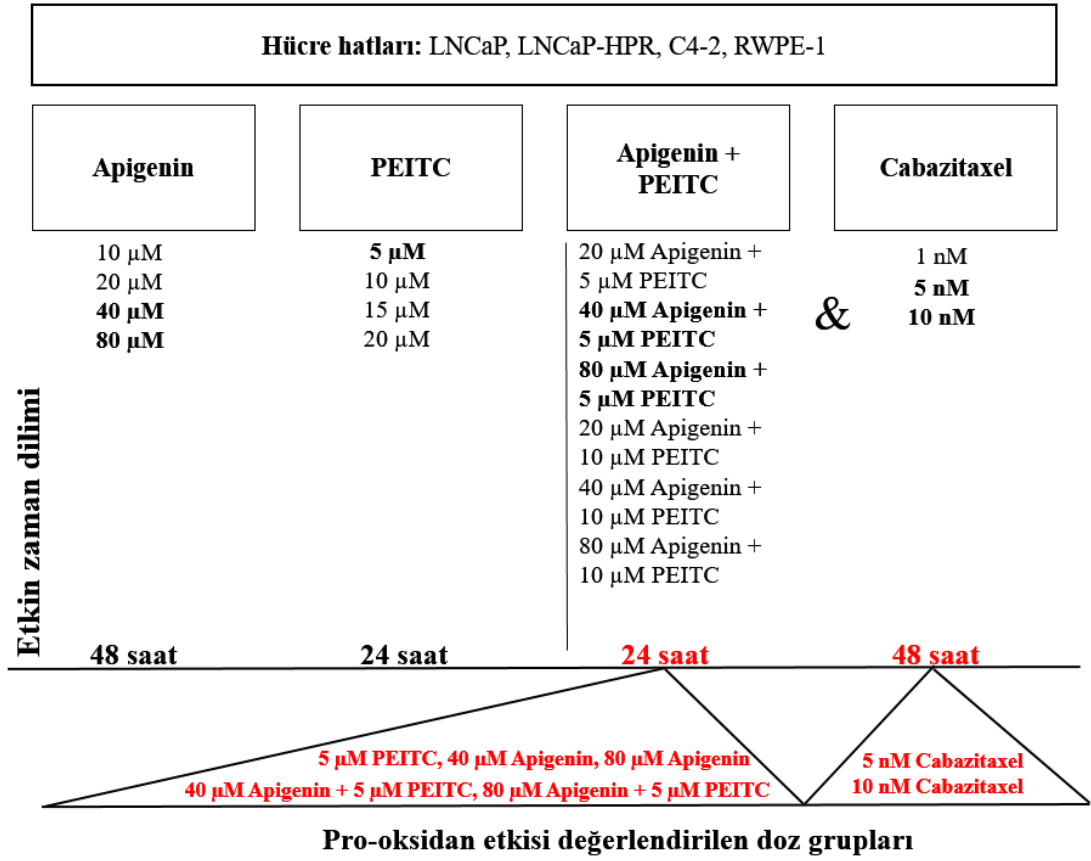
Uygun yoğunlukta (1×10^5 - 5×10^5 /ml) 6-kuyulu hücre kültür plaklarına ekimi gerçekleştirilen LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulandı. Süre sonunda hücreler Annexin V & Dead Cell Kit protokolüne göre hazırlanarak Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edildi. Böylece, LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonrasında apoptotik hücre oranları belirlendi.

3.2.6. Apigenin ve PEITC kombin doz gruplarının belirlenmesi

Tüm hücre hatlarından elde edilen sonuçlar dikkate alınarak Apigenin ve PEITC'in kombin uygulama dozları, 1) Tek başına Apigenin ve PEITC'in doza ve zamana bağlı sitotoksik ve apoptotik etkilerine, 2) Cabazitaxel'in doza ve zamana bağlı sitotoksik ve apoptotik etkisine bağlı olarak seçildi. Bu kapsamda kombin doz uygulamalarında,

- 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC
- 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC
- 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC
- 20 μ M Apigenin + 10 μ M PEITC
- 40 μ M Apigenin + 10 μ M PEITC
- 80 μ M Apigenin + 10 μ M PEITC

olmak üzere 6 farklı doz kombinasyonunun LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücrelerinde 24 saatlik sitotoksik etkisi belirlendi. Kombin uygulamaların hücre canlılığı inhibisyonuna bağlı olan, iki ajanın farmakolojik etkileşimini matematiksel olarak temsil eden kombinasyon indeks (CI) değerleri (CI<1 ise sinerjistik etki, CI=1 ise aditif etki, CI>1 ise antagonist etki) ve ajanların kombin doz gruplarındaki doz redüksiyon indeks (DRI) değerleri (DRI>1 ise iki ajan daha düşük dozlarda birlikte kullanılırsa etkiyi tercih edilen yönde arttırıcı etkileşime sahiptir; DRI<1 ise iki ajan daha düşük dozlarda birlikte kullanıldığında etkiyi tercih edilen yönde arttırıcı etkileşime sahip değildir) CompuSyn (Chou & Talalay, 1984; Chou & Martin, 2005) yazılımı kullanılarak hesaplandı. Elde edilen verilere göre 24 saatte kanser hücrelerinde maksimum, RWPE-1 prostat normal epitel hücrelerinde minimum düzeyde sitotoksitesisi saptanan ve kanser hücrelerinde sinerjistik etkisi olduğu belirlenen 3 farklı doz kombinasyonunun (20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC) tüm hücre hatlarında apoptotik etkisi analiz edildi. Böylece, sitotoksik ve apoptotik analiz verilerine göre pro-oksidan etkisi değerlendirilecek en uygun kombin doz gruplarının 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC olduğu; en uygun zaman diliminin ise 24 saat olduğu tespit edildi. Cabazitaxel'in ise 48 saatte 5 nM ve 10 nM dozlarda hücre canlılığını benzer oranda inhibe ettiği belirlendiğinden bu aşamadan sonraki deneylerde ilgili zaman dilimleri ve dozlar üzerinde çalışıldı (Şekil 43).



Şekil 43. Çalışma kapsamında belirlenen doz grupları ve etkin apoptotik zaman dilimleri

3.2.7. Hücre döngüsü üzerine etkilerin belirlenmesi

LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücrelerine 24 saat boyunca 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ile; 48 saat boyunca 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel uygulandıktan sonra ajanların hücre döngüsü üzerindeki etkileri belirlendi. Bu kapsamda içerisinde propidium iodid (PI) ve RNaz A bulunan ve böylece hücre döngüsünün fazlarını yalnızca DNA miktarına göre ayırt edebilen Muse® Cell Cycle reaktifi kullanıldı. G0/G1 fazında bulunan hücreler her bir kromozomun iki kopyasına sahipken S fazında gerçekleşen replikasyon ile kromozomal DNA ikilendiğinde G2/M fazındaki hücrelerin kromozom sayısı iki kat artmaktadır. Böylece, PI'dan alınan floresan yoğunluğu da artış gösterdiğinden hücre döngüsünün S fazından önceki ve S fazından sonraki fazlarında bulunan hücreler birbirinden ayrılabilir. 6-kuyulu hücre kültür plaklarına LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından 5×10^5 - 1×10^6 /ml yoğunlukta olacak şekilde ekim gerçekleştirildikten sonra hücrelere

belirlenen süreler için ilgili dozlarda ajanlar uygulandı. Süre sonunda hücreler Tripsin-EDTA (0.25%) kullanılarak 15 ml'lik falkon içerisinde süspansiyon haline getirildi ve 2 kez PBS ile yıkandı. Her bir 50 µl hücre pelleti üzerine 1 ml %70'lik soğuk alkol eklenerek hücreler -20°C'de en az 3 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücre pelletleri üzerine 200 µl Cell Cycle reaktifi eklendi ve Muse® Cell Analyzer cihazında analiz gerçekleştirildi. Tüm hücrelerde her bir ajan ve her bir doz grubu için 3 farklı analiz alındı.

3.2.8. Oksidatif stresin belirlenmesi

5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC ile; 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel uygulanan LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücrelerinde ilaç uygulama süresi içerisinde hücre içi oksidatif stres değişimleri üç farklı yöntem kullanılarak belirlendi.

3.2.8.1. Optimizasyon

Bu kapsamda ilk olarak uygulama gruplarının kanser hücrelerinde apoptotik etkisinin belirlendiği etkin zaman dilimlerine bağlı kalınarak, ajanların uygulama süresi içerisinde hücrede maksimum ROS artışına neden oldukları zaman dilimleri tespit edildi. Bu amaçla 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC uygulaması için 6., 12., 18., ve 24. saatlerde; 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel uygulaması için 12., 24. ve 36. saatlerde akış sitometrik ROS analizleri yapılarak optimizasyon gerçekleştirildi. Cabazitaxel için apoptotik ölümün saptandığı 48. saatte LNCaP hücre hattında canlılık yaklaşık %30 olarak belirlendiğinden ve ROS analizinin canlı hücrede gerçekleştirilmesi gerektiğinden bu zaman dilimi için analiz yapılamadı. Sonuç olarak optimizasyondan elde edilen verilere göre kombin uygulamanın 12. saatte; Cabazitaxel uygulamasının ise 24. saatte maksimum ROS artışına neden olduğu belirlendi ve ilgili zaman dilimlerinde ajanların belirlenen dozlarda uygulanması sonucu aşağıda sıralanan yöntemler ile oksidatif stres analizleri gerçekleştirildi.

3.2.8.2. Oksidatif stresin akış sitometrik yöntem ile belirlenmesi

Bu yöntem için Muse® Oxidative Stress Kit protokolü takip edildi. Kit içerisinde bulunan reaktif dihidroetidum (DHE) temelli bir bileşendir. Hücre içine kolayca difüze olabilen DHE, süperoksit anyonları ($\cdot\text{O}_2^-$) varlığında oksidasyona uğrayarak DNA ile etkileşebilen kırmızı renkte florofor bir bileşik olan 2-

hidroksietidiuma dönüşmektedir. Böylece canlı hücreler DHE (-)-ROS negatif ve DHE (+)-ROS pozitif hücreler olarak gruplanabilmektedir. Protokol kapsamında LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından 1×10^6 - 1×10^7 /ml yoğunlukta olacak şekilde 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına ekim gerçekleştirildikten sonra 12 saatlik 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC; 24 saatlik 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel uygulanması sonucu hücreler Tripsin-EDTA (0.25%) kullanılarak 15 ml'lik falkon içerisinde süspansiyon haline getirildi ve 2 kez PBS ile yıkandı. Kit içerisinde bulunan oksidatif stres reaktifi önce 1:100 oranında ara stok olarak hazırlanıp son aşamada 1:80 oranında kitle uygun tampon ile dilüe edilerek boya solüsyonu hücrelere uygulanabilir hale getirildi. Her bir 10 µl hücre süspansiyonu 190 µl boya solüsyonu ile karıştırıldı ve hücreler 37°C'de karanlık ortamda 30 dakika inkübasyon ile boyandı. Süre sonunda Muse® Cell Analyzer cihazında analiz gerçekleştirildi. Tüm hücrelerde her bir ajan ve her bir doz grubu için 3 farklı analiz alındı.

3.2.8.3. Oksidatif stresin floresan mikroskop analizi

Hücrelerde ajanların uygulanması sonucu oksidatif stresin görüntülenebilmesi için genel oksidatif stres belirteci CM-H₂DCFDA ve serbest radikal sensörü dihidroetidum (DHE) kullanılarak iki ayrı floresan boyama gerçekleştirildi. CM-H₂DCFDA, diklorodihidroflorescein diasetat (H₂DCFDA)'ın tiol reaktif klorometil grubu taşıyan karboksi türevidir. Boya pasif difüzyon ile hücre içerisine alındığında intrasellüler esterazlar tarafından asetat grupları yıkıma uğramaktadır ve tiol reaktif klorometil grupları intrasellüler glutatyon ve diğer tioller ile reaksiyona girmektedir. Reaksiyonun hemen ardından peroksidazların, sitokrom c'nin ve Fe⁺² iyonlarının eşlik ettiği diklorodihidroflorescein (H₂DCF)'in hücre içerisinde bulunan H₂O₂ ile oksidasyonu sonucu FITC türevi yeşil floresan madde (Eksitasyon/emisyon: 492/517 nm) açığa çıkmaktadır. Hücre içerisinde H₂O₂ birikimine bağlı olarak yeşil floresan miktarı artış göstermektedir. DHE, süperoksit anyonlarına spesifik bir serbest radikal sensörüdür. İlk yöntemde de ifade edildiği gibi hücre içerisinde süperoksit anyonlarının varlığında oksidize olmaktadır ve oksidasyon sonucu DNA ile etkileşebilen 2-hidroksietidium (Eksitasyon/emisyon: 518/605 nm) açığa çıkmaktadır. Hücre içerisinde süperoksit ($\cdot\text{O}_2^-$) birikimine bağlı olarak kırmızı floresan miktarı artış

göstermektedir. Canlı hücrelerde ROS'un hızlıca metabolize ediliyor olması nedeni ile oksidatif stresin floresan mikroskop analizi kapsamında gerçekleştirilen tüm boyamalarda öncelikle ilgili süre sonlarında canlı hücrede ROS boyamaları gerçekleştirilip ışığa kontrolü sağlandıktan hemen sonra hücreler fikse edildi.

3.2.8.3.1. CM-H₂DCFDA boyama

Bu boyama protokolü için 50 µg/vial olarak liyofilize halde temin edilen Invitrogen™ CM-H₂DCFDA boyası kullanıldı. Öncelikle liyofilize boya, karanlık ortamda ve laminar flow içerisinde hava ile teması minimumda tutularak 17.3 µl steril DMSO içerisinde çözüldü ve 5 mM stok boya solüsyonu elde edildi. LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından kuyu başına 1x10⁶ yoğunlukta olacak şekilde 6-kuyulu hücre kültür plaklarına ekim gerçekleştirildikten sonra hücrelere 12 saatlik 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC ile; 24 saatlik 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel uygulanması yapıldı. Süre sonunda hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve her bir kuyuya PBS içerisinde hazırlanmış 10 µM CM-H₂DCFDA boya solüsyonu eklenerek hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren karanlık ortamda 1 saat süre ile boyandı. Süre sonunda canlı hücrelerde yeşil ışığa kontrol edildikten sonra hücreler %4 paraformaldehit solüsyonu ile oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dakika fikse edildi. Fiksasyonu takiben 2 kez 5'er dakika steril PBS ile yıkama sonrasında 10 µg/ml konsantrasyonda Hoechst boyası ile oda sıcaklığında 5 dakika nükleus boyaması gerçekleştirildi. Son aşamada hücreler 1 kez steril PBS ile yıkanarak EVOS FLoid-FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD) altında görüntülendi. Her bir hücre hattında her bir doz grubu için en az 6 farklı çakışık alan görüntülendi.

3.2.8.3.2. DHE boyama

Bu boyama protokolü için 1 mg/vial olarak liyofilize halde temin edilen Invitrogen™ Dihydroethidium (DHE) boyası kullanıldı. Öncelikle liyofilize boya, karanlık ortamda ve laminar flow içerisinde hava ile teması minimumda tutularak 634 µl steril DMSO içerisinde çözüldü ve 5 mM stok boya solüsyonu elde edildi. LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından kuyu başına 1x10⁶ yoğunlukta olacak şekilde 6-kuyulu hücre kültür plaklarına ekim gerçekleştirildikten sonra hücrelere 12 saatlik 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC ile; 24 saatlik 5 nM ve 10 nM

Cabazitaxel uygulanması yapıldı. Süre sonunda hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve her bir kuyuya PBS içerisinde hazırlanmış 10 µM DHE boya solüsyonu eklenerek hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren karanlık ortamda 45 dakika süre ile boyandı. Süre sonunda canlı hücrelerde kırmızı ışığa kontrol edildikten sonra hücreler %4 paraformaldehit solüsyonu ile karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dakika fikse edildi. Fiksasyonu takiben 2 kez 5'er dakika steril PBS ile yıkama sonrasında 10 µg/ml konsantrasyonda Hoechst boyası ile oda sıcaklığında 5 dakika nükleus boyaması gerçekleştirildi. Son aşamada hücreler 1 kez PBS ile yıkanarak EVOS FLoid-FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD) altında görüntülendi. Her bir hücre hattında her bir doz grubu için en az 6 farklı çakışık alan görüntülendi.

3.2.8.4. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için oksidatif stresin belirlenmesi

İlk olarak 24 saatte apoptotik etkisi belirlenen H₂O₂ uygulamasının LNCaP hücrelerinde oksidatif stresi hangi zaman diliminde en fazla arttığını belirlemek için 6., 12., 18. ve 24. saatlerde akış sitometrik oksidatif stres analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar H₂O₂'nin en fazla ROS artışına 24 saatte yol açtığını gösterdiğinden LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde tüm oksidatif stres analizleri 24 saatte tamamlandı. Uygun yoğunlukta (1x10⁶-1x10⁷/ml) 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına ekimi gerçekleştirilen LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulandı. Süre sonunda hücreler Muse® Oxidative Stress Kit protokolüne göre hazırlanarak Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edildi. Tüm hücrelerde her bir ajan ve her bir doz grubu için 3 farklı analiz alındı. Bu analize ek olarak LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerine 24 saatlik 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulaması sonrasında CM-H₂DCFDA ve DHE ROS boyamaları yapıldı. Her bir hücre hattında her bir doz grubu ve her bir boyama için en az 6 farklı çakışık alan görüntülendi. Böylece LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde H₂O₂ uygulanması sonucu hücre içerisinde biriken ROS miktarındaki farklılıklar gösterildi.

3.2.9. Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi

Mitokondri membran potansiyeli hücre sağlığının önemli bir belirteçidir. Stres durumunda mitokondri membran potansiyelindeki azalma oksidatif stres düzeyinde artışa neden olmakta ve buna bağlı olarak da mitokondriyal membran depolarizasyonu artmaktadır. Mitokondriyal membran depolarizasyonundaki artış mitokondri

membranındaki Ca^{+2} iyon kanallarından mitokondri içerisinde fazla miktarda Ca^{+2} sızıntısına (mitokondriyal Ca^{+2} disregülasyonu) neden olur ve gelişen süreç mitokondriyal disfonksiyon sonucu hücre ölümü ile sonlanır. Bu analiz kapsamında Muse® Mitopotential Assay Kit kullanılarak ajanların uygulanması sonucu hücrelerde mitokondri membran potansiyelindeki değişimler tespit edildi. Kite bulunan Mitopotential boyası, mitokondri membran potansiyelindeki değişimleri tespit edebilen katyonik ve lipofilik özellikte bir boya olup sağlıklı mitokondri membranına yüksek afinite ile bağlanabilmektedir. Ancak mitokondri membran potansiyelindeki azalma sonucu gerçekleşen depolarizasyon ile boyanın mitokondri membranına olan afinitesi azalmaktadır. Kite bulunan 7-AAD boyası ise ölü hücreleri tespit edebilmektedir. Böylece hücreler 4 farklı popülasyonda analiz edilebilir şekilde ayrılabilir;

1. Canlı ve sağlıklı mitokondriye sahip hücreler: Mitopotential (+), 7-AAD (-)
2. Canlı ve depolarize mitokondriye sahip hücreler: Mitopotential (-), 7-AAD (-)
3. Ölü ve depolarize mitokondriye sahip hücreler: Mitopotential (-), 7-AAD (+)
4. Ölü ve sağlıklı mitokondriye sahip hücreler: Mitopotential (+), 7-AAD (+)

Protokol kapsamında LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından 1×10^5 - 5×10^5 /ml yoğunlukta olacak şekilde 6-kuyulu hücre kültür plaklarına ekim gerçekleştirildikten sonra oksidatif stres analizlerinin gerçekleştirildiği optimum zaman dilimlerinde uygulamalar yapılarak (12 saatlik $5 \mu\text{M}$ PEITC, $40 \mu\text{M}$ Apigenin, $80 \mu\text{M}$ Apigenin, $40 \mu\text{M}$ Apigenin + $5 \mu\text{M}$ PEITC ve $80 \mu\text{M}$ Apigenin + $5 \mu\text{M}$ PEITC; 24 saatlik 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel uygulanması) hücreler Tripsin-EDTA (0.25%) ile 15 ml'lik falkon içerisinde süspansiyon haline getirildi. Her bir 100 μl hücre süspansiyonu üzerine, uygun tampon içerisinde 1:1000 oranında hazırlanan 95 μl Mitopotential boya solüsyonu eklendi ve hücreler 20 dakika boyunca 37°C 'de inkübe edildi. Süre sonunda hücrelere 5'er μl 7-AAD boyası eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika boyama gerçekleştirildi. Son olarak hücreler Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edildi. Tüm hücrelerde her bir ajan ve her bir doz grubu için 3 farklı analiz alındı.

3.2.10. Total glutatyon (GSH) miktarının belirlenmesi

Glutatyon antioksidan savunma sisteminin en önemli bileşenidir. Bir hücrede glutatyon havuzu (GSH/GSSG oranı) ne kadar dolu ise hücrenin oksidatif stres ve strese bağlı gelişebilecek oksidatif hasarlar ile mücadele potansiyeli de o kadar fazladır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında ajanların uygulanması sonucu oksidatif stres değişimlerine ek olarak hücrelerin total GSH miktarındaki değişimler de analiz edilmiştir. Bu kapsamda hücrelerde Glutathione Colorimetric Assay Kit kullanılarak total GSH miktarının ELISA temelli ölçümü gerçekleştirildi. Yöntemin temeli NADPH varlığında glutatyon substratı (2-nitrobenzoik asit, DTNB) ve GSH'ın geri dönüşümlü olarak reaksiyona girmesi sonucu oksidize glutatyon (GSSG) ve kolorimetrik ölçümü yapılabilen sarı renkli bir bileşik (2-nitro-5-tiyobenzoik asit, TNB) oluşmasına dayanmaktadır. Ortamda bulunan glutatyon redüktaz enzimi ise oksidize glutatyonun tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH)'a dönüşümünü katalizlemekte ve böylece GSH ile DTNB'nin tekrar reaksiyonu sonucu daha fazla 2-nitro-5-tiyobenzoik asit oluşmaktadır. Böylece, elde edilen madde konsantrasyonuna bağlı olarak sarı renk yoğunluğundaki artış dolaylı olarak hücre içi total GSH miktarına karşılık gelmektedir. Protokol kapsamında LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından $0.5-1 \times 10^6$ yoğunlukta olacak şekilde 25 cm^2 'lik hücre kültürü flasklarına ekim gerçekleştirildikten sonra oksidatif stres analizlerinin gerçekleştirildiği optimum zaman dilimlerinde (12 saatlik $5 \mu\text{M}$ PEITC, $40 \mu\text{M}$ Apigenin, $80 \mu\text{M}$ Apigenin, $40 \mu\text{M}$ Apigenin + $5 \mu\text{M}$ PEITC ve $80 \mu\text{M}$ Apigenin + $5 \mu\text{M}$ PEITC; 24 saatlik 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel) uygulamalar yapıldı. Hücreler scraper yardımı ile kaldırılarak $+4^\circ\text{C}$ 'de 700 g 'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 1 kez soğuk PBS ile yıkandı ve tekrar $+4^\circ\text{C}$ 'de 700 g 'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atılarak hücrelerin $80 \mu\text{l}$ Glutatyon tamponu ile buz üzerinde 10 dakika boyunca lizis edilmesi sağlandı. Süre sonunda her bir tüpe $20 \mu\text{l}$ sülfosalisilik asit eklenerek tüm hücrel proteinlerin yıkımı sağlandı ve 8000 g 'de 10 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve okutma yapılacak olan 96-kuyulu plağın her bir kuyusu için $140 \mu\text{l}$ Glutatyon tamponu ve $20 \mu\text{l}$ NADPH oluşturma karışımı eklendi. $160 \mu\text{l}$ 'lik karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek NADPH oluşumu sağlandı. Her bir $160 \mu\text{l}$ 'lik karışım üzerine temiz tüpe alınan örnek gruplarından 20'şer μl eklendi ve örnek eklenen plak 10 dakika oda sıcaklığında

inkübe edildi. Süre sonunda her bir kuyuya aynı anda 20 µl DTNB eklenerek reaksiyon başlatıldı. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında gerçekleşen reaksiyonun ardından multimode mikroyuvar okuyucu (Berthold Technologies, Almanya) kullanılarak 415 nm’de kolorimetrik ölçüm yapıldı. 10 dakika aralıklar ile toplam 30 dakika boyunca reaksiyondan 3 farklı ölçüm alındı. Konsantrasyonu 10 ng/µl olan Glutasyon standartı ile aynı protokol izlenerek 7 farklı standart dilüsyonu hazırlandı ve standart kurve grafiği oluşturuldu. %25 dilüsyon yapılması sonucu deney gruplarından elde edilen absorban değerleri kurve grafiğine yerleştirildi.

3.2.10.1. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için total glutasyon (GSH) miktarının belirlenmesi

Uygun yoğunlukta ($0.5-1 \times 10^6$) 25 cm^2 ’lik hücre kültürü flaklarına ekimi gerçekleştirilen LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına oksidatif stres analizlerinin gerçekleştirildiği optimum zaman diliminde (24 saat) 50 µM ve 100 µM H_2O_2 uygulandı. Süre sonunda hücreler Glutathione Colorimetric Assay Kit protokolüne göre hazırlanarak total GSH miktarları ölçüldü. Böylece, LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde redoks adaptasyonu öncesi ve sonrasında hücrelerin total GSH miktarlarındaki değişimler karşılaştırıldı.

3.2.11. Gen ekspresyonu analizleri

Tez çalışması kapsamında redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinden *Nrf2*, *Hif-α* ve *NF-κB*’nın, antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genleri ile prostat kanseri progresyonunda önemli genler olan *AR* ve *KLK3* (*PSA*)’ün ajanların uygulanması sonucu transkripsiyon düzeyinde değişimleri StepOnePlus™ Real Time-PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazında analiz edildi. Bu kapsamda öncelikle kombin uygulama için maksimum ROS artışının tespit edildiği 12. ve apoptotik etkinin tespit edildiği 24. saatlerde özellikle redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ve antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Elde edilen veriler kombin uygulama için 24. saatte belirlenen ekspresyon farklılıklarının daha anlamlı olduğunu gösterdi. Benzer olarak Cabazitaxel için de 48. saatteki veriler daha anlamlı bulunduğundan gen ekspresyon analizleri bu zaman diliminde gerçekleştirildi.

3.2.11.1. RNA izolasyonu

LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından her bir flaskta 1×10^6 hücre olacak şekilde 25 cm^2 'lik hücre kültürü flasklarına ekim gerçekleştirildi ve hücreler 24 saat boyunca $5 \mu\text{M}$ PEITC, $40 \mu\text{M}$ Apigenin, $80 \mu\text{M}$ Apigenin, $40 \mu\text{M}$ Apigenin + $5 \mu\text{M}$ PEITC ve $80 \mu\text{M}$ Apigenin + $5 \mu\text{M}$ PEITC ile; 48 saat boyunca 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel ile muamele edildi. İlgili süre sonlarında hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı ve 2 kez PBS ile yıkandı. Adherent hücreler için kit protokolü optimize edilerek E.Z.N.A.[®] Blood RNA Kit ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu kapsamda, hücre pelletleri 1:50 oranında 2-merkaptotanol eklenen $350 \mu\text{l}$ NTL lizis tamponu içerisinde 30 saniye güçlü şekilde vortekslendi (VELP Scientifica, İtalya) ve hücre süspansiyonları yeşil renkli homogenizer mini kolonlara aktarıldı. Maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi. Filtrat üzerine $350 \mu\text{l}$ %70'lik etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Presipitasyon sonrasında $700 \mu\text{l}$ 'lik bu karışım pembe renkli HiBind[®] RNA Mini kolonlarına aktarıldı ve $10.000 \text{ g}'de$ 1 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda kolon 1 kez $500 \mu\text{l}$ RWF yıkama tamponu ile yıkandı ve tekrar $10.000 \text{ g}'de$ 1 dakika santrifüj edildi. Yeni toplama tüpüne alınan kolonlar üzerine 2 kez $700 \mu\text{l}$ yıkama tamponu II eklenerek ve her yıkamada $10.000 \text{ g}'de$ 1 dakika santrifüj edilerek yıkamalar tamamlandı. Son aşamada maksimum hızda 2 dakika boyunca santrifüj yapılarak kolonlardaki alkolün uçması sağlandı. Kolonlar 2 ml mikrosantrifüj tüpleri içerisine alınarak üzerlerine $30 \mu\text{l}$ nükleaz içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj ile kolona bağlı RNA'ların elüsyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların miktar ve kalite tayinleri UV-Vis spektrofotometrede ölçülerek A_{260}/A_{280} oranına göre belirlendi.

3.2.11.2. cDNA sentezi

Her bir total RNA örneğinden reaksiyon başına $100 \text{ ng}/10 \mu\text{l}$ olacak şekilde RNA örnekleri nükleaz içermeyen distile su ile dilüe edildikten sonra High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protokolü takip edilerek tek iplikli cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tablo 4'de bileşen hacimleri gösterilen $10 \mu\text{l}$ 'lik RT Master karışımı buz bloğu üzerinde hazırlandıktan sonra her bir tüpe $10 \mu\text{l}$ hacimde RNA örneği eklendi. Totalde $20 \mu\text{l}$ reaksiyon hacminde hazırlanan tüpler spinleme (Biosan,

Letonya) sonrası Thermal cycler (Bio-Rad, ABD) içine yerleştirilerek cDNA sentezinin reaksiyon koşulları sağlandı (Tablo 4).

Tablo 4. Total RNA'dan cDNA sentezi için hazırlanan RT Master karışımı bileşenleri ve cDNA sentez reaksiyonu koşulları

Reaksiyon başına hazırlanan RT Master karışımı bileşenleri				
10× RT tamponu				2.0 µl
25× dNTP karışımı (100 mM)				0.8 µl
10× RT Random Primerler				2.0 µl
MultiScribe™ ters transkriptaz enzimi 50 U/µl				1.0 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O				4.2 µl
Total reaksiyon hacmi				10.0 µl
	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	+4
Süre (dakika)	10	120	5	∞

3.2.11.3. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR)

Gen ekspresyon seviyeleri RT-qPCR ile analiz edilen genlerin her biri için floresan işaretli probler içeren TaqMan® Gene Expression Assayler kullanıldı. *Nrf2* (Hs00975961_g1), *Hif-α* (Hs00153153_m1), *NF-κB* (Hs00765730_m1), *SOD1* (Hs00533490_m1), *CAT* (Hs00156308_m1), *GR* (Hs00167317_m1), *AR* (Hs00171172_m1) ve *PSA* (Hs02576345_m1) genlerinin ekspresyon analizi TaqMan® Gene Expression Master Mix kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 5'de belirtilen reaksiyon karışımı hazırlanarak StepOnePlus™ Real Time-PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazında uygun RT-qPCR koşulları gerçekleştirildi. Her bir ajan ve her bir doz grubu için her bir genin floresan ışımaya eşiğini geçtiği döngü sayısı (*Ct*) üç tekrarlı olarak alındı. Elde edilen döngü sayılarının istatistiksel analizi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodunu kullanan <https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze> web tabanlı analiz sisteminde gerçekleştirildi. Gen ekspresyonlarının göreceli karşılaştırmaları ve normalizasyonu için housekeeping gen olarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*, Hs03929097_g1) geni kullanıldı.

Tablo 5. Gen ekspresyon analizi için gerçekleştirilen reaksiyon ve RT-qPCR koşulları

10 µl reaksiyon hacmi için RT-qPCR karışımı				
	n=1		n=3	
20× TaqMan® Gene Expression Assay	0.5 µl		1.5 µl	
2× TaqMan® Gene Expression Master Mix	5.0 µl		15.0 µl	
cDNA (~75 ng)	2.0 µl		6.0 µl	
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2.5 µl		7.5 µl	
Total reaksiyon hacmi	10.0 µl			
	Polimeraz aktivasyonu		Amplifikasyon	
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60
Süre (dakika)	2	10	0.25	1

} 40 döngü

3.2.11.4. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için gerçekleştirilen gen ekspresyonu analizleri

Uygun yoğunlukta (1×10^6) 25 cm^2 'lik hücre kültürü flasklarına ekimi gerçekleştirilen LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına maksimum ROS artışının ve apoptotik etkinin tespit edildiği 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H_2O_2 uygulandı. Süre sonunda hücrelerden E.Z.N.A.® Blood RNA Kit ile total RNA izole edildi ve High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. Floresan işaretli TaqMan® Gene Expression Assayler kullanılarak redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri *Nrf2*, *Hif-α* ve *NF-κB* ile antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin ekspresyon değişimleri tespit edildi. Böylece, LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde H_2O_2 uygulaması sonrasında hücrelerin oksidatif strese yanıt ve adaptasyon sürecini ilgilendiren genlerdeki transkripsiyonel farklılıklar karşılaştırıldı.

3.2.12. Protein ekspresyonu analizleri

Tez çalışması kapsamında redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinden *Nrf2*, *Hif-α* ve *NF-κB* ile prostat kanseri progresyonunda önemli proteinler olan AR ve PSA'nın ajanların uygulanması sonucu protein ekspresyon seviyesindeki değişimler Western blot analizi ile tespit edildi. Western blot analizlerinde Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell ve Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad, ABD) sistemi kullanıldı. Protein ekspresyonunun değerlendirildiği zaman dilimi olarak mRNA ekspresyon analizlerinin gerçekleştirildiği saatler (kombin uygulama için 24 saat ve Cabazitaxel için 48 saat) seçildi. Çalışılan proteinler transkripsiyon faktörleri olduğundan tüm ajanlar ve tüm uygulama grupları için

sitoplazmik ve nuklear ekspresyon düzeyleri ayrı ayrı belirlendi. Fosforillenme yolu ile aktifleşen proteinler için (Nrf2 ve NF-κB) fosforile protein miktarları değerlendirildi. AR ve PSA proteinlerinin ekspresyon analizleri için hücreler ajan uygulanmasından 2 gün önce %10 Charcoal Stripped FBS içeren besiyeri ortamında hormon açlığına bırakıldı ve dozlama gününde tekrar %10 FBS içeren besiyeri ortamında ajanların uygulaması yapıldı. Protein ekspresyonlarının göreceli karşılaştırmalarının ve normalizasyonunun yapılabilmesi amacıyla sitoplazmik proteinler için Aktin-β ve nuklear proteinler için Histon H3 proteinleri kullanıldı.

3.2.12.1. Sitoplazmik ve nuklear protein izolasyonları

Sitoplazmik ve nuklear proteinlerin izolasyonu için Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit kullanıldı. LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarından her bir flaskta 1×10^6 hücre olacak şekilde 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına her bir gruptan 6'şar set olacak şekilde ekim gerçekleştirildi ve hücreler 24 saat boyunca 5 μM PEITC, 40 μM Apigenin, 80 μM Apigenin, 40 μM Apigenin + 5 μM PEITC ve 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC ile; 48 saat boyunca 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel ile muamele edildi. İlgili süre sonlarında hücrelerin besiyeri atılarak 2 kez soğuk PBS ile yıkandı ve buz üzerinde scraper yardımı ile kaldırılarak 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde PBS içerisinde süspanse hale getirildi. Hücre süspanasyonu 0°C'de 600 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet üzerine 1:9 oranında proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren 200 μl soğuk hipotonik sitoplazmik protein ekstraksiyon reaktifi A (CER A) eklendi ve tüpler güçlü şekilde vortekslendi, her 5 dakikada bir vortekse devam edilerek 15 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda her bir tüpe 1:9 oranında proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren 10 μl soğuk sitoplazmik protein ekstraksiyon reaktifi B (CER B) eklenerek 5 saniye vorteks yapıldı ve tüpler 0°C'de 16.000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında önceden soğutulmuş temiz tüpler içerisine 200 μl hacimde olan sitoplazmik proteinler aktarıldı ve -80°C'ye kaldırıldı. Çözünmeyen ve pellet haline gelen nuklear debris üzerine ise 1:9 oranında proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren 50 μl soğuk nuklear protein ekstraksiyon reaktifi (NER) eklendi, 30 saniye vorteks yapıldı ve nuklear debris buza alındı. Her 5 dakikada bir tekrar vortekslenerek 40 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda tüpler 0°C'de 20.000 g'de 15 dakika

santrifüj edildi. Önceden soğutulmuş olan temiz tüpler içerisine 50 µl hacimde olan nükleer proteinler aktarıldı ve -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.12.2. Proteinlerin miktar tayini

Protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla Qubit™ Protein Assay Kit kullanıldı. Ölçümü yapılacak her bir protein örneği için protein tamponu içerisinde 1:200 oranında floresan protein reaktifi eklenerek çalışma solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan solüsyon standart başına 190 µl, ölçümü yapılacak örnek başına ise 199 µl olacak şekilde 500 µl 'lik temiz tüplere dağıtıldı. Her bir standarttan 10'ar µl ve her bir protein örneğinden ise 1'er µl tüplere eklendi ve kısa süreli vorteksenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazında üç farklı konsantrasyondaki standartın (0 ng/µl, 200 ng/µl ve 400 ng/µl) ölçümünü takiben miktarı belirlenecek olan proteinlerin sırayla ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları (QF değeri) ng/µl cinsinden elde edildi. Toplam protein konsantrasyonları QF değerlerine göre aşağıdaki formülle hesaplandı ve izole edilen her bir protein örneğinin ng/µl cinsinden konsantrasyonu belirlenmiş oldu.

$$\text{Örnek konsantrasyonu} = \text{QF değeri} \times \frac{200}{x}$$

3.2.12.3. Proteinlerin hazırlanması

Elektroforez aşamasında jele yüklenecek her bir protein örneği, kuyu başına 20 µl'de 30 µg olacak şekilde distile H₂O ile dilüe edilerek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine koyuldu ve her bir örneğin üzerine 5'er µl bromofenol mavi içeren indirgeyici özellikte 2X protein yükleme tamponu eklendi. Proteinler 100°C'de 5 dakika boyunca denatüre edildi. Süre sonunda 1 dakika buzda bekletilerek elektroforez aşamasına geçildi.

3.2.12.4. Jel elektroforezi

Elektroforez aşamasında hazır olarak temin edilen %4–15 Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free Precast protein jelleri kullanıldı. Jel, distile H₂O ile hazırlanan 1X Tris/Glycine/SDS (TGS) tamponu ile doldurulmuş tank içerisine uygun olarak yerleştirildikten ve 20 µl hacminde olan her bir kuyuya elektroforez için hazır hale getirilen protein örnekleri sırası ile yüklendi. Marker için ayrılan kuyulara 5 µl Prestained Protein Ladder (5-245 kDa) yüklendikten sonra öncelikle oda sıcaklığında 80 V'da 5 dakika yürütme ile proteinlerin kuyulara çökmesi sağlandı. +4°C'de Mini-

PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanılarak 100 V'da yaklaşık 1-2 saat jel elektroforezi gerçekleştirildi.

3.2.12.5. Transfer aşaması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra ıslak transfer işlemi gerçekleştirilerek jeldeki protein örnekleri nitrosellüloz membranlara aktarıldı. Bu işlem için Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches 0.45µm 6x8 hazır membranlar kullanıldı. Membran, filtre kağıtları, pedler ve jel 1:2:7 oranında 10X Tris/Glycine (TG): Metanol: Distile H₂O içeren soğuk transfer tamponunda birkaç dakika ısıtıldı. Membranın kurumamasına dikkat edilerek soğuk tampon içerisinde katoddan (-) anoda (+) doğru sırası ile ped, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve ped doğru pozisyonda yerleştirildi ve sandviç hazırlandı. Transfer tamponu içeren Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad, ABD) içerisinde 250 mA'de soğuk ortamda 2 saat transfer gerçekleştirildi.

3.2.12.6. Bloklama

Transfer işleminden sonra membran Ponceau S solüsyonu ile yıkanarak membrandaki total protein varlığı ve transfer işlemi kontrol edildi. Distile H₂O içerisinde 1X Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) solüsyonu hazırlandı ve Ponceau S aşamasından sonra membran sırası ile 1 kez distile H₂O ve 2 kez 1X TBST solüsyonu ile yıkanarak Ponceau S'den temizlendi. Fosfoproteinler için 2.5 g BSA 50 ml 1X TBST (%5 BSA/1X TBST) içerisinde çözülerek; diğer tüm proteinler için 1 g yağsız kuru süt tozu 20 ml 1X TBST (%5 nonfat dry milk/1X TBST) içerisinde çözülerek bloklama tamponları hazırlandı. Membranlar uygun bloklama tamponu içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında 35 rpm'de (Cleave Scientific, Birleşik Krallık) çalkalamalı olarak inkübe edildi. Süre sonunda membran 45 rpm'de çalkalamalı olarak 10 dakika içerisinde 3 kez 1X TBST ile yıkandı.

3.2.12.7. Primer antikor ile muamele

Primer antikorların dilüsyonları teknik bilgileri içeren formlarında Western Blot analizi için belirtilen dilüsyon aralıklarına bağlı kalınarak uygun tampon içerisinde gerçekleştirildi. Buna göre anti-Nrf2 (fosfo S40) (ab76026) 1:20000 ve anti-NF-κB p65 (fosfo S536) (ab86299) 1:5000 oranında %5 BSA içeren 1X TBST tamponu; anti-Hif-α (ab51608) 1:500, anti-AR (D6F11) 1:2000, anti-PSA/KLK3 (D6B1) 1:1000, anti-aktin β (ab228001) 1:10000 ve anti-histon H3 (D1H2) 1:2000

oranında %5 yağsız kuru süt tozu içeren 1X TBST tamponu içerisinde hazırlandı. Membran primer antikor solüsyonu ile gece boyu +4°C'de 35 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edildi. Süre sonunda 45 rpm'de çalkalamalı olarak 3 kez 5'şer dakika 1X TBST ile yıkandı.

3.2.12.8. Sekonder antikor ile muamele

Goat anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721) sekonder antikorunu teknik bilgi formunda belirtilen dilüsyon aralığına bağlı kalınarak 1:5000 oranında %5 BSA içeren 1X TBST solüsyonunda hazırlandı. Primer antikor ile muamele sonrasında yıkaması tamamlanan membran oda sıcaklığında 1 saat boyunca 35 rpm'de çalkalamalı olarak sekonder antikor ile inkübe edildi. Süre sonunda 45 rpm'de çalkalamalı olarak 3 kez 5'şer dakika 1X TBST ile yıkandı.

3.2.12.9. Görüntüleme

Sekonder antikor ile inkübasyonun ardından membranın kurumamasına dikkat ederek ve proteinlerin bulunduğu yüzeye temas etmeden membran düz ve temiz bir alana alındı. SuperSignal™ Western Blot Enhancer solüsyonlarının 1:1 oranında karıştırılması ile elde edilen kemilüminesans substrat çözeltisi temiz bir alanda tüm membran yüzeyine uygulandı ve kemilüminesans ajanının sekonder antikora bağlanması için oda sıcaklığında karanlık ortamda 5 dakika beklendi. Süre sonunda membran üzerinde kalan fazla substratlar peçeteye emdirilerek membran C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR, ABD) üzerine yerleştirildi ve proteinler görüntülendi. ImageJ programı kullanılarak protein bantlarının yoğunluklarına bağlı ölçümler yapıldı ve protein ekspresyon seviyesindeki değişimler tespit edildi.

3.2.12.10. LNCaP-HPR hücrelerinde direnç validasyonu için gerçekleştirilen protein ekspresyonu analizleri

LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonrasında protein ekspresyonunun değerlendirildiği zaman dilimi olarak mRNA ekspresyon analizlerinin gerçekleştirildiği 24. saat seçildi. Uygun yoğunlukta (1x10⁶) 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına her bir gruptan 6'şar set olacak şekilde ekimi gerçekleştirilen LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulandı. Süre sonunda hücrelerden sitoplazmik ve nükleer proteinler izole edilerek Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell ve Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad, ABD) sisteminde redoks duyarlı transkripsiyon

faktörleri Nrf2, Hif- α ve NF- κ B'nin ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Böylece, LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonrasında hücrelerin oksidatif strese yanıt ve adaptasyon sürecini ilgilendiren proteinlerdeki ekspresyon farklılıkları karşılaştırıldı.

3.2.13. Immünfloresan analizler

Protein ekspresyonu analizlerinin gerçekleştirildiği zaman dilimlerinde (kombin uygulama için 24 saat ve Cabazitaxel için 48 saat) LNCaP, LNCaP-HPR ve RWPE-1 hücre hatlarından kuyu başına 1x10⁶ yoğunlukta olacak şekilde 6-kuyulu hücre kültür plaklarına, C4-2 hücre hattından kuyu başına 1x10⁵ yoğunlukta olacak şekilde 13 mm coverslipler üzerinde 24-kuyulu hücre kültür plaklarına ekim gerçekleştirildi. AR ve PSA proteinlerinin immünfloresan analizleri için hücreler ajan uygulanmasından 2 gün önce %10 Charcoal Stripped FBS içeren besiyeri ortamında hormon açlığına bırakıldı ve dozlama gününde tekrar %10 FBS içeren besiyeri ortamında ajan uygulaması yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ile; 48 saat boyunca 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel ile muamele edildi. Süre sonunda p-Nrf2, p-NF- κ B, Hif- α , AR ve PSA proteinlerinin subsellüler lokalizasyonları ve miktarlarındaki değişimler immünfloresan analiz ile EVOS FLoid-FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD) altında görüntülendi.

3.2.13.1. Fiksasyon

İlk aşamada hücrelerin ekili buldukları hücre kültür plakaları soğuk buz kalıbı üzerine alınarak besiyerleri uzaklaştırıldı ve 1X steril PBS içerisinde hazırlanan %4 paraformaldehit (10 ml %16 paraformaldehit solüsyonu + 30 ml 1X steril PBS) ile +4°C'de 25 rpm'de çalkalamalı olarak 20 dakika boyunca fiksasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda hücreler 3 kez 5'şer dakika PBS ile yıkandı.

3.2.13.2. Permeabilizasyon

Permeabilizasyon aşaması için öncelikle 10 ml PBS içerisine 10 μ l Triton X-100 eklenerek %0.1 Triton X-100 solüsyonu hazırlandı. Fikse olan hücreler oda sıcaklığında %0.1 Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edildikten sonra 3 kez 5'şer dakika PBS ile yıkandı.

3.2.13.3. Bloklama

Permeabilizasyon aşamasından sonra %1 BSA, %5 normal keçi serumu içeren PBS (0.25 g BSA + 1.25 ml normal keçi serumu + 23.75 ml PBS) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca 25 rpm'de çalkalamalı olarak bloklama aşaması tamamlandı.

3.2.13.4. Primer antikor ile muamele

Primer antikorların dilüsyonları teknik bilgileri içeren formlarında immünfloresan analiz için belirtilen dilüsyon aralıklarına bağlı kalınarak uygun tampon içerisinde gerçekleştirildi. Buna göre anti-Nrf2 (fosfo S40) (ab76026) 1:100, anti-NF- κ B p65 (fosfo S536) (ab86299) 1:500 ve anti-Hif- α (ab51608) 1:100 oranında %1 BSA, %5 normal keçi serumu ve %0.1 Triton X-100 içeren PBS içerisinde; anti-AR (D6F11) 1:800 ve anti-PSA/KLK3 (D6B1) 1:200 oranında %1 BSA, %5 normal keçi serumu ve %0.3 Triton X-100 içeren PBS içerisinde hazırlandı. Bloklama aşamasından sonra hücreler primer antikor solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat 25 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edildi. Süre sonunda 3 kez 5'şer dakika PBS ile yıkama yapıldı.

3.2.13.5. Sekonder antikor ile muamele

Goat anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (ab150080) sekonder antikorunu teknik bilgi formunda belirtilen dilüsyon aralığına bağlı kalınarak 1:500 oranında %1 BSA ve %5 normal keçi serumu içeren PBS içerisinde hazırlandı. Hücreler sekonder antikor solüsyonu ile oda sıcaklığında karanlık ortamda 25 rpm'de çalkalamalı olarak 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda 3 kez 5'şer dakika PBS ile yıkama yapıldı.

3.2.13.6. Görüntüleme

Yıkaması tamamlanan ve 6-kuyulu plaklarda bulunan hücreler 10 μ g/ml Hoechst ile oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi ve 2 kez PBS ile yıkandı. Coverslipler üzerinde 24-kuyulu plakalarda bulunan hücreler için ise 2 kez PBS ile yıkama sonrasında coverslipler, 1 damla Fluoroshield Mounting Medium with DAPI solüsyonu damlatılmış temiz lamaların üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı ve preparatların kuruması beklendi. Hücreler EVOS FLoid-FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD) altında incelendi. Her bir hücre hattında her bir doz grubu için en az 6 farklı çakışık alan görüntülendi.

3.2.14. İstatistiksel analizler

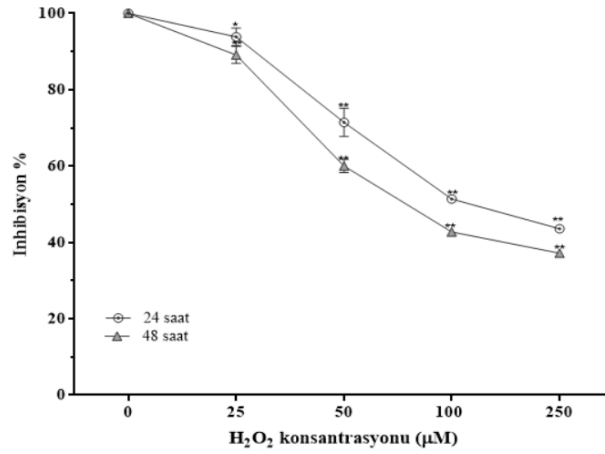
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 6.0 ve SPSS versiyon 25.0 programları kullanıldı. Verilere ait değişkenler yüzde ve ortalama \pm standart sapma (SD) olarak tanımlandı. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için tek yönlü varyans (One-way ANOVA) analizi kullanıldı. Anova analizi sonrasında çoklu karşılaştırmalarda anlamlılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için Post-hoc Tukey testi kullanıldı. Gen ekspresyonu analiz verilerinin istatistiksel analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodunu kullanan <https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze> web tabanlı analiz sisteminde bağımsız örneklem t-testi kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm karşılaştırmalarda 0.05'ten küçük p değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. LNCaP-HPR hücre hattının eldesi ve direnç validasyonları

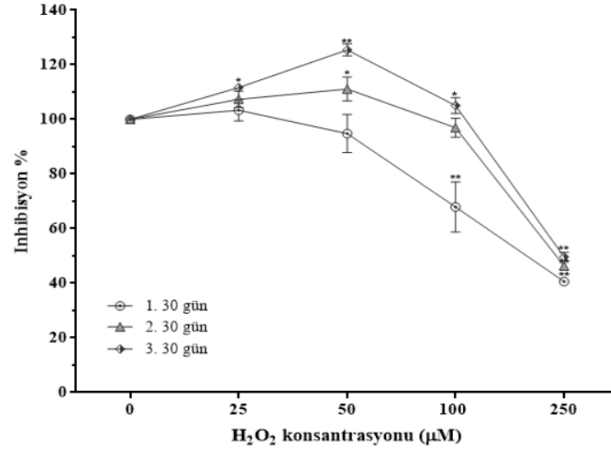
4.1.1. Sitotoksosite analizleri

Parental LNCaP hücre hattına 24 ve 48 saatlik 25 μM , 50 μM , 100 μM ve 250 μM H_2O_2 uygulanması sonucu hücre canlılığının doza bağlı olarak sırasıyla 24 saat için %93.8, %72.1, %51.7, %43.5'e ($p<0.05$, $p<0.01$); 48 saat için %89.1, %64.7, %42.7 ve %37.2'ye ($p<0.01$) azaldığı saptandı (Şekil 44). H_2O_2 'nin parental LNCaP hücre hattında 24 saatlik IC_{50} değeri yaklaşık 100 μM olarak hesaplandı ($y = -0,3072x + 85,333$).



Şekil 44. H_2O_2 'nin parental LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

90 gün boyunca 24 saat süre ile 50 μM H_2O_2 uygulanması sonucu elde edilen hücre hattı LNCaP-HPR'nin her bir 30 günlük periyot sonundaki sitotoksosite analizi sonuçlarına göre 24 saatlik 25 μM , 50 μM , 100 μM ve 250 μM H_2O_2 uygulanması sonucu hücre canlılığının doza bağlı olarak sırası ile 1. 30 günlük süre için %103.4, %94.8, %67.9 ($p<0.01$) ve %40.6'ya ($p<0.01$); 2. 30 günlük süre için %107.4, %111.5 ($p<0.05$), %96.9 ve %46.3'e ($p<0.01$) ve 3. 30 günlük süre için %111.7 ($p<0.05$), %125.5 ($p<0.01$), %105.09 ($p<0.05$) ve %49.6'ya ($p<0.01$) azaldığı tespit edildi (Şekil 45).



Şekil 45. H₂O₂'nin LNCaP-HPR hücre hattında 90 günlük sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Sitotoksosite analizlerinden elde edilen verilere göre her bir 30 günlük süre için LNCaP-HPR hücre hattının her bir doz grubunda parental LNCaP hücre hattına kıyasla kazandığı direnç katsayıları hesaplanarak Tablo 6'da özetlendi. Direnç katsayıları hesaplandığında parental LNCaP hücre hattında 24 saatte hücre canlılığını yaklaşık %50 inhibe eden 100 µM H₂O₂'ye karşı LNCaP-HPR hücre hattında 3. 30 günün sonunda 2.03-kat direnç geliştiği tespit edildi.

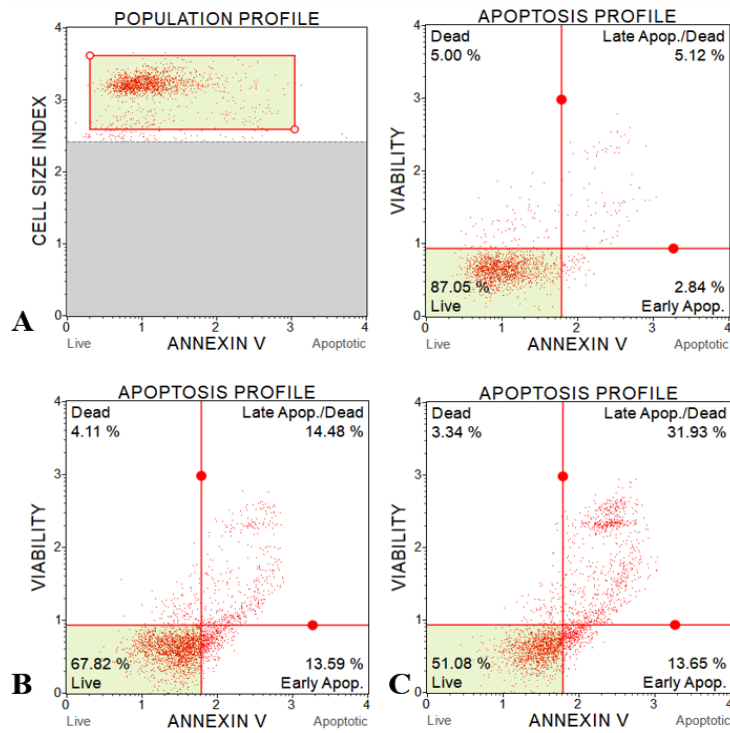
Tablo 6. Her bir 30 günlük periyot sonunda LNCaP-HPR hücre hattında H₂O₂'ye karşı gelişen direnç katsayıları

H ₂ O ₂ konsantrasyonu (µM)	Direnç katsayısı		
	1. 30 gün	2. 30 gün	3. 30 gün
25	1.1	1.14	1.20
50	1.31	1.54	1.74
100	1.29	1.85	2.03
250	0.93	1.06	1.14

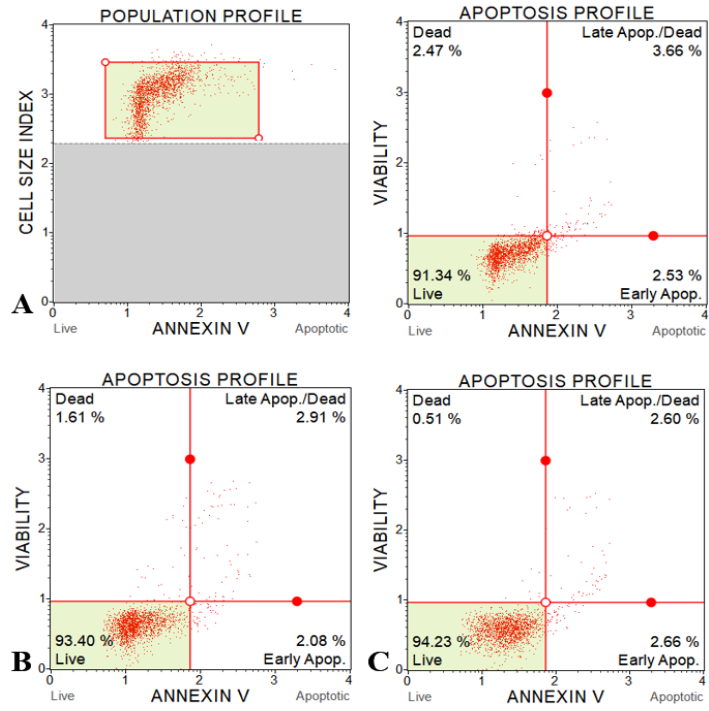
Tablo 6'da gösterildiği üzere 3. 30 günün sonunda LNCaP-HPR hücre hattında en yüksek katsayıda direnç geliştiği belirlenen 50 µM ve 100 µM H₂O₂ doz gruplarının 24 saatlik uygulamaları ile parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında direnç validasyon deneyleri gerçekleştirildi.

4.1.2. Hücre ölümü analizleri

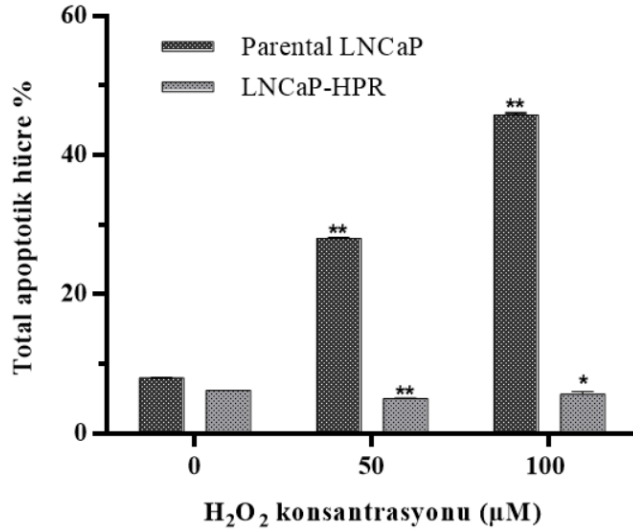
Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 μ M ve 100 μ M H₂O₂ uygulanması sonucu elde edilen Annexin V analizi verilerine göre parental LNCaP hücre hattında doz artışına bağlı total apoptotik hücre oranı sırası ile %28.07 ($p<0.01$) ve %45.6 ($p<0.01$) olarak saptanırken (Şekil 46), aynı dozlarda LNCaP-HPR hücre hattında total apoptotik hücre oranı %4.9 ($p<0.01$) ve %5.26 ($p<0.05$) olarak belirlendi (Şekil 47). H₂O₂'nin parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi Şekil 48'da gösterildi.



Şekil 46. H₂O₂'nin parental LNCaP hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 50 μ M (C) 100 μ M



Şekil 47. H₂O₂'nin LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 50 µM (C) 100 µM



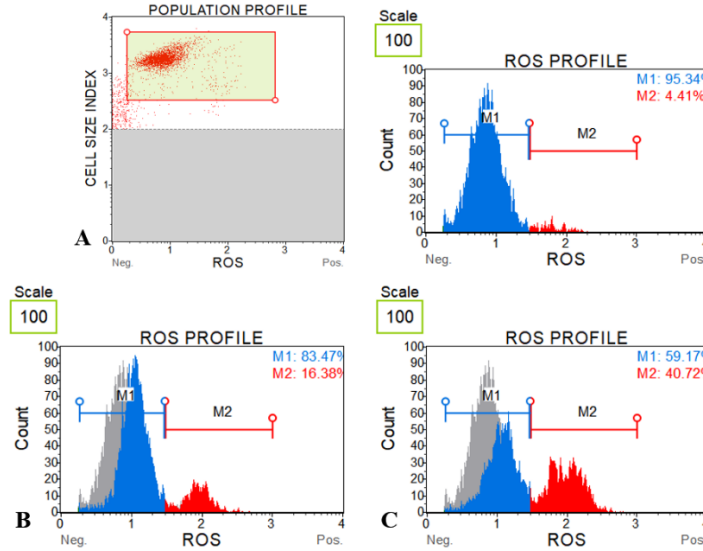
Şekil 48. H₂O₂'nin parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.1.3. Oksidatif stres analizleri

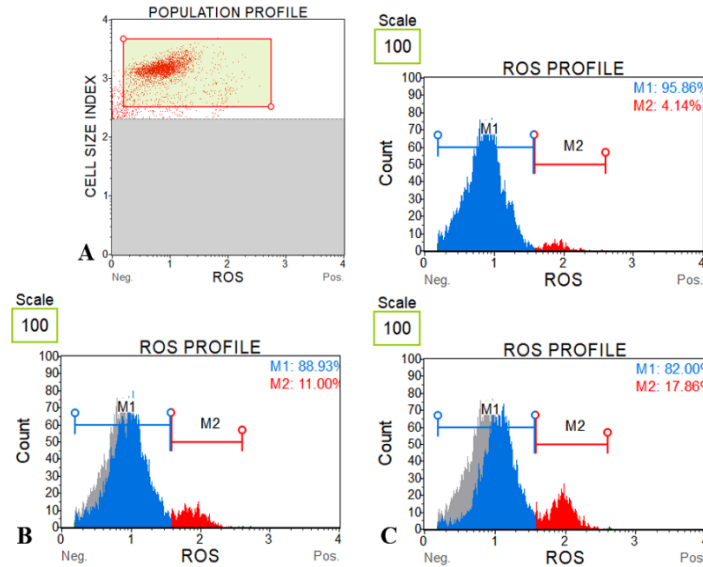
4.1.3.1. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında oksidatif stresin akış sitometrik analizi

Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulanması sonucu elde edilen oksidatif stres analizi sonuçlarına göre

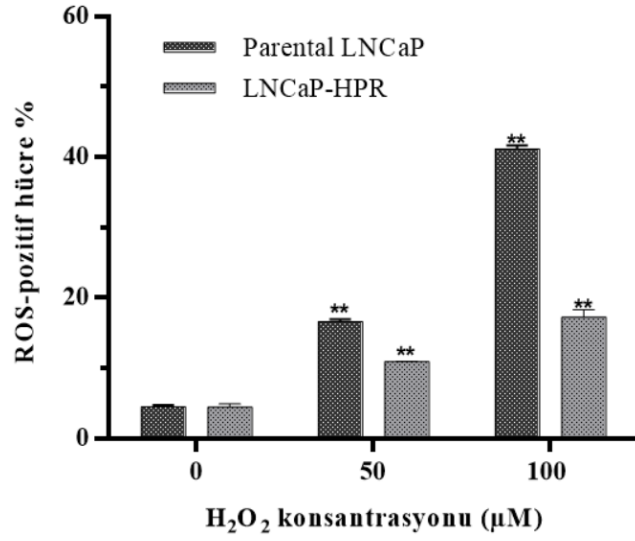
parental LNCaP hücre hattında doz artışına bağlı ROS-pozitif hücre oranı sırası ile %16.4 ($p<0.01$) ve %40.7 ($p<0.01$) olarak saptanırken (Şekil 49), aynı dozlarda LNCaP-HPR hücre hattında ROS-pozitif hücre oranı %11 ($p<0.01$) ve %17.8 ($p<0.05$) olarak belirlendi (Şekil 50). H_2O_2 'nin parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik ROS birikimine etkisinin istatistiksel analizi Şekil 51'de gösterildi.



Şekil 49. H_2O_2 'nin parental LNCaP hücre hattında 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 50 µM (C) 100 µM



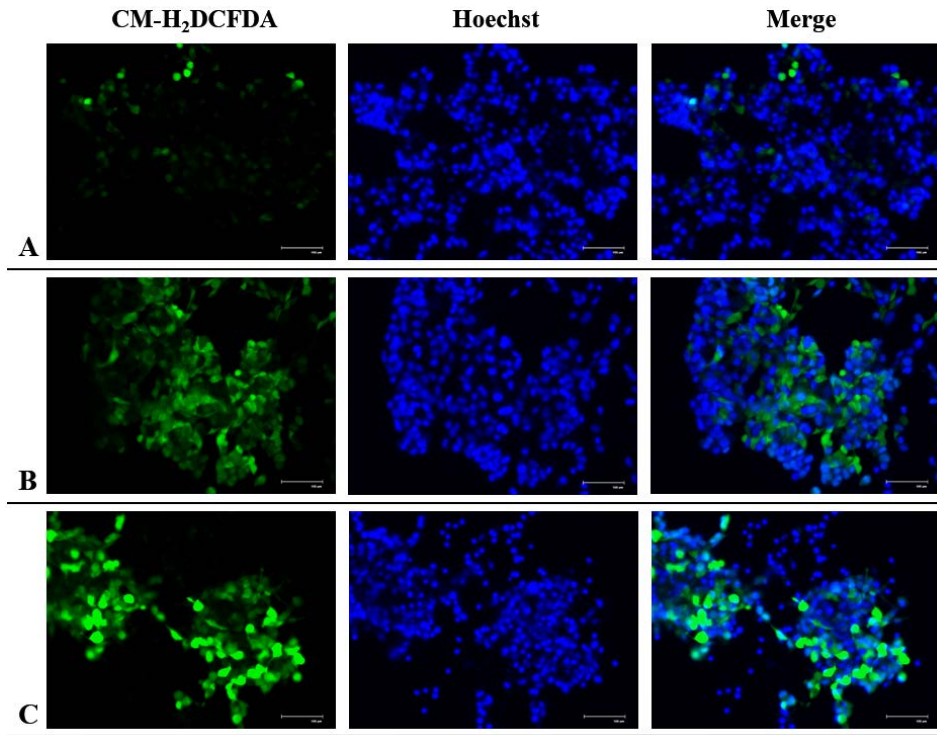
Şekil 50. H_2O_2 'nin LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 50 µM (C) 100 µM



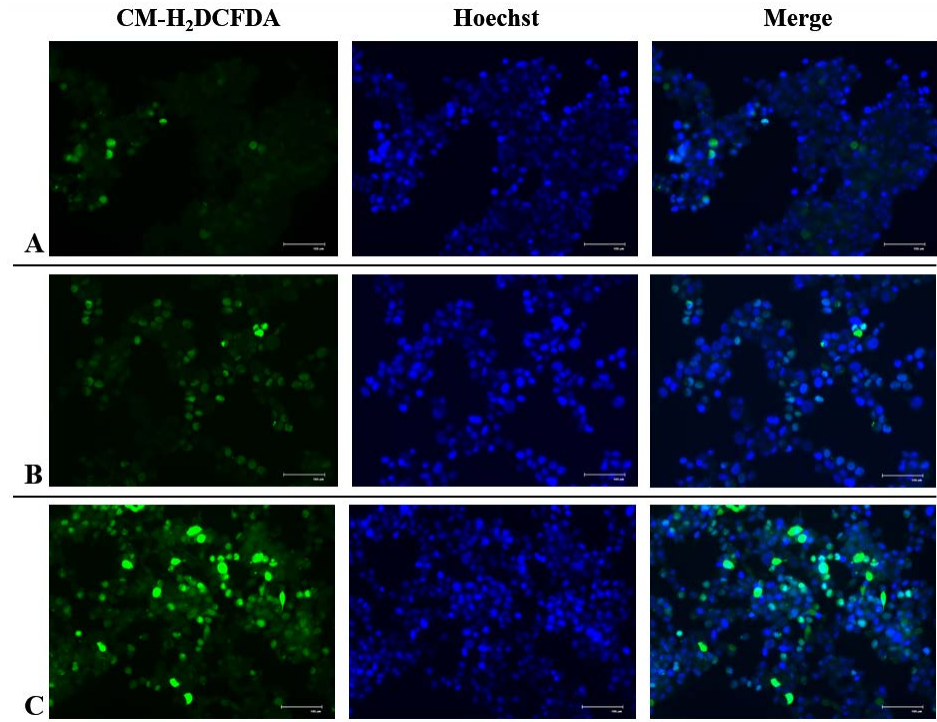
Şekil 51. H₂O₂'nin parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$).

4.1.3.2. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında intrasellüler ROS miktarının görüntülenmesi

Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulanması sonrasında intrasellüler ROS düzeyindeki değişimler incelendi. Parental LNCaP hücre hattında kontrol grubu ile kıyaslandığında artan H₂O₂ dozuna bağlı olarak nükleus bütünlüğü korunan hücre popülasyonu içerisinde yeşil floresan ışımaya veren hücre oranında belirgin artış saptandı (Şekil 52). Doza bağlı yeşil floresan ışımaya yoğunluğundaki artış intrasellüler H₂O₂ birikimi lehine yorumlandı. Bu durum, parental LNCaP hücre hattında H₂O₂'e yanıt olarak intrasellüler oksidatif stres düzeyindeki artışı doğruladı. LNCaP-HPR hücre hattında ise nükleus bütünlüğü korunan hücre popülasyonu içerisinde yeşil floresan ışımaya veren hücre yoğunluğundaki doza bağlı artışın daha az düzeyde olduğu gözlemlendi (Şekil 53). Elde edilen görüntüler LNCaP-HPR hücre hattında aynı doz ve sürede H₂O₂ uygulaması sonrasında oksidatif stres düzeyindeki artışın daha az seviyede olduğuna işaret etti.

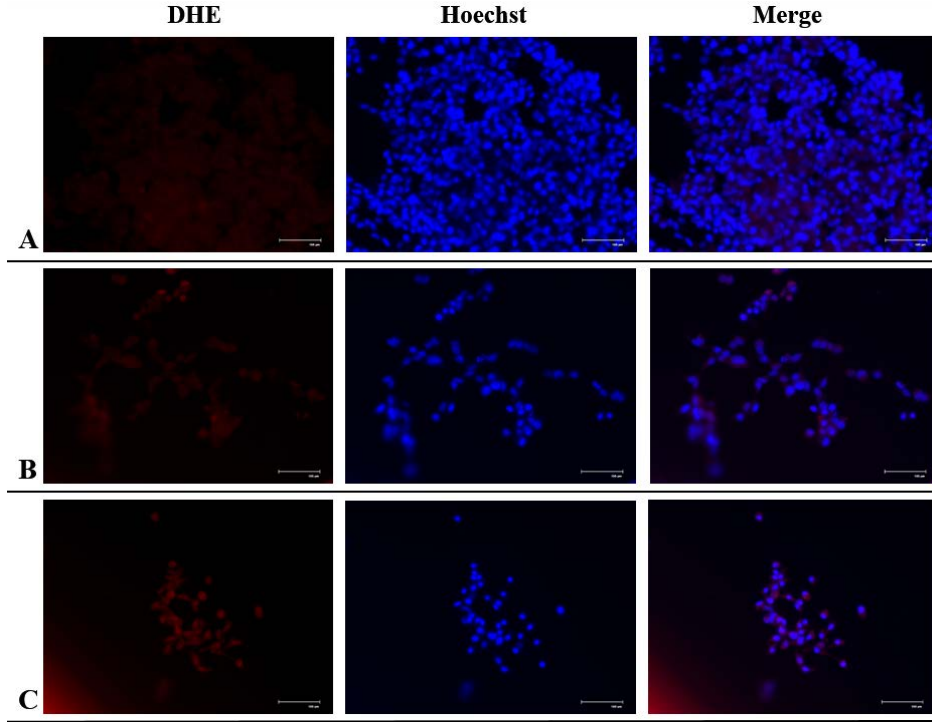


Şekil 52. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan parental LNCaP hücre hattında intrasellüler H₂O₂ birikiminin floresan mikroskopik analizi (A) Kontrol (B) 50 µM (C) 100 µM

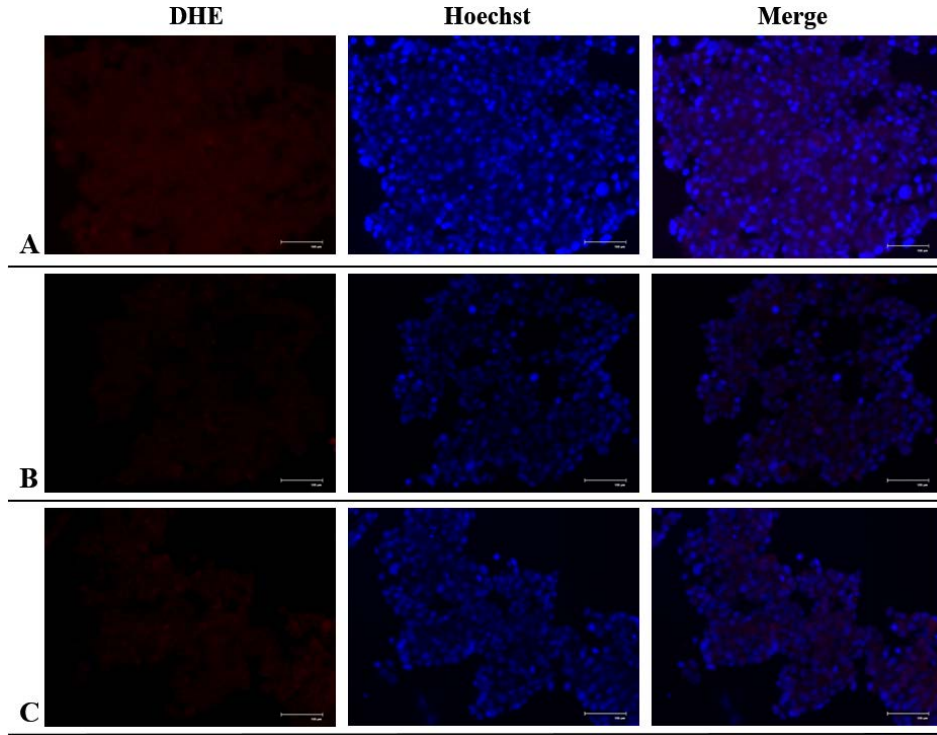


Şekil 53. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan LNCaP-HPR hücre hattında intrasellüler H₂O₂ birikiminin floresan mikroskopik analizi (A) Kontrol (B) 50 µM (C) 100 µM

Hücrelerde intrasellüler süperoksit düzeyindeki değişimler incelendiğinde benzer şekilde parental LNCaP hücrelerinde kırmızı floresan miktarının doza bağlı olarak arttığı ve total hücre popülasyonu içerisinde kırmızı ışığa veren hücre oranının LNCaP-HPR hücre hattına kıyasla doza bağlı daha fazla artış gösterdiği belirlendi (Şekil 54 ve Şekil 55). Mikroskobik veriler, akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu bulundu.



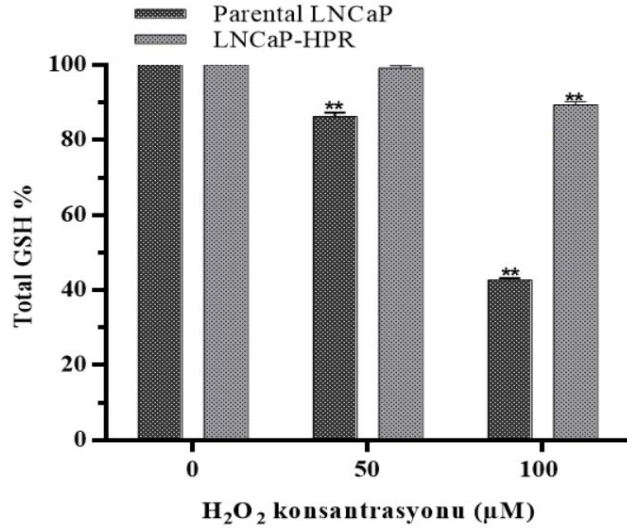
Şekil 54. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan parental LNCaP hücre hattında intrasellüler süperoksit birikiminin floresan mikroskobik analizi (A) Kontrol (B) 50 µM (C) 100 µM



Şekil 55. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan LNCaP-HPR hücre hattında intrasellüler süperoksit birikiminin floresan mikroskopik analizi (A) Kontrol (B) 50 µM (C) 100 µM

4.1.4. Total GSH miktarındaki değişimlerin belirlenmesi

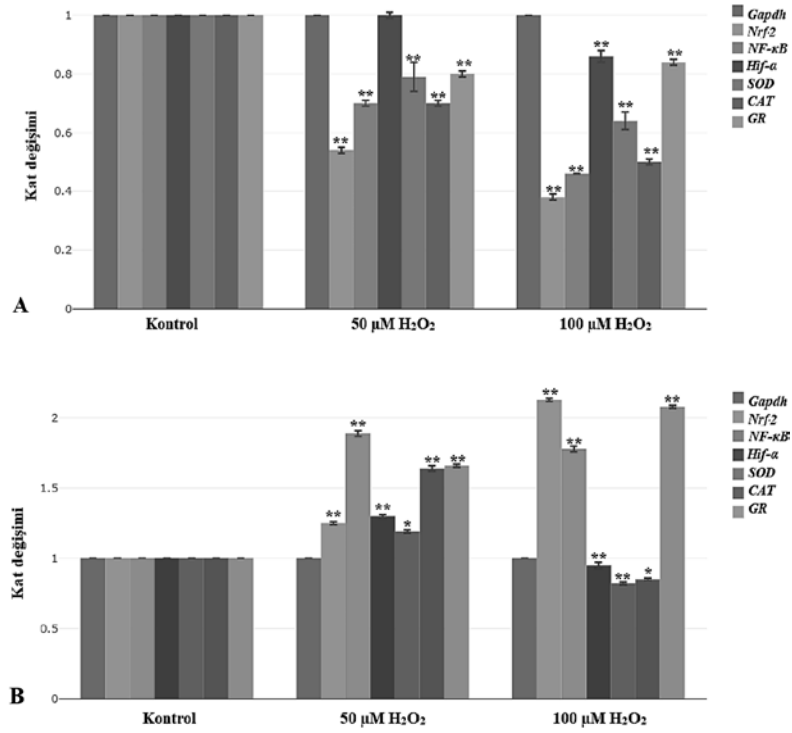
Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulanması sonrasında total GSH miktarındaki değişimler analiz edildi. Elde edilen verilere göre parental LNCaP hücre hattında GSH miktarının doza bağlı olarak sırası ile %86.7 ($p<0.01$) ve %42.5'e ($p<0.01$), LNCaP-HPR hücre hattında ise aynı sürede ve dozlarda H₂O₂ muamelesinden sonra total GSH miktarının %98.6 ve %88.2'ye ($p<0.01$) azaldığı tespit edildi. H₂O₂'nin parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik total GSH miktarı üzerine etkisinin istatistiksel analizi Şekil 56'da gösterildi.



Şekil 56. H₂O₂'nin parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik total GSH miktarı üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$).

4.1.5. Gen ekspresyonu analizleri

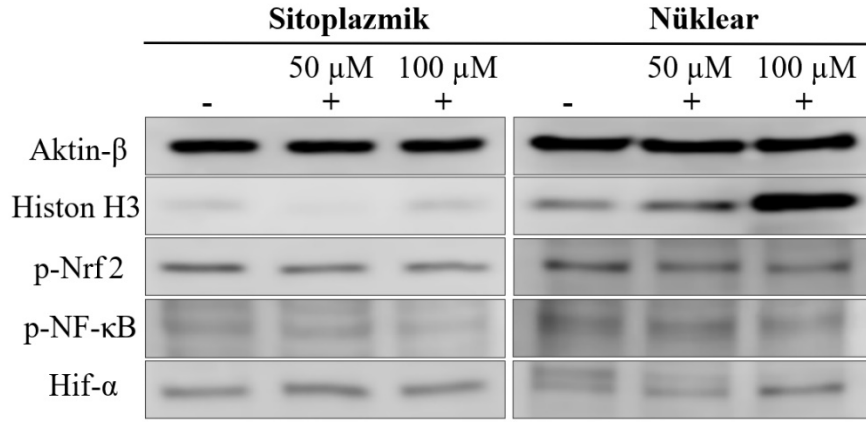
Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulanması sonrasında redoks adaptasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörleri *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* ile major antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin mRNA düzeyindeki değişimler araştırıldı. Gen ekspresyon verileri, parental LNCaP hücre hattında 50 µM ve 100 µM H₂O₂'nin analiz edilen tüm genlerin ekspresyon seviyesini farklı kat değişimlerinde baskıladığını, daha belirgin olarak ise doza bağlı sırasıyla *Nrf2* geninde 1.84-kat ($p < 0.01$) ve 2.66-kat ($p < 0.01$); *NF-κB* geninde 1.43-kat ve 2.18-kat, *CAT* geninde 1.42-kat ve 2.01-kat anlamlı azalmaya neden olduğunu ortaya koydu (Şekil 57_A). LNCaP-HPR hücre hattında gen ekspresyon verileri değerlendirildiğinde ise 50 µM H₂O₂'nin analiz edilen tüm genlerin ekspresyon seviyesini farklı kat değişimlerinde arttırdığı ve 100 µM H₂O₂ uygulanması sonucu ise *Nrf2*, *NF-κB* ve *GR* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış olduğu belirlendi. 100 µM H₂O₂'nin *Nrf2* geninde 2.13-kat ($p < 0.01$), *NF-κB* geninde 1.78-kat ($p < 0.01$) ve *GR* geninde 2.08-kat ($p < 0.01$) anlamlı artışa neden olduğu saptandı (Şekil 57_B). H₂O₂'nin parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik gen ekspresyon seviyelerine etkisi ve uygulama sonrasındaki kat değişimlerinin istatistiksel analizi Şekil 57'de gösterildi.



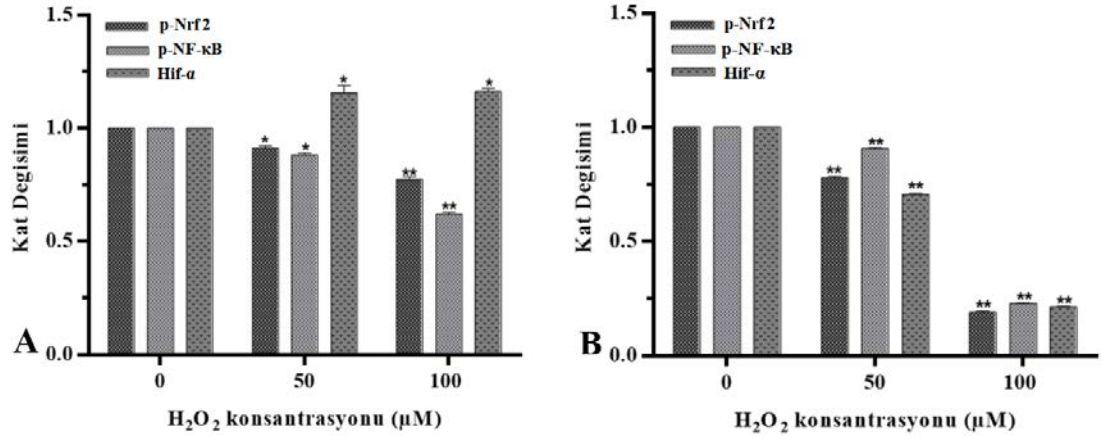
Şekil 57. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan (A) parental LNCaP ve (B) LNCaP-HPR hücre hatlarında değışen gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.1.6. Protein ekspresyonu analizleri

Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarına 24 saat boyunca 50 μ M ve 100 μ M H₂O₂ uygulanması sonrasında redoks adaptasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörleri p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α 'nın sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde parental LNCaP hücre hattında 100 μ M H₂O₂ uygulaması sonucu sitoplazmik p-Nrf2 seviyesinde 1.65-kat ($p < 0.01$), sitoplazmik p-NF- κ B seviyesinde 1.87-kat ($p < 0.01$) azalma saptanırken, sitoplazmik Hif- α seviyesinde 1.1-kat ($p < 0.05$) artış belirlendi (Şekil 58). Proteinlerin aynı dozda nükleer ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde ise p-Nrf2 seviyesinin 5.26-kat ($p < 0.01$), p-NF- κ B seviyesinin 4.4-kat ($p < 0.01$) ve Hif- α seviyesinin 4.2-kat ($p < 0.01$) azaldığı tespit edildi (Şekil 58). 24 saatlik H₂O₂ uygulanan parental LNCaP hücre hattında değışen sitoplazmik ve nükleer protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi Şekil 59'da gösterildi.

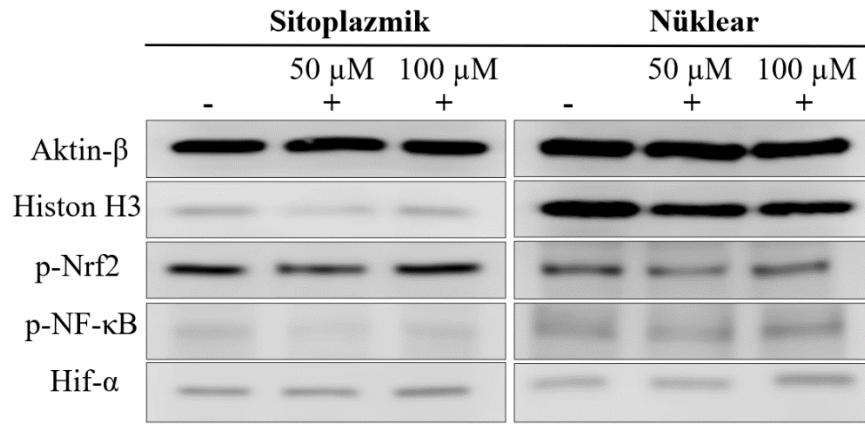


Şekil 58. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan parental LNCaP hücre hattında değişen sitoplazmik ve nüklear protein ekspresyon seviyeleri

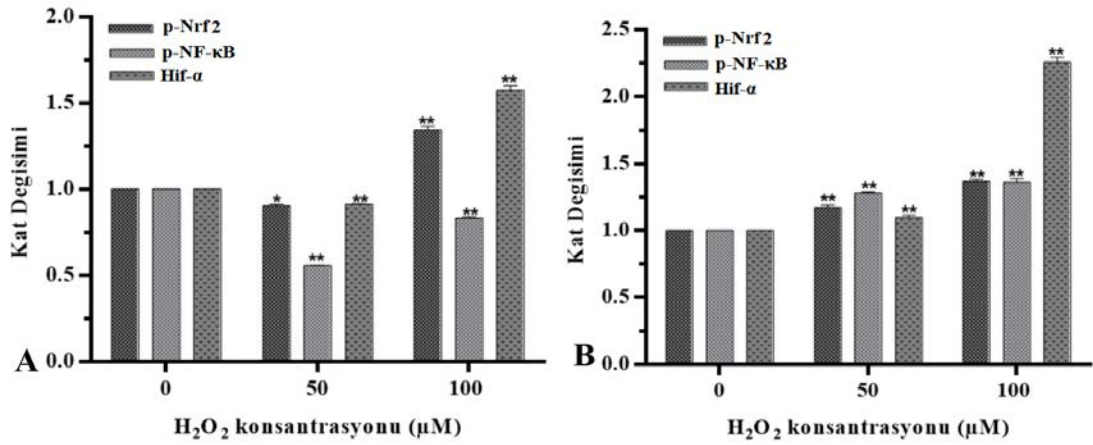


Şekil 59. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan parental LNCaP hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (* p <0.05, ** p <0.01).

LNCaP-HPR hücre hattında ise 100 μ M H₂O₂ uygulaması sonucu sitoplazmik p-Nrf2 seviyesinde 1.35-kat (p <0.01), sitoplazmik Hif- α seviyesinde 1.52-kat (p <0.01) artış, sitoplazmik p-NF- κ B seviyesinde ise 1.08-kat (p <0.01) azalma olduğu belirlendi (Şekil 60). Proteinlerin aynı dozda nüklear ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde ise p-Nrf2 seviyesinin 1.32-kat (p <0.01), p-NF- κ B seviyesinin 1.34-kat (p <0.01) ve Hif- α seviyesinin 2.20-kat (p <0.01) artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 60). 24 saatlik H₂O₂ uygulanan LNCaP-HPR hücre hattında değişen sitoplazmik ve nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi Şekil 61’de gösterildi.



Şekil 60. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan LNCaP-HPR hücre hattında değişen sitoplazmik ve nüklear protein ekspresyon seviyeleri



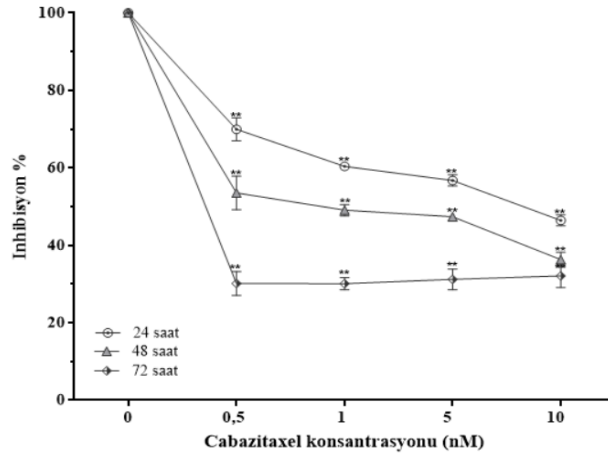
Şekil 61. 24 saatlik H₂O₂ uygulanan LNCaP-HPR hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (* p <0.05, ** p <0.01).

4.2. Sitotoksosite analizleri

4.2.1. Cabazitaxel'in sitotoksik etkisi

4.2.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi

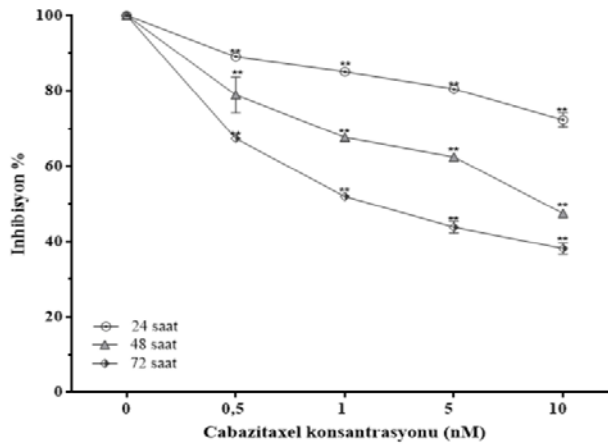
Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 0.5, 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %69.9, %60.3, %56.4 ve %46.6'ya (p <0.01); 48 saat için sırasıyla %52.9, %49.7, %47.3 ve %36.2'ye (p <0.01) ve 72 saat için sırasıyla %30.1, %30.0, %31.1 ve %32'ye (p <0.01) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 62). Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ değeri 8.16 nM ($y = -1,927x + 65,729$), 48 saatlik IC₅₀ değeri 1.97 nM ($y = -1,5916x + 53,138$) olarak hesaplandı.



Şekil 62. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi (** $p < 0.01$)

4.2.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi

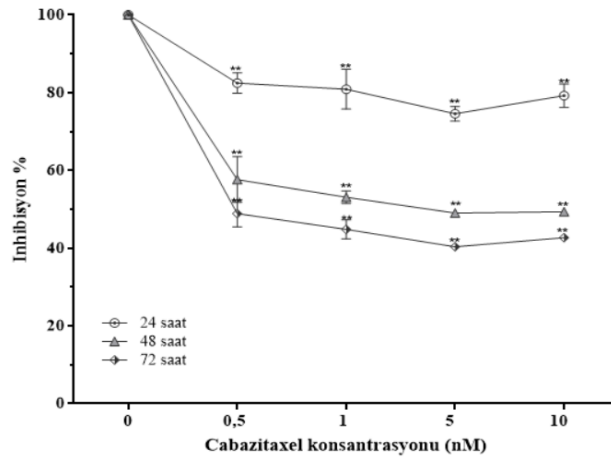
Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 0.5, 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %89, %85, %80.5 ve %72.3'e ($p < 0.01$); 48 saat için sırasıyla %78.9, %67.6, %62.4 ve %47.4'e ($p < 0.01$) ve 72 saat için sırasıyla %67.3, %51.9, %43.8 ve %38.1'e ($p < 0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 63). Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik IC_{50} değeri 23.9 nM ($y = -1,5991x + 88,296$), 48 saatlik IC_{50} değeri 9.11 nM ($y = -2,8217x + 75,715$) olarak hesaplandı.



Şekil 63. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi (** $p < 0.01$)

4.2.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi

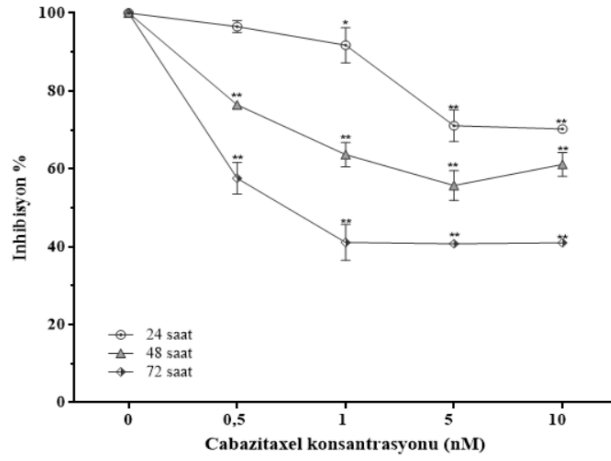
Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 0.5, 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %82.4, %80.8, %74.5 ve %79.2'ye ($p<0.01$); 48 saat için sırasıyla %57.6, %54.4, %52.3 ve %50.0'ye ($p<0.01$) ve 72 saat için sırasıyla %48.9, %44.8, %40.3 ve %42.6'ya ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 64). Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik IC_{50} değeri 87.11 nM ($y = -0,3522x + 80,683$), 48 saatlik IC_{50} değeri 9.46 nM ($y = -0,6775x + 56,412$) olarak hesaplandı.



Şekil 64. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi (** $p<0.01$)

4.2.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi

Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 0.5, 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %96.5, %91.5, %71.0 ve %70.2'ye ($p<0.05$, $p<0.01$); 48 saat için sırasıyla %76.1, %63.6, %55.7 ve %61.1'e ($p<0.01$) ve 72 saat için sırasıyla %57.4, %41.1, %40.7 ve %41'e ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 65). Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik IC_{50} değeri 17.11 nM ($y = -2,722x + 92,928$), 48 saatlik IC_{50} değeri 16.8 nM ($y = -0,8501x + 64,284$) olarak hesaplandı.

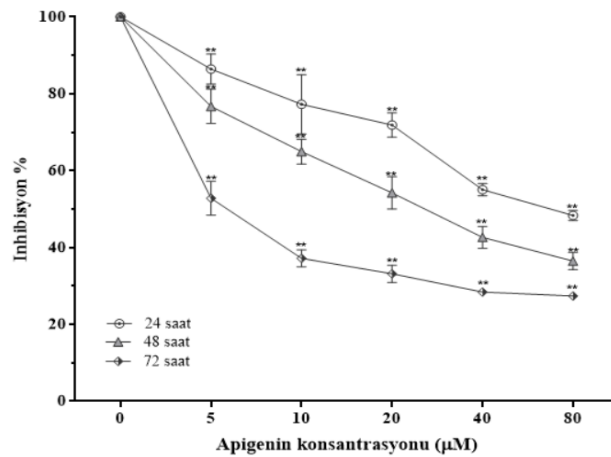


Şekil 65. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.2.2. Apigenin'in sitotoksik etkisi

4.2.2.1. Apigenin'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi

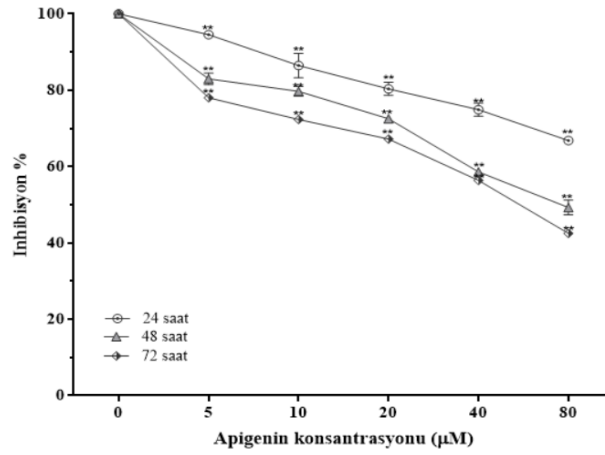
Apigenin'in LNCaP hücre hattında 5, 10, 20, 40 ve 80 μM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %85.3, %75.1, %72.5, %55.1 ve %48.4'e ($p<0.01$); 48 saat için sırasıyla %76.6, %64.5, %55.3, %42.2 ve %36.4'e ($p<0.01$) ve 72 saat için sırasıyla %53.8, %36.9, %33.3, %28.4 ve %27.3'e ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 66). Apigenin'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik IC_{50} değeri 68.4 μM ($y = -0,4621x + 81,626$), 48 saatlik IC_{50} değeri 29.3 μM ($y = -0,9094x + 76,692$) olarak hesaplandı.



Şekil 66. Apigenin'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi (** $p<0.01$)

4.2.2.2. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi

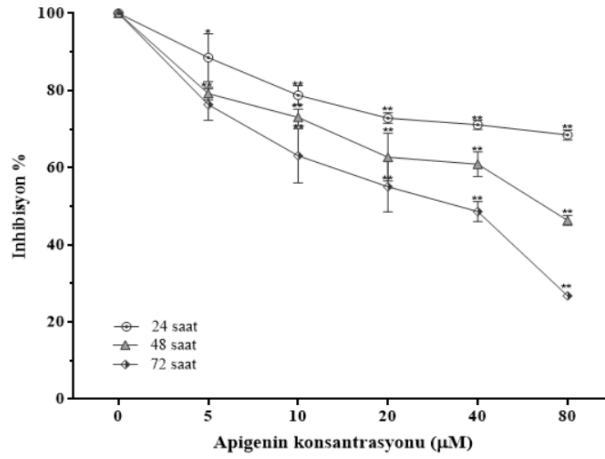
Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında 5, 10, 20, 40 ve 80 µM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %94.5, %86.4, %80.3, %74.9 ve %66.8'e ($p<0.01$); 48 saat için sırasıyla %82.9, %79.7, %72.5, %58.6 ve %49.2'ye ($p<0.01$) ve 72 saat için sırasıyla %78, %72.3, %67.2, %56.3 ve %42.5'e ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 67). Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ değeri 127 µM ($y = -0,3144x + 89,967$), 48 saatlik IC₅₀ değeri 52.2 µM ($y = -0,6976x + 86,504$) olarak hesaplandı.



Şekil 67. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi (** $p<0.01$)

4.2.2.3. Apigenin'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi

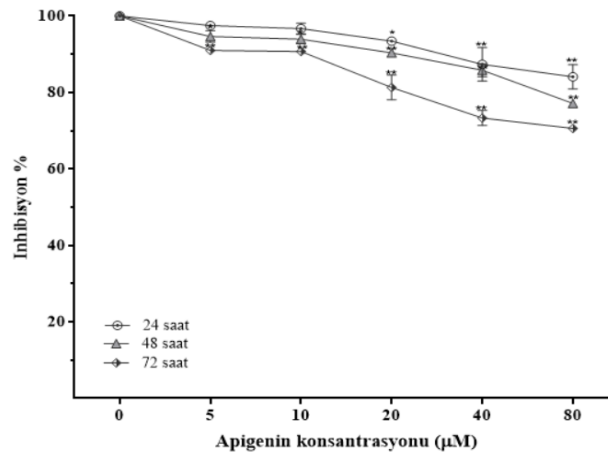
Apigenin'in C4-2 hücre hattında 5, 10, 20, 40 ve 80 µM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %88.5, %78.7, %72.8, %71.1 ve %68.4'e ($p<0.05$, $p<0.01$); 48 saat için sırasıyla %79.1, %72.8, %63.6, %60.1 ve %46.5'e ($p<0.01$) ve 72 saat için sırasıyla %76.3, %64.6, %54.4, %48.6 ve %26.9'a ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 68). Apigenin'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ değeri 84.3 µM ($y = -0,4231x + 85,675$), 48 saatlik IC₅₀ değeri 67.6 µM ($y = -0,394x + 76,663$) olarak hesaplandı.



Şekil 68. Apigenin'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.2.2.4. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi

Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında 5, 10, 20, 40 ve 80 µM dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 24 saat için sırasıyla %97.1, %96.7, %93.4, %87.3 ve %84'e ($p < 0.05$, $p < 0.01$); 48 saat için sırasıyla %94.2, %93.9, %90.3, %85.8 ve %77.1'e ($p < 0.05$, $p < 0.01$) ve 72 saat için sırasıyla %92.4, %90.7, %81.3, %73.3 ve %70.6'ya ($p < 0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 69). Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik IC_{50} değeri 162 µM ($y = -0,3134x + 100,81$), 48 saatlik IC_{50} değeri 195 µM ($y = -0,2339x + 95,593$) olarak hesaplandı.

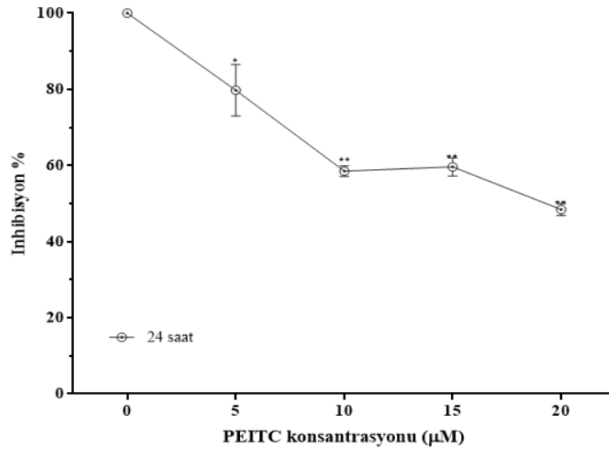


Şekil 69. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.2.3. PEITC'in sitotoksik etkisi

4.2.3.1. PEITC'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi

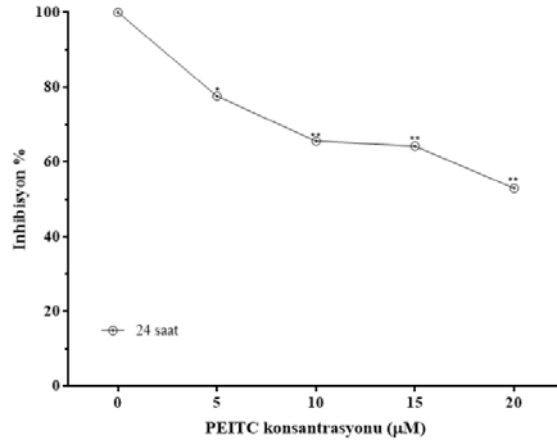
PEITC'in LNCaP hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 µM dozlarda 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %79.7, %58.5, %59.5 ve %48.4'e ($p<0.05$, $p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 70). PEITC'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ değeri 18.7 µM ($y = -1,858x + 84,75$) olarak hesaplandı.



Şekil 70. PEITC'in LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.2.3.2. PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi

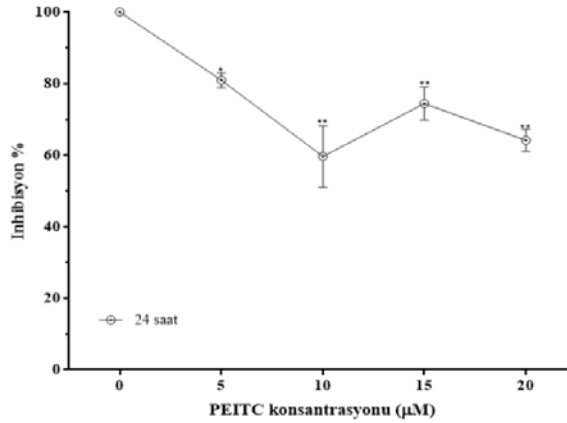
PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 µM dozlarda 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %78.5, %65.5, %64.2 ve %52.9'a ($p<0.05$, $p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 71). PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ değeri 22.2 µM ($y = -1,562x + 84,8$) olarak hesaplandı.



Şekil 71. PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.2.3.3. PEITC'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi

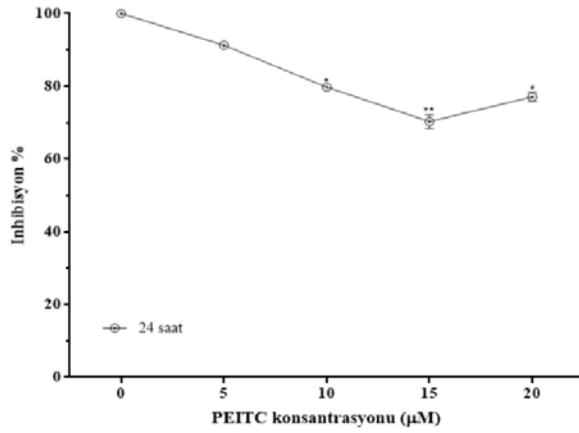
PEITC'in C4-2 hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 μM dozlarda 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %80.9, %59.6, %74.4 ve %68.3'e ($p < 0.05$, $p < 0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 72). PEITC'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ değeri 57.7 μM ($y = -0,46x + 76,55$) olarak hesaplandı.



Şekil 72. PEITC'in C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.2.3.4. PEITC'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi

PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 μM dozlarda 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %91.2, %79.7, %70.2 ve %77.1'e ($p < 0.05$, $p < 0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 73). PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ değeri 41 μM ($y = -1,036x + 92,5$) olarak hesaplandı.



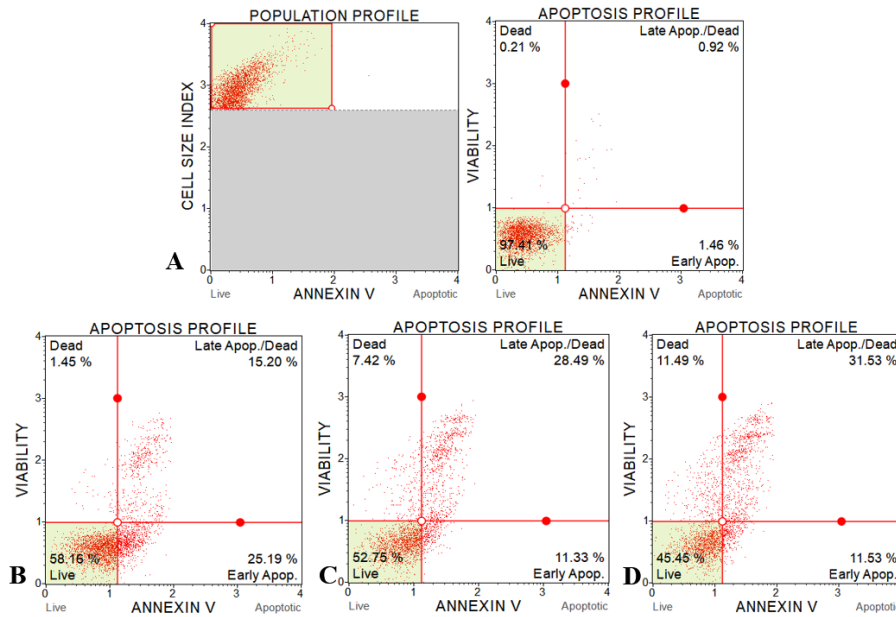
Şekil 73. PEITC'in RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.3. Apoptotik etkiler

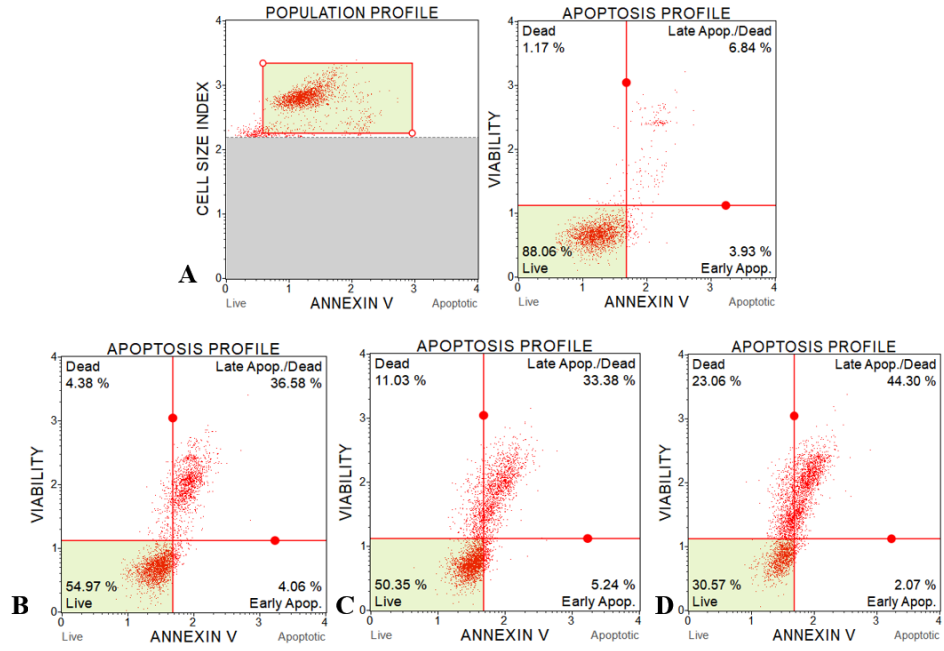
4.3.1. Cabazitaxel'in apoptotik etkisi

4.3.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi

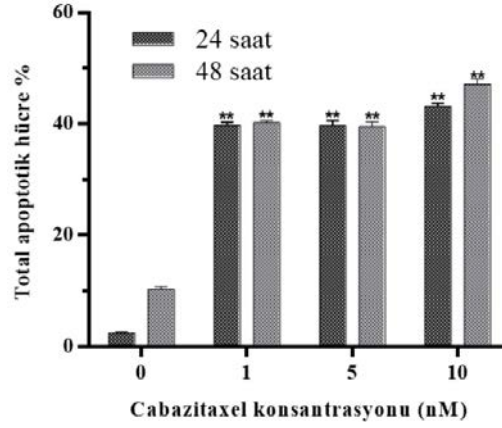
Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %40.4, %39.8 ve %43.6 (Şekil 74); 48 saat için sırasıyla %40.6, %38.6 ve %47 olarak belirlendi (Şekil 75). Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 76).



Şekil 74. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM



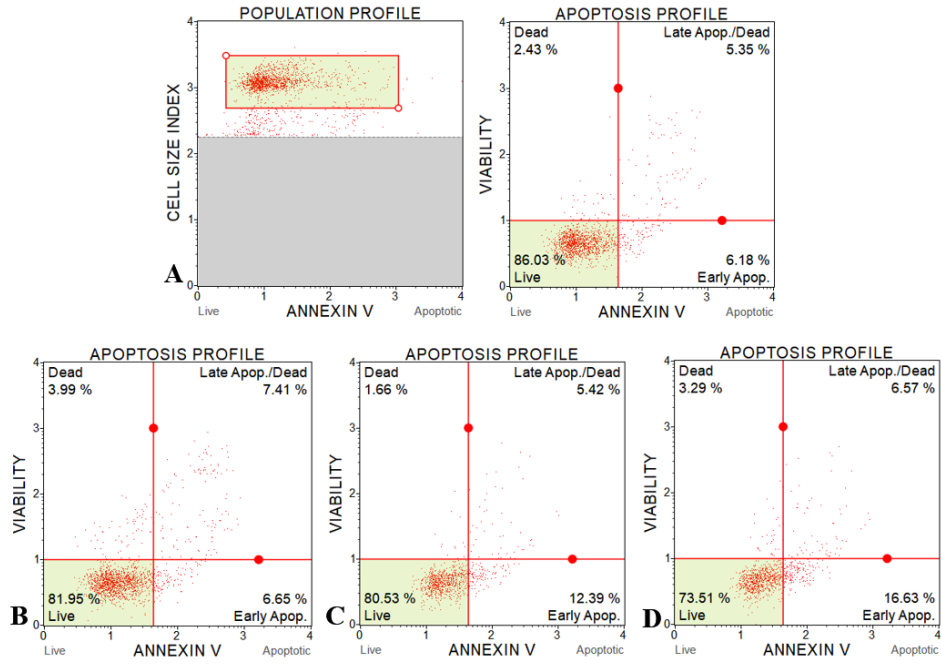
Şekil 75. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM



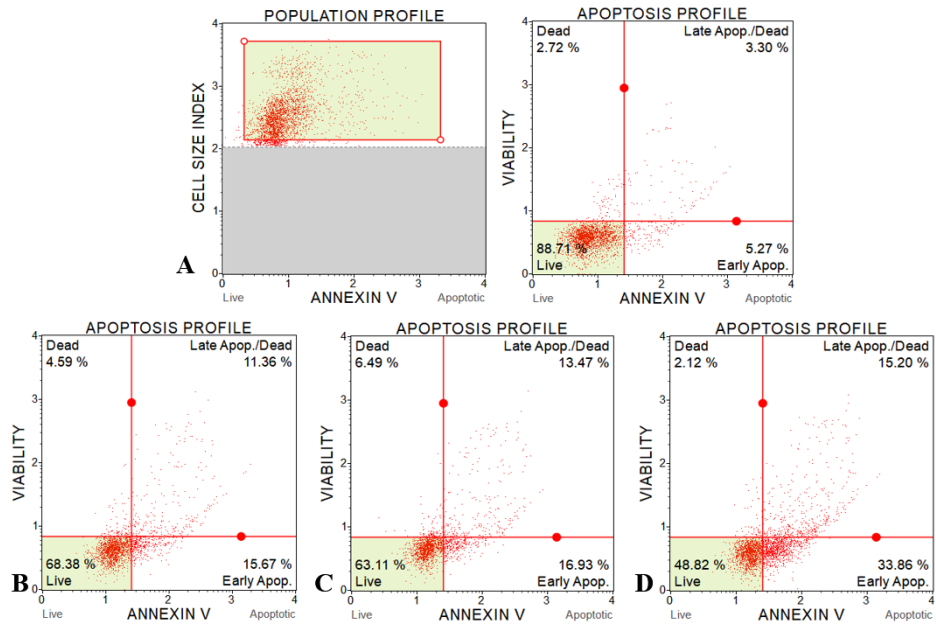
Şekil 76. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$).

4.3.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi

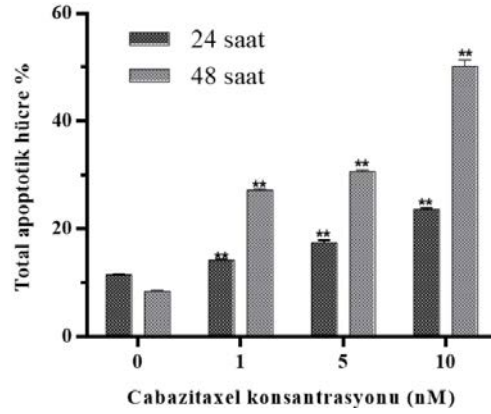
Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %14.06, %17.8 ve %23.2 (Şekil 77); 48 saat için sırasıyla %27.03, %30.4 ve %49.06 olarak belirlendi (Şekil 78). Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) bulundu (Şekil 79).



Şekil 77. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM



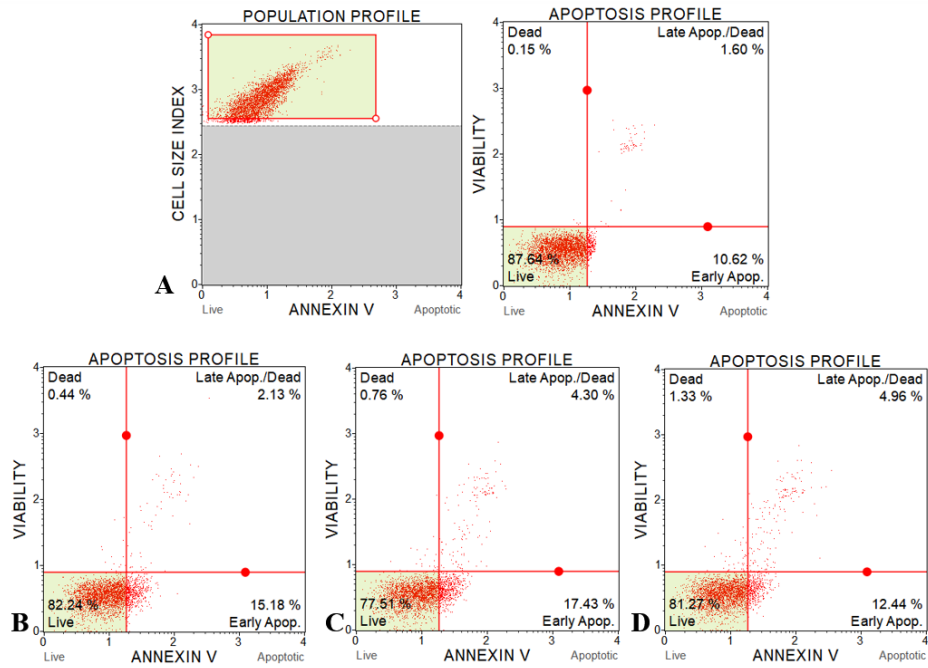
Şekil 78. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM



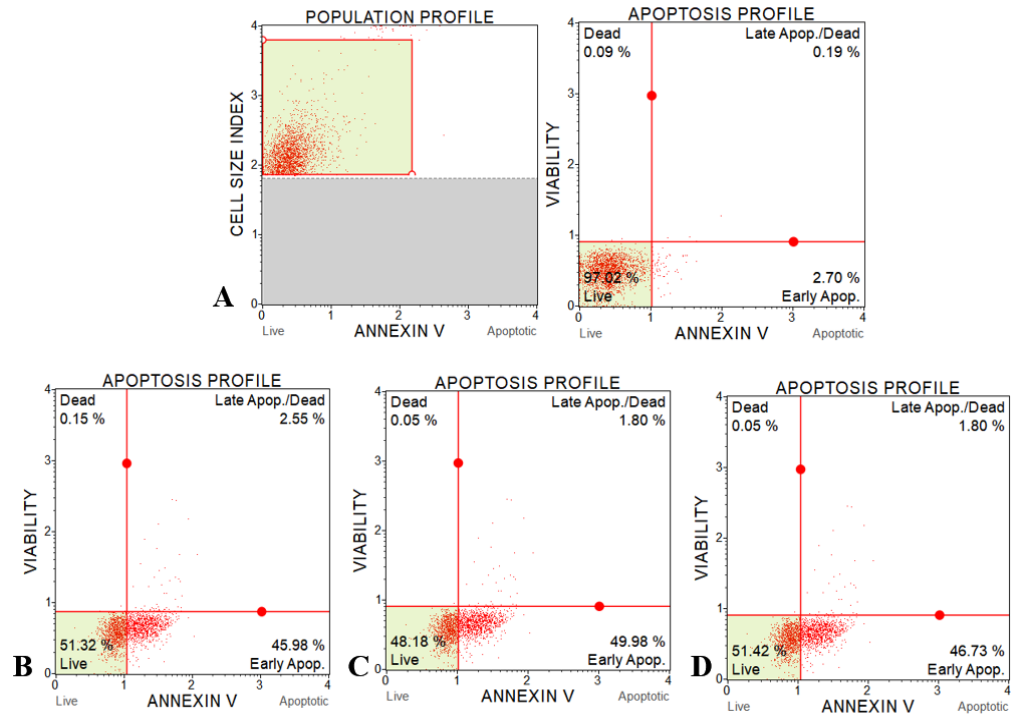
Şekil 79. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$).

4.3.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi

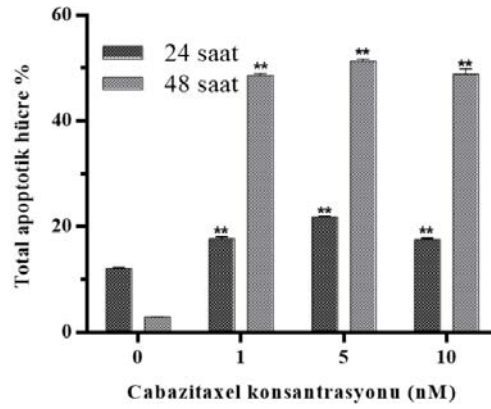
Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %17.3, %21.7 ve %17.4 (Şekil 80); 48 saat için sırasıyla %48.5, %51.8 ve %48.5 olarak belirlendi (Şekil 81). Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 82).



Şekil 80. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM



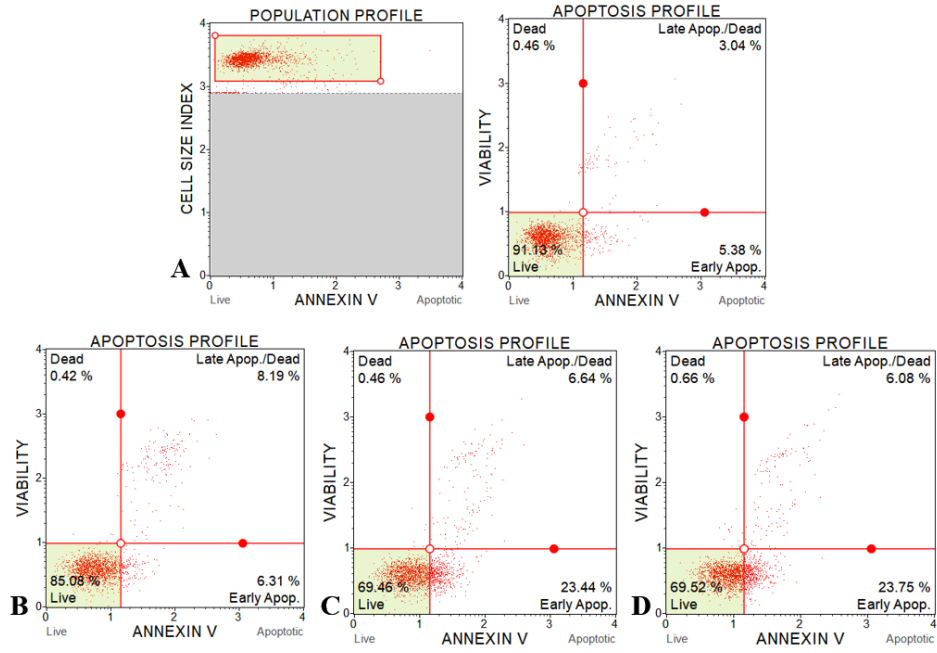
Şekil 81. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM



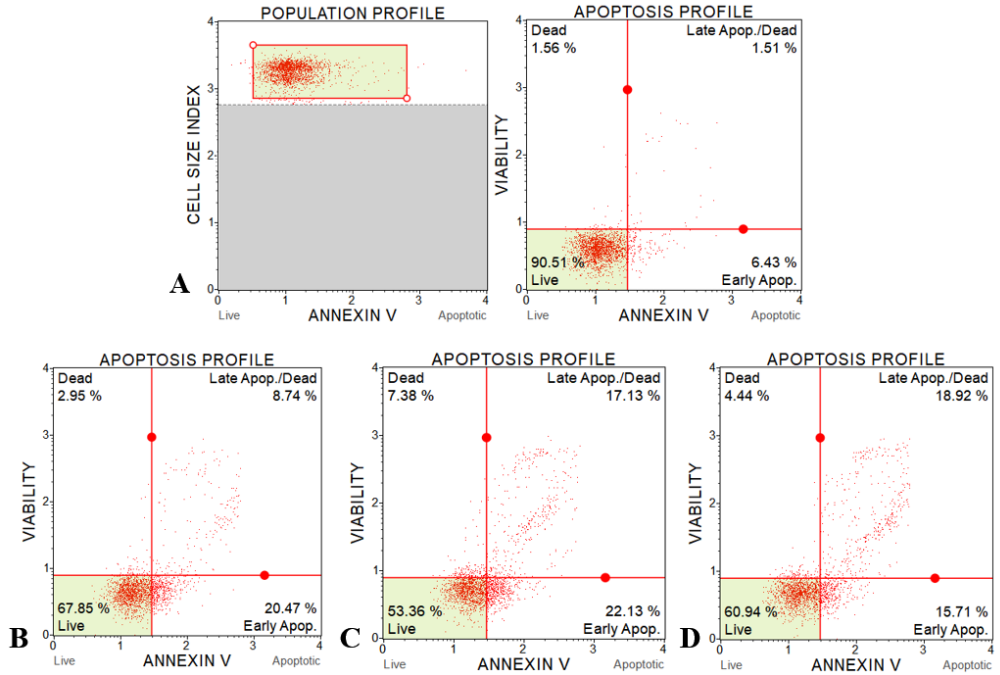
Şekil 82. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$).

4.3.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi

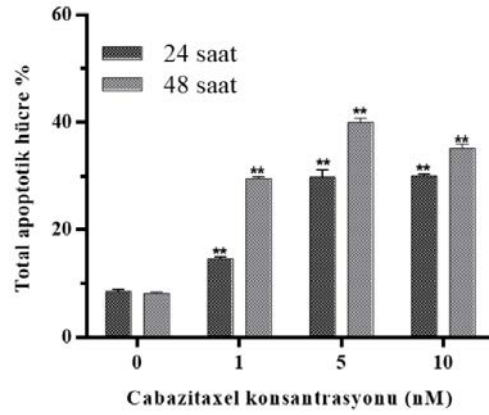
Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 1, 5 ve 10 nM dozlarda 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %14.5, %30.0 ve %29.8 (Şekil 83); 48 saat için sırasıyla %29.2, %39.3 ve %34.6 olarak belirlendi (Şekil 84). Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 85).



Şekil 83. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM



Şekil 84. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 1 nM (C) 5 nM (D) 10 nM

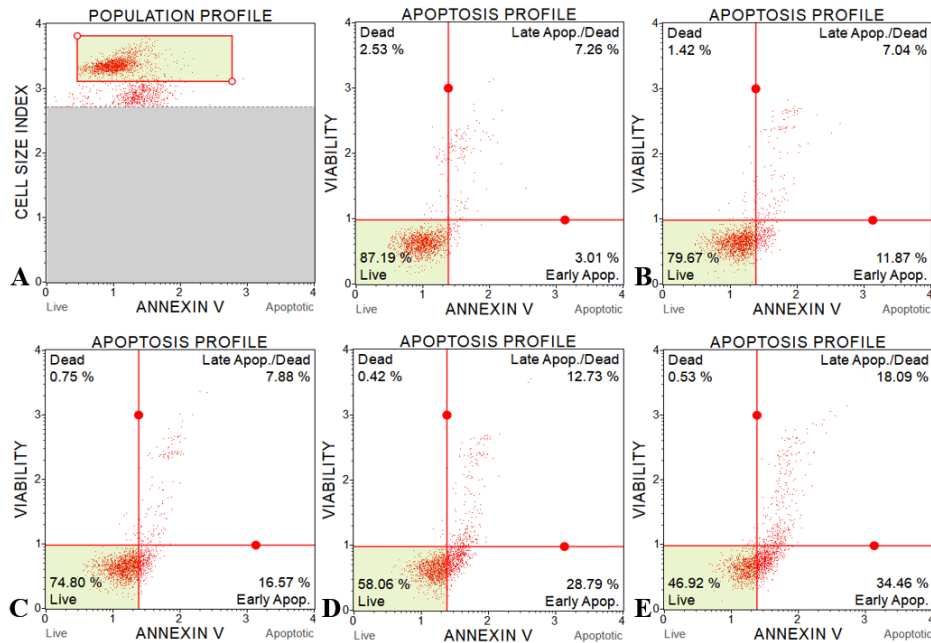


Şekil 85. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$).

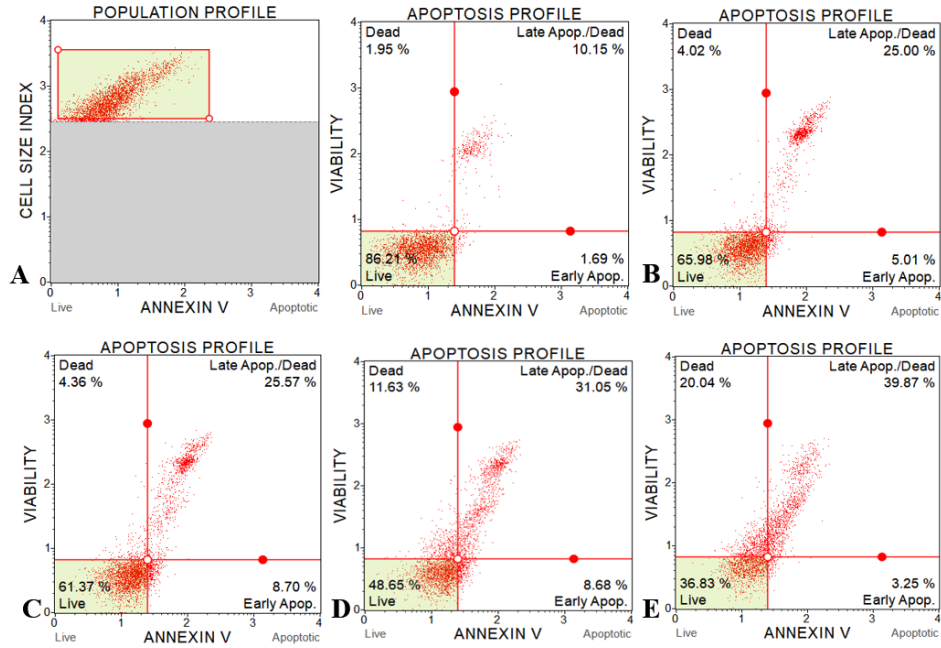
4.3.2. Apigenin'in apoptotik etkisi

4.3.2.1. Apigenin'in LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi

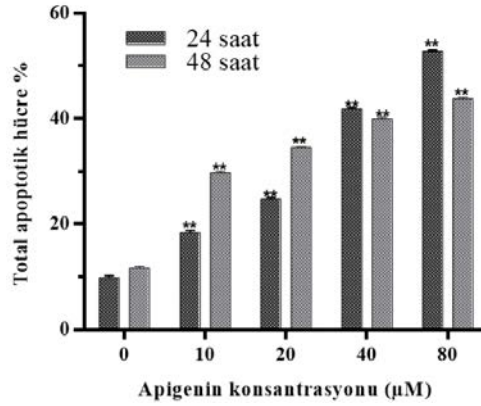
Apigenin'in LNCaP hücre hattında 10, 20, 40 ve 80 μM dozlarda 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %18.9, %24.5, %41.5 ve %52.5 (Şekil 86); 48 saat için sırasıyla %30.0, %34.3, %39.7 ve %43.6 olarak belirlendi (Şekil 87). Apigenin'in LNCaP hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 88).



Şekil 86. Apigenin'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 10 μM (C) 20 μM (D) 40 μM (E) 80 μM



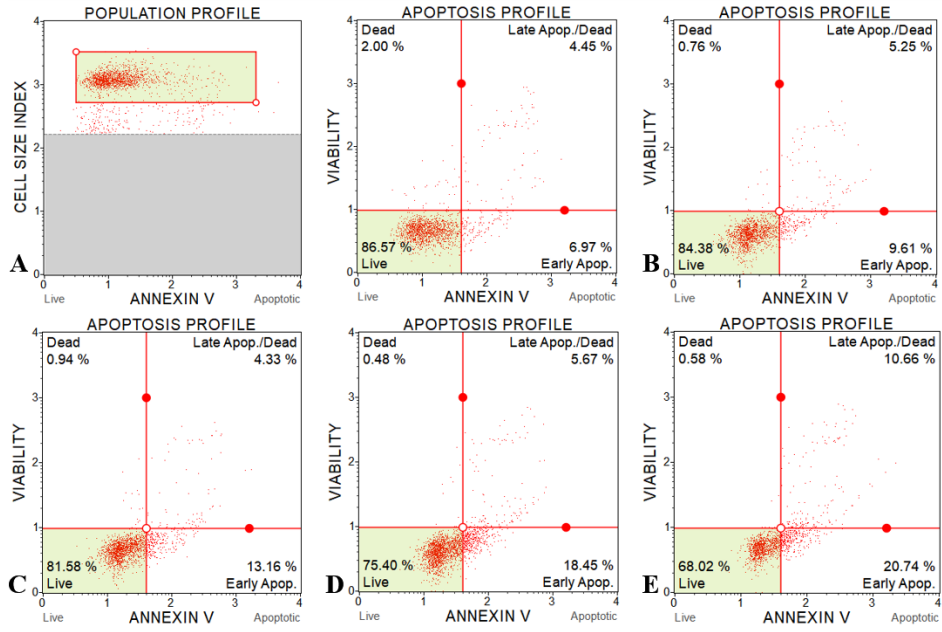
Şekil 87. Apigenin'in LNCaP hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 10 µM (C) 20 µM (D) 40 µM (E) 80 µM



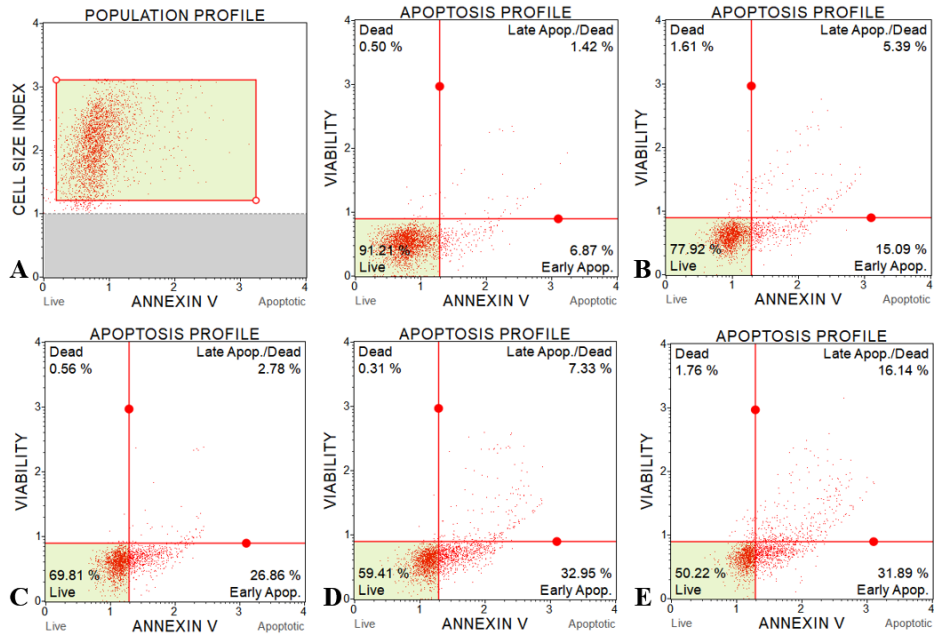
Şekil 88. Apigenin'in LNCaP hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$).

4.3.2.2. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi

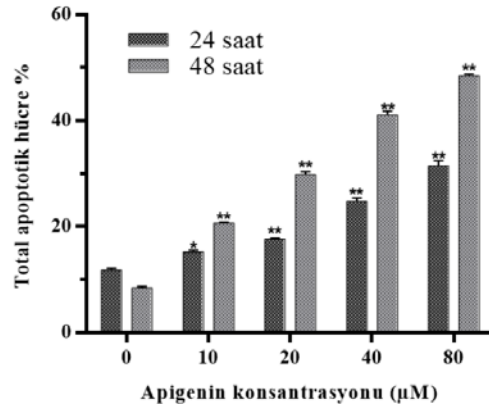
Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında 10, 20, 40 ve 80 µM dozlarında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %14.9, %17.5, %24.1 ve %31.4 (Şekil 89); 48 saat için sırasıyla %20.5, %29.6, %40.3 ve %48.03 olarak belirlendi (Şekil 90). Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $p < 0.01$) bulundu (Şekil 91).



Şekil 89. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 10 μ M (C) 20 μ M (D) 40 μ M (E) 80 μ M



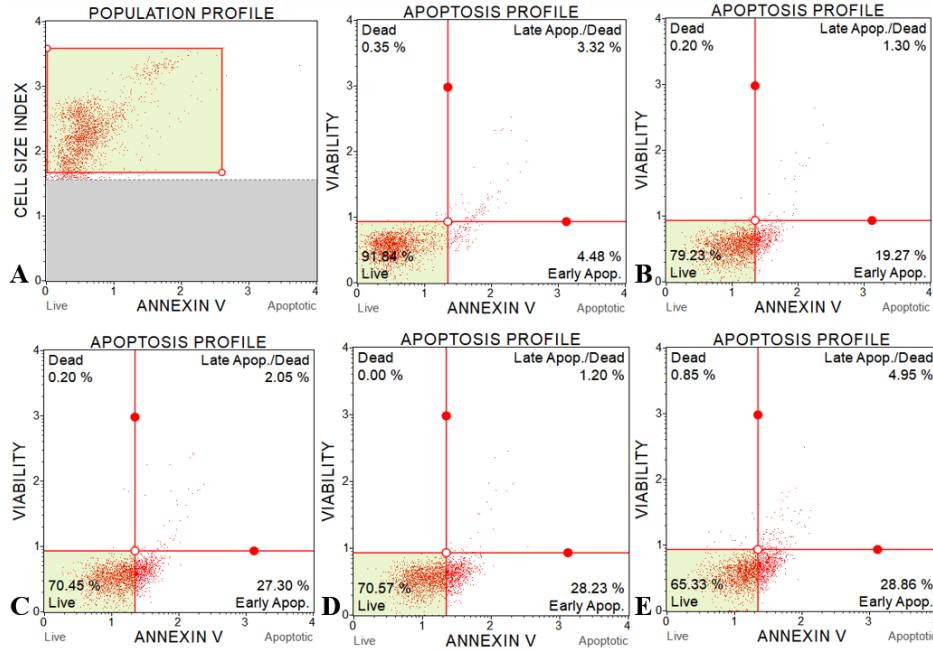
Şekil 90. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 10 μ M (C) 20 μ M (D) 40 μ M (E) 80 μ M



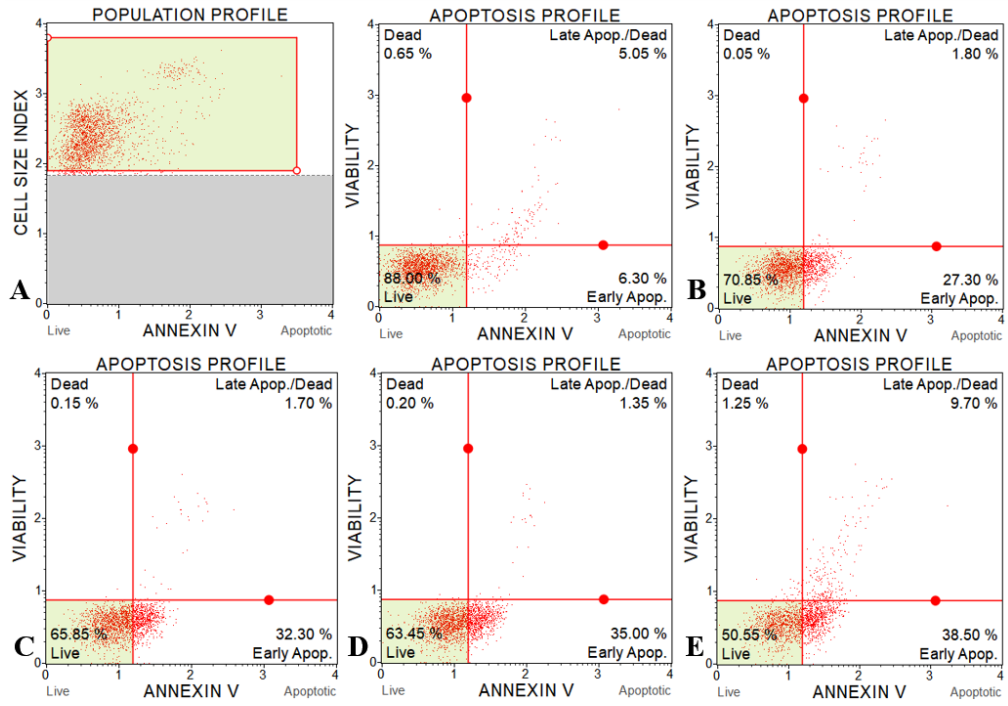
Şekil 91. Apigenin'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

4.3.2.3. Apigenin'in C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi

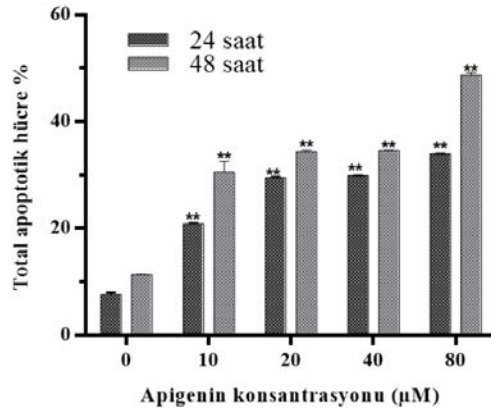
Apigenin'in C4-2 hücre hattında 10, 20, 40 ve 80 µM dozlarda 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %20.6, %29.3, %29.8 ve %33.9 (Şekil 92); 48 saat için sırasıyla %29.1, %34, %36.4 ve %48.2 olarak belirlendi (Şekil 93). Apigenin'in C4-2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 94).



Şekil 92. Apigenin'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 10 µM (C) 20 µM (D) 40 µM (E) 80 µM



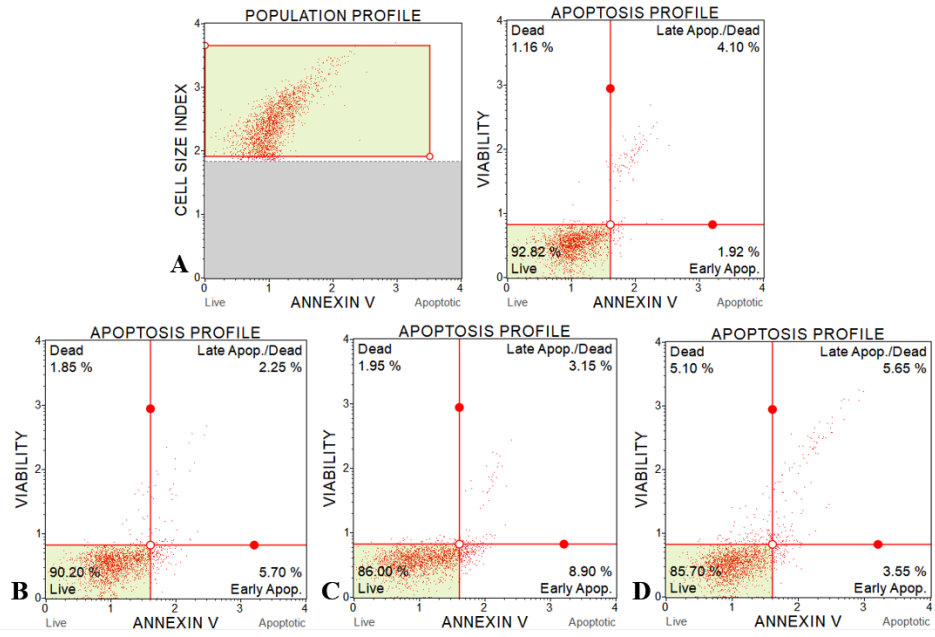
Şekil 93. Apigenin'in C4-2 hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 10 µM (C) 20 µM (D) 40 µM (E) 80 µM



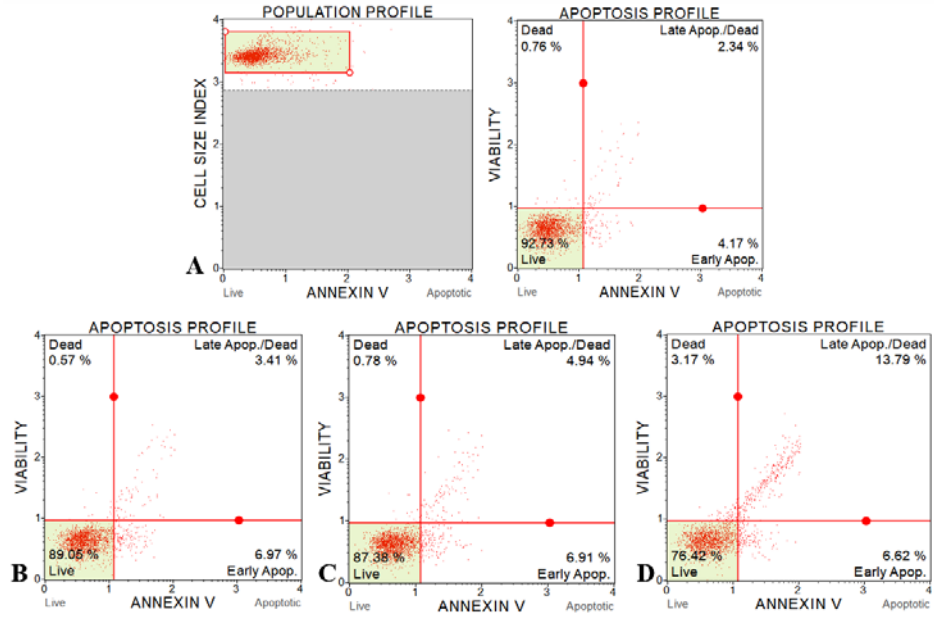
Şekil 94. Apigenin'in C4-2 hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$).

4.3.2.4. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi

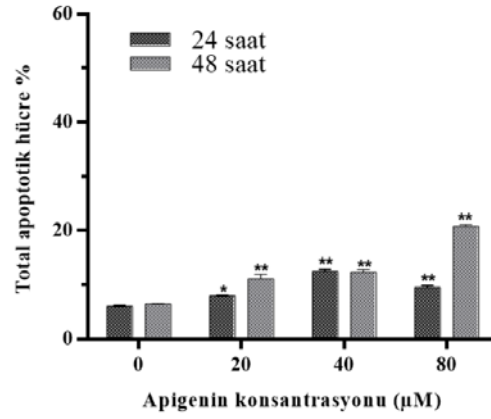
Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında 20, 40 ve 80 µM dozlarda 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları 24 saat için sırasıyla %7.9, %12 ve %9.3 (Şekil 95); 48 saat için sırasıyla %10.4, %11.9 ve %20.4 olarak belirlendi (Şekil 96). Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $p < 0.01$) bulundu (Şekil 97).



Şekil 95. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 20 μ M (C) 40 μ M (D) 80 μ M



Şekil 96. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında 48 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 20 μ M (C) 40 μ M (D) 80 μ M

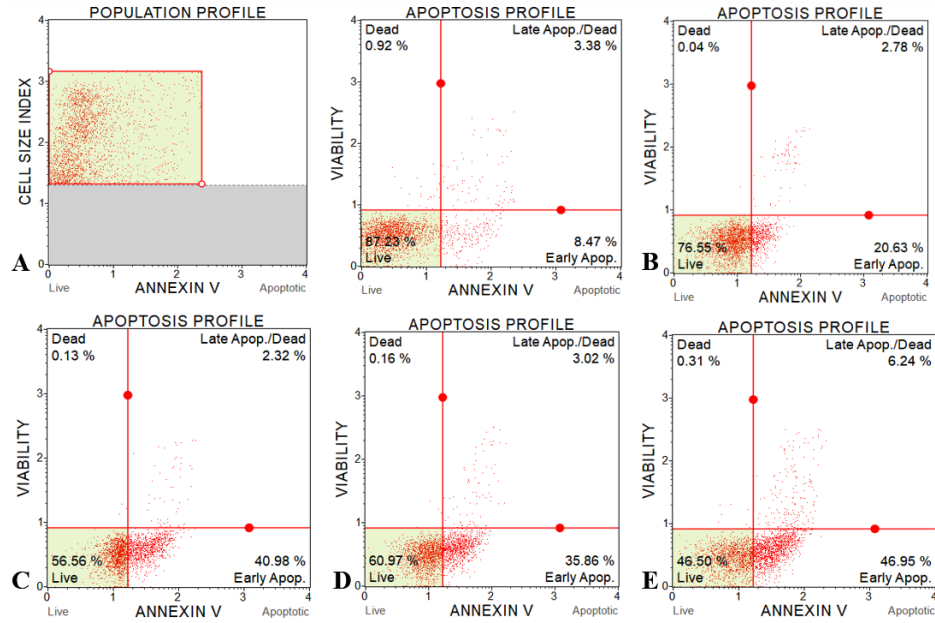


Şekil 97. Apigenin'in RWPE-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

4.3.3. PEITC'in apoptotik etkisi

4.3.3.1. PEITC'in LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi

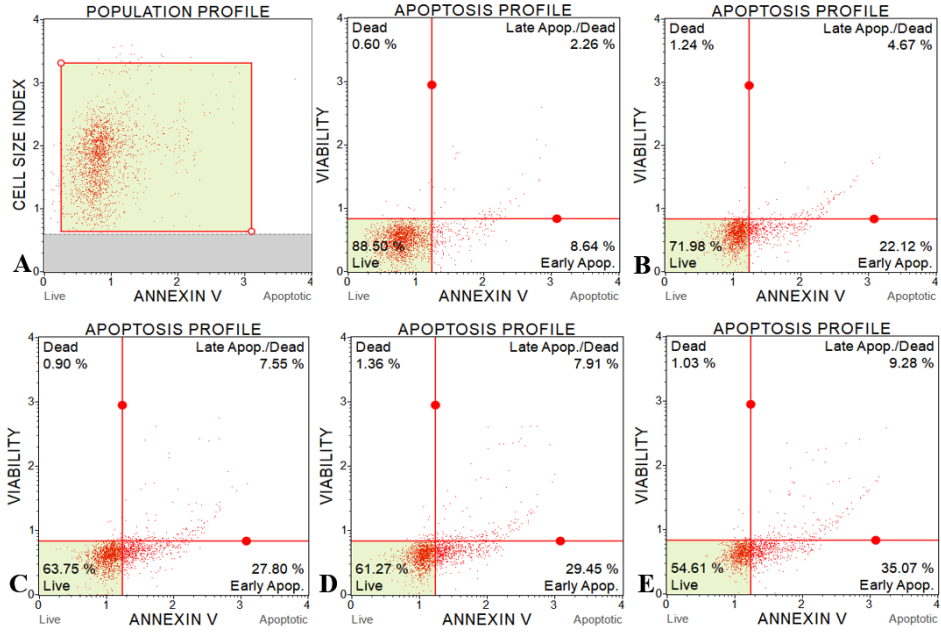
PEITC'in LNCaP hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 µM dozlarda 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %23.1, %43.3, %38.8 ve %53.2 olarak belirlendi (Şekil 98).



Şekil 98. PEITC'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 5 µM (C) 10 µM (D) 15 µM (E) 20 µM

4.3.3.2. PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi

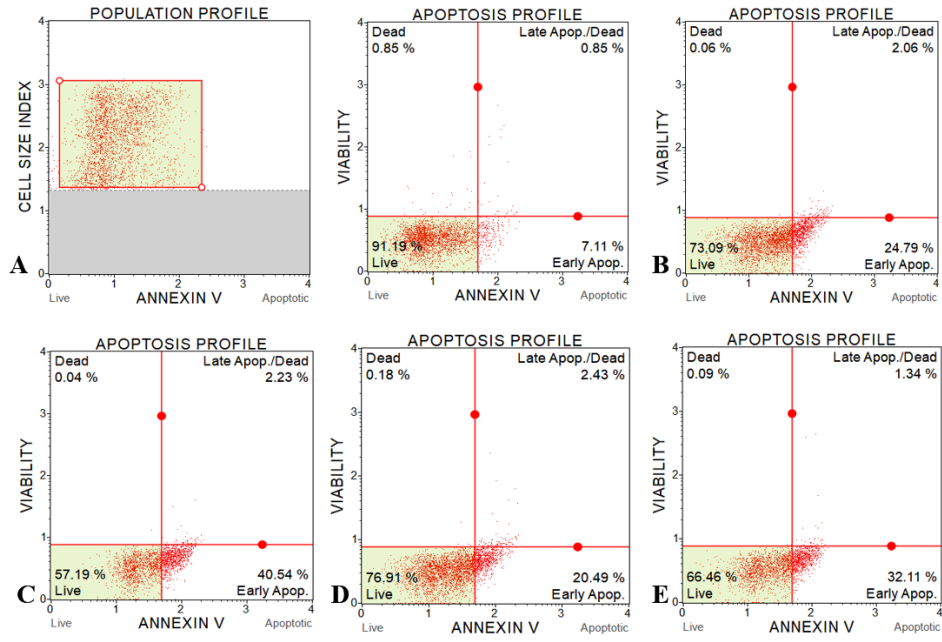
PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 μ M dozlarda 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %26.7, %35.5, %37.4 ve %44.3 olarak belirlendi (Şekil 99).



Şekil 99. PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M (C) 10 μ M (D) 15 μ M (E) 20 μ M

4.3.3.3. PEITC'in C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi

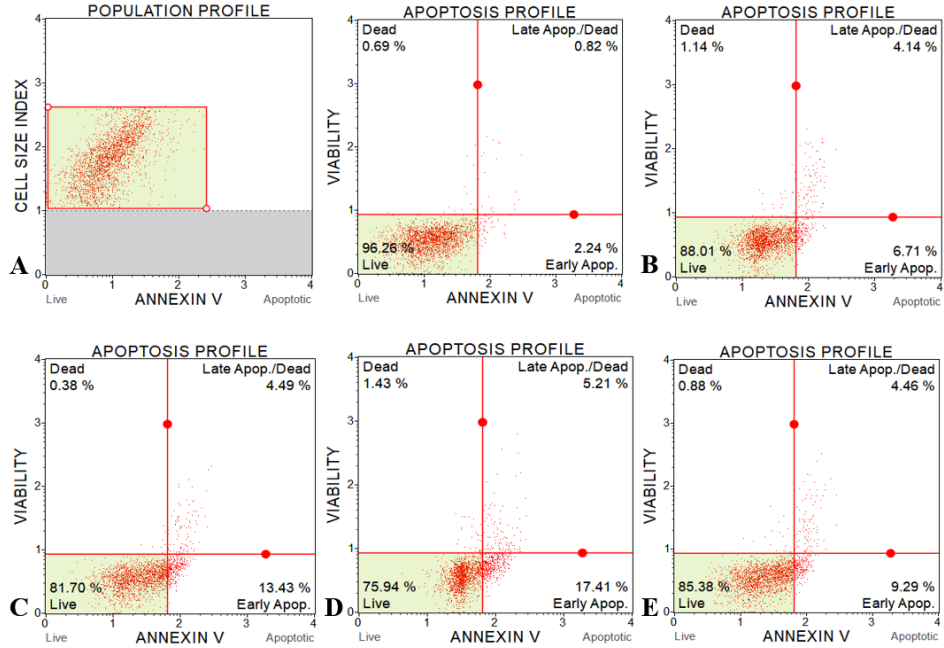
PEITC'in C4-2 hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 μ M dozlarda 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %26.8, %42.7, %22.9 ve %33.5 olarak belirlendi (Şekil 100).



Şekil 100. PEITC'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M (C) 10 μ M (D) 15 μ M (E) 20 μ M

4.3.3.4. PEITC'in RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi

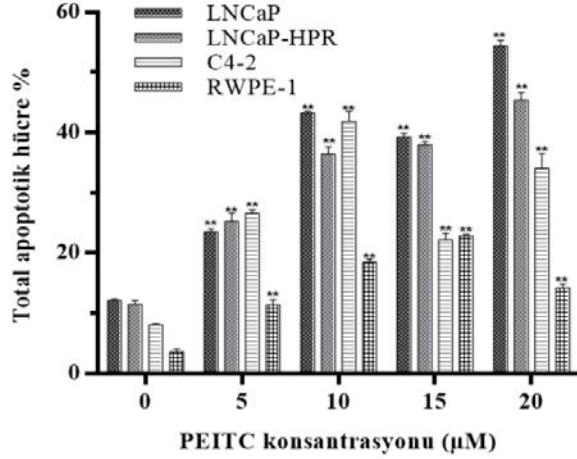
PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 5, 10, 15 ve 20 μ M dozlarda 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %10.8, %17.9, %22.6 ve %13.6 olarak belirlendi (Şekil 101).



Şekil 101. PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M (C) 10 μ M (D) 15 μ M (E) 20 μ M

4.3.3.5. PEITC'in apoptotik etkisinin istatistiksel analizi

PEITC'in LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 5, 10, 15 ve 20 µM dozlarda 24 saatlik apoptotik etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 102).



Şekil 102. PEITC'in 24 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$).

4.4. Cabazitaxel ile Apigenin ve PEITC kombinasyonu için uygun doz grupları ve uygulama sürelerinin seçimi

4.4.1. Ajanların uygun dozlarının ve uygulama sürelerinin belirlenmesi

Prooksidan etkileri Cabazitaxel ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilecek en uygun Apigenin ve PEITC kombinasyonu ve kombin uygulamanın gerçekleştirileceği en uygun zaman diliminin seçimi yapılmadan önce ilk olarak LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında tüm ajanların sitotoksik ve apoptotik verileri birlikte gözden geçirildi. Sitotoksik ve apoptotik verilere bağlı olarak,

- Cabazitaxel'in tüm hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi ile 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi değerlendirildi ve her bir hücre hattı için 1, 5 ve 10 nM dozların uygulanması sonrasında 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlı hücre oranları Tablo 7'de özetlendi.

Tablo 7. Cabazitaxel uygulaması sonucu doza ve zamana bağlı % hücre canlılıkları

Hücre hattı	Hücre canlılığı (%)								
	24 saat			48 saat			72 saat		
	1 nM	5 nM	10 nM	1 nM	5 nM	10 nM	1 nM	5 nM	10 nM
LNCaP	60	52	46	54	50	30	30	31	31
LNCaP-HPR	85	80	72	68	63	48	51	43	38
C4-2	82	77	81	51	48	51	44	40	42
RWPE-1	85	70	69	67	53	60	41	40	41

Buna göre, LNCaP hücre hattında 24 saatte 10 nM dozda hücre canlılığında %50'den fazla inhibisyon gözlenmesine rağmen aynı zaman diliminde ilacın LNCaP-HPR ve C4-2 hücrelerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin daha az oranda olduğu belirlendi. Ek olarak sitotoksikite oranları, RWPE-1 normal prostat epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında Cabazitaxel'in 24 saatte kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etkisinin bulunmadığı gösterdi (Tablo 7). 48. saat verileri incelendiğinde ise 5 ve 10 nM dozlarda LNCaP-HPR ve C4-2 hücrelerinde sırası ile %50'nin altında ve yaklaşık %50 oranında hücre ölümü gerçekleştiği belirlendi. Aynı zaman diliminde RWPE-1 prostat normal epitel hücrelerinin canlılığı ise kanser hücrelerine göre daha yüksek olarak saptandı (Tablo 7). Cabazitaxel'in 48 saatlik 10 nM dozda uygulanması sonucu LNCaP hücresinde canlılığın %30'a azaldığı görüldüğünden, prooksidan etkilerin değerlendirilebilmesi için canlı hücre oranının belli bir düzeyde kalması gerektiğinden ve Cabazitaxel'in RWPE-1 normal hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri dikkate alındığından 72 saatlik analiz uygun bulunmadı. Böylece, Cabazitaxel'in prooksidan etkilerinin değerlendirilebilmesi için en erken ve etkin zaman dilimi 48 saat olarak seçildi.

- Apigenin'in tüm hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi ile 24 ve 48 saatlik apoptotik etkisi değerlendirildi ve her bir hücre hattı için 20, 40 ve 80 μ M dozların uygulanması sonrasında 24, 48 ve 72. saatlerdeki canlı hücre oranları Tablo 8'de özetlendi.

Tablo 8. Apigenin uygulaması sonucu doza ve zamana bağlı % hücre canlılıkları

Hücre hattı	Hücre canlılığı %								
	24 saat			48 saat			72 saat		
	20 µM	40 µM	80 µM	20 µM	40 µM	80 µM	20 µM	40 µM	80 µM
LNCaP	72	58	46	61	48	36	33	28	27
LNCaP-HPR	80	74	66	69	58	49	67	56	42
C4-2	72	70	65	65	63	50	54	48	27
RWPE-1	90	86	85	90	85	77	81	73	70

Buna göre, Apigenin tüm zaman dilimlerinde kanser hücreleri üzerinde belirgin seçici sitotoksik etkisinin bulunduğu, 24 saatte 80 µM dozda LNCaP hücre hattının canlılığını %46'ya düşürdüğü, ancak LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında aynı doz ve sürede hücre canlılıklarının yaklaşık %65'e yakın olarak azaldığı tespit edildi. Apigenin için 48 saat verileri değerlendirildiğinde ise son doz olan 80 µM uygulamada LNCaP hücre hattı canlılığının %36'ya düştüğü ve LNCaP-HPR ile C4-2 hücre hatlarında yaklaşık %50 oranında inhibisyon sağlandığı görüldü (Tablo 8). 72. saatte ise LNCaP-HPR hücre hattında canlılık oranları 48. saate yakın olduğundan, diğer kanser hücre hatlarında hücre canlılığı yaklaşık %30'a azaldığından ve ajanın normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi 48. saate göre fazla olduğundan 72 saatlik uygulama uygun bulunmadı. Bu nedenle Apigenin'in tek başına etkin saati 48 saat olarak belirlendi.

- Son olarak benzer bir değerlendirme PEITC için gerçekleştirildi ve her bir hücre hattı için 5, 10, 15 ve 20 µM dozların uygulanması sonrasında 24 saatteki canlı hücre oranları Tablo 9'da özetlendi.

Tablo 9. PEITC uygulaması sonucu doza bağlı % hücre canlılıkları

Hücre hattı	Hücre canlılığı (%)			
	24 saat			
	5 µM	10 µM	15 µM	20 µM
LNCaP	76	56	60	46
LNCaP-HPR	77	63	61	54
C4-2	73	57	76	66
RWPE-1	88	81	75	83

Buna göre, PEITC'in kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin düşük dozlarda daha yüksek olduğu, maddenin yapısından kaynaklı olabileceği düşünülerek özellikle 15 µM dozda etkinliğinin 10 µM'a göre düşük bulunduğu, 20 µM dozda ise

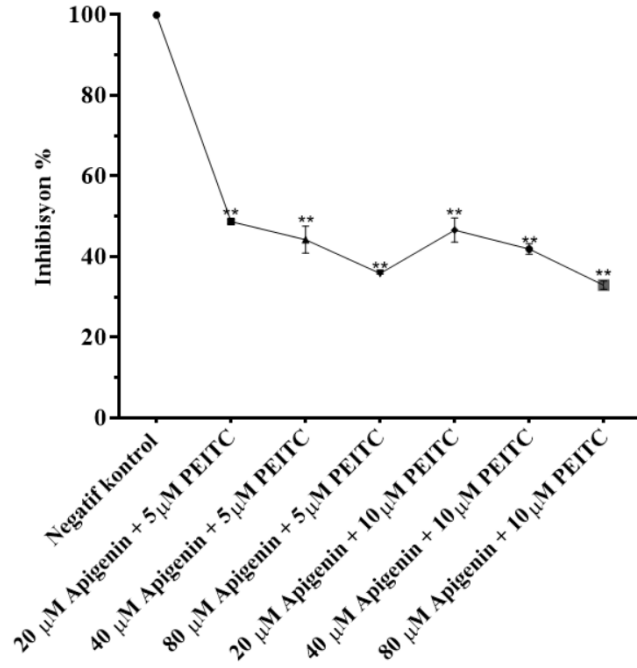
hücre canlılığındaki inhibisyon oranlarının 10 µM doz uygulamasındaki hücre canlılığı oranlarına yakın olduğu tespit edildi. Maddenin 24'ten saatten fazla uygulamalarında sitotoksik etkisinin özellikle LNCaP hücre hattında çok yüksek olması nedeni 24 saatten fazla uygulama yapılmaması uygun bulundu.

Tablo 7, 8 ve 9'da özetlenen Cabazitaxel verileri ile Apigenin ve PEITC'in tek başına uygulamaları sonucu elde edilen veriler temel alınarak kombin uygulama için Apigenin'in 20, 40 ve 80 µM dozları ve PEITC'in 5 ve 10 µM dozları seçildi. Buna göre 20 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 20 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 10 µM PEITC olmak üzere 6 farklı kombin doz grubu oluşturuldu. İlk olarak 6 farklı dozun 12 saatlik sitotoksik etkileri analiz edildi. 12 saatlik kombin dozların uygulanması sonucu LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında anlamlı sitotoksik etki saptanmadı. Kombin uygulamanın 48 saatlik sitotoksik etkisi ise hem LNCaP hem de RWPE-1 hücre hattında yüksek düzeyde olduğundan ve bu hücreler için canlı hücre oranı çok azaldığından kombin doz gruplarının analizlerinin tüm hücre hatlarında gerçekleştirileceği zaman dilimi olarak 24 saat belirlendi.

4.4.1.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun sitotoksik etkisi

4.4.1.1.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi

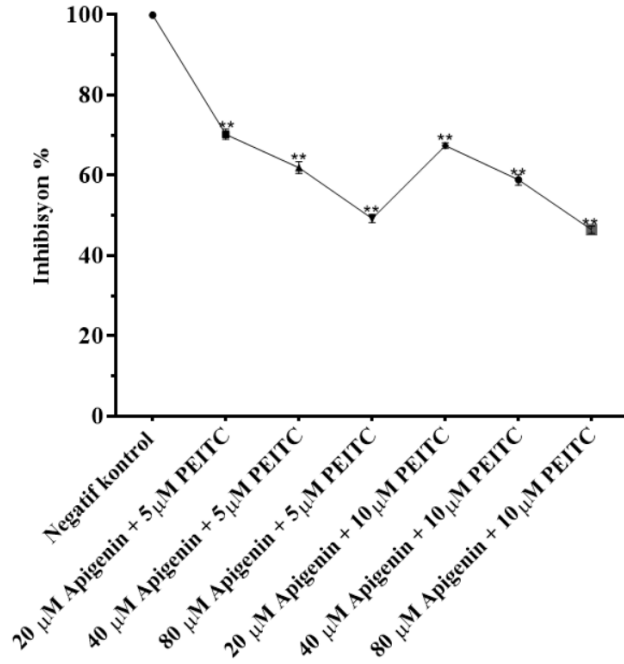
Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında 20 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 20 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 10 µM PEITC doz gruplarında 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %48.7, %44.2, %35.8, %53.6, %41.9 ve %32.9'a ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 103).



Şekil 103. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.4.1.1.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisi

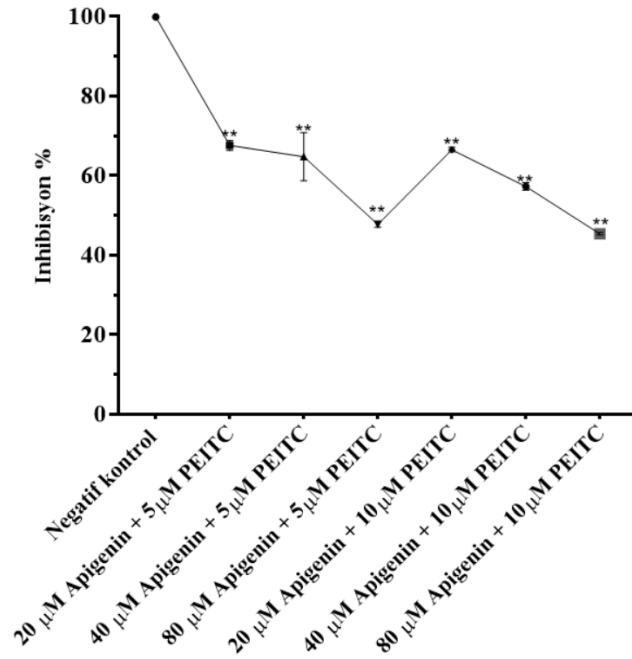
Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında 20 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 20 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 10 µM PEITC doz gruplarında 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %70.2, %61.9, %49.3, %67.5, %58.9 ve %46.5'e ($p < 0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 104).



Şekil 104. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.4.1.1.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisi

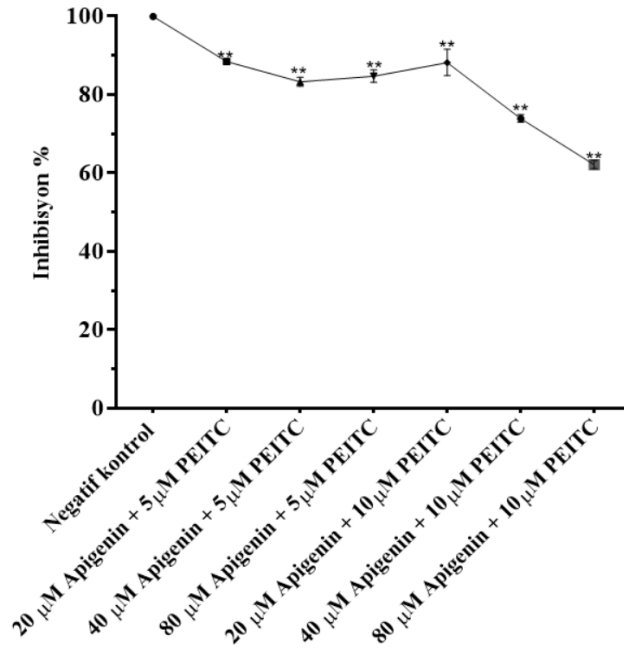
Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında 20 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 20 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 10 µM PEITC doz gruplarında 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %67.6, %64.8, %47.7, %66.5, %57.3 ve %45.4'e ($p < 0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 105).



Şekil 105. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

4.4.1.1.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisi

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında 20 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 20 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 10 µM PEITC doz gruplarında 24 saatlik sitotoksik etkisi analiz edildiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının sırasıyla %88.5, %83.3, %84.7, %88.2, %73.9 ve %62.2'ye ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 106).



Şekil 106. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.4.1.1.5. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun sitotoksikite verilerine göre farmakolojik etkileşimleri

Kombin uygulamanın 24 saatlik sitotoksik analiz verileri değerlendirildiğinde tüm hücre hatlarında canlılığın belirgin olarak Apigenin doz artışına bağlı düşüş gösterdiği saptandı. Kanser hücre hatlarında 5 µM PEITC'in üç farklı Apigenin dozu (20, 40 ve 80 µM) ile kombinlenerek uygulandığı doz gruplarının Apigenin doz artışına bağlı anlamlı sitotoksik etki yarattığı ve son dozda (80 µM Apigenin + 5 µM PEITC) tüm kanser hücrelerinde %50'nin altında canlılık inhibisyonuna neden olduğu belirlendi. Ek olarak RWPE-1 prostat normal epitel hücrelerinde ilk üç kombin dozun son üç kombin doza göre daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edildi. Apigenin ve PEITC'in kombin olarak uygulandığı 6 farklı doz grubunun 24 saatlik sitotoksik analiz verilerinin girilmesiyle CompuSyn yazılımından elde edilen CI değerleri, 5 µM PEITC'in üç farklı Apigenin dozu (20, 40 ve 80 µM) ile kombinlenerek uygulandığı doz gruplarında kanser hücrelerinde Apigenin ve PEITC'in sinerjistik etkiye (CI<1) sahip olduğunu, RWPE-1 hücre hattında ise aynı doz gruplarında iki ajanın antagonistik etkisi (C>1) bulunduğunu ortaya koydu (Tablo 10). Ajanların kombin doz gruplarındaki doz redüksiyon indeks değerleri de (DRI) Tablo 11'de özetlendi.

Böylelikle, tüm verilere bağlı olarak seçilen ilk üç kombin dozun hücre hatlarında 24 saatlik apoptotik etkileri değerlendirildi.

Tablo 10. Apigenin ve PEITC kombin doz gruplarının tüm hücre hatlarında 6 farklı doz kombinasyonu için CompuSyn yazılımından elde edilen kombinasyon indeks (CI) değerleri

Hücre hattı	Kombin doz grupları	CI değerleri	
		5 µM PEITC	10 µM PEITC
LNCaP	20 µM Apigenin	0.516	0.982
	40 µM Apigenin	0.603	0.717
	80 µM Apigenin	0.591	0.666
LNCaP-HPR	20 µM Apigenin	0.902	1.247
	40 µM Apigenin	0.695	0.883
	80 µM Apigenin	0.458	0.547
C4-2	20 µM Apigenin	0.526	0.690
	40 µM Apigenin	0.496	0.253
	80 µM Apigenin	0.064	0.070
RWPE-1	20 µM Apigenin	1.363	2.148
	40 µM Apigenin	1.165	0.920
	80 µM Apigenin	2.013	0.690

Tablo 11. Apigenin ve PEITC'in tüm hücre hatlarında 6 farklı doz kombinasyonu için CompuSyn yazılımından elde edilen doz redüksiyon indeks (DRI) değerleri

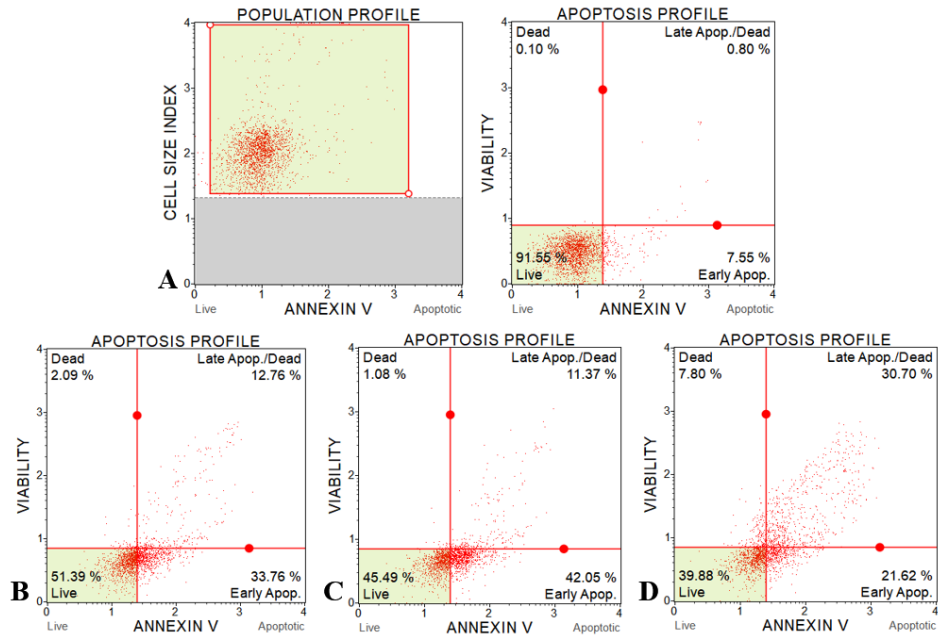
Hücre hattı	Kombin doz grupları	DRI değerleri	
		Apigenin	PEITC
LNCaP	20 µM Apigenin + 5 µM PEITC	3.78	3.96
	40 µM Apigenin + 5 µM PEITC	2.53	4.78
	80 µM Apigenin + 5 µM PEITC	2.24	6.89
	20 µM Apigenin + 10 µM PEITC	2.74	1.61
	40 µM Apigenin + 10 µM PEITC	2.95	2.63
	80 µM Apigenin + 10 µM PEITC	2.45	3.93
LNCaP-HPR	20 µM Apigenin + 5 µM PEITC	3.11	1.71
	40 µM Apigenin + 5 µM PEITC	2.99	2.76
	80 µM Apigenin + 5 µM PEITC	3.69	5.33
	20 µM Apigenin + 10 µM PEITC	3.89	1.00
	40 µM Apigenin + 10 µM PEITC	3.73	1.62
	80 µM Apigenin + 10 µM PEITC	4.50	3.07
C4-2	20 µM Apigenin + 5 µM PEITC	4.03	3.58
	40 µM Apigenin + 5 µM PEITC	3.37	5.00
	80 µM Apigenin + 5 µM PEITC	30.15	32.38
	20 µM Apigenin + 10 µM PEITC	4.95	2.04
	40 µM Apigenin + 10 µM PEITC	12.35	5.79
	80 µM Apigenin + 10 µM PEITC	44.08	20.70
RWPE-1	20 µM Apigenin + 5 µM PEITC	1.95	1.17
	40 µM Apigenin + 5 µM PEITC	1.59	1.86
	80 µM Apigenin + 5 µM PEITC	0.708	1.66
	20 µM Apigenin + 10 µM PEITC	2.02	0.604
	40 µM Apigenin + 10 µM PEITC	3.00	1.70
	80 µM Apigenin + 10 µM PEITC	2.76	3.03

4.4.1.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun apoptotik etkisi

Tüm hücre hatlarında 5 μ M PEITC'in üç farklı Apigenin dozu (20, 40 ve 80 μ M) ile kombinlenerek uygulandığı doz gruplarının 24 saatlik uygulamalarında Apigenin doz artışı yönünde orantılı olarak apoptotik hücre oranının artış gösterdiği saptandı.

4.4.1.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında apoptotik etkisi

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde Apigenin doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %46.5, %53.4 ve %52.3 olarak belirlendi (Şekil 107).

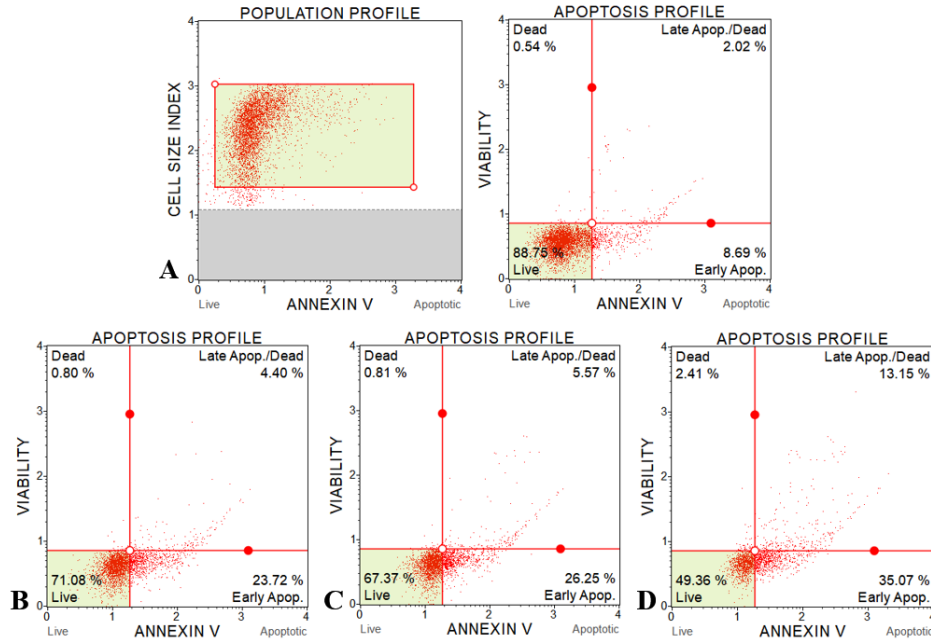


Şekil 107. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (D) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.4.1.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında apoptotik etkisi

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde Apigenin doz

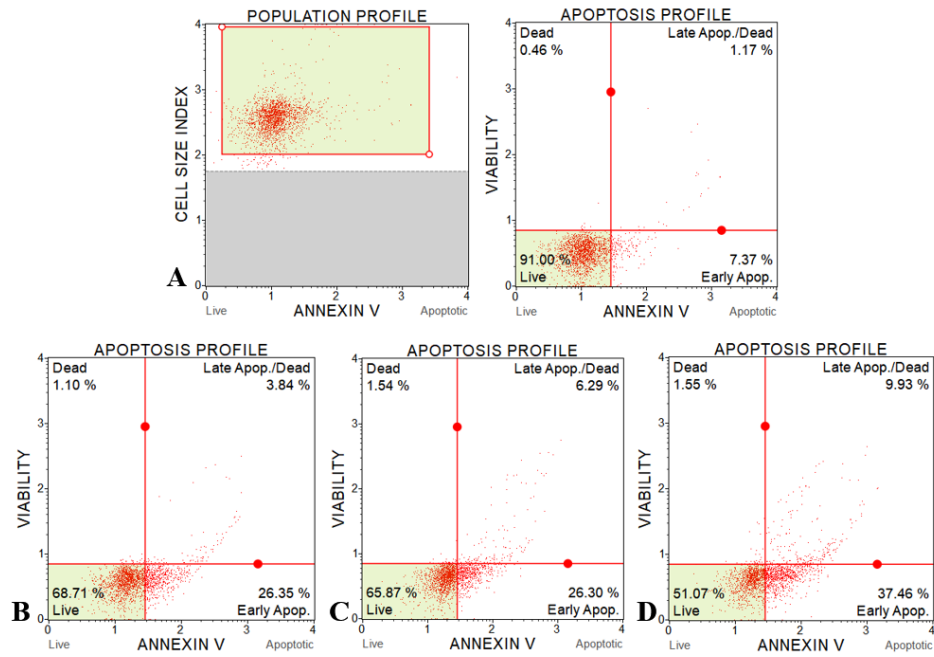
artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %28.1, %31.8 ve %48.2 olarak belirlendi (Şekil 108).



Şekil 108. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (D) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.4.1.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında apoptotik etkisi

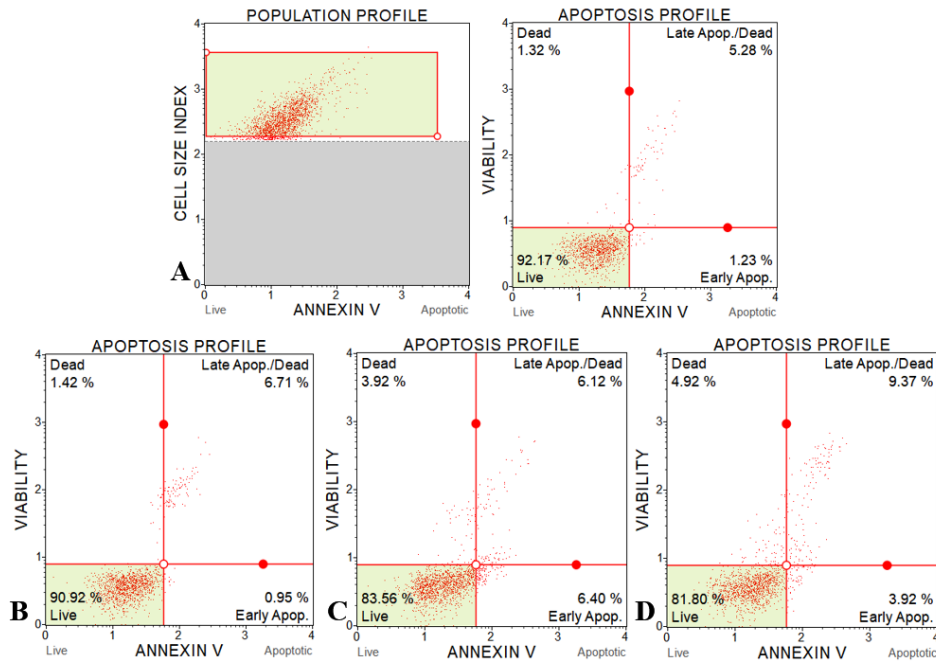
Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde Apigenin doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %30.2, %32.6 ve %47.4 olarak belirlendi (Şekil 109).



Şekil 109. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (D) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.4.1.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında apoptotik etkisi

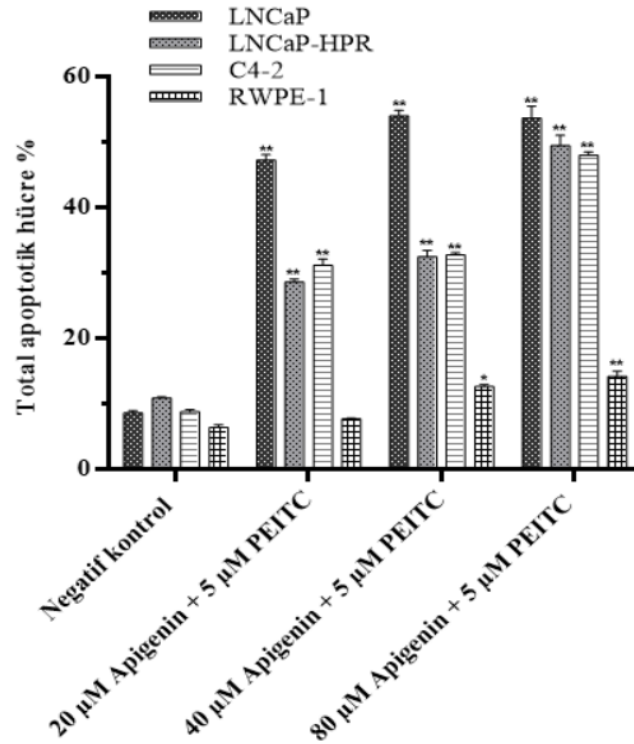
Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında 24 saatlik apoptotik etkisi analiz edildiğinde Apigenin doz artışına bağlı olarak total apoptotik hücre oranları sırasıyla %7.6, %12.5 ve %13.3 olarak belirlendi (Şekil 110).



Şekil 110. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik apoptotik etkisi (A) Kontrol (B) 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (D) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.4.1.2.5. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun apoptotik etkisinin istatistiksel analizi

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun 20 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC, 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında 24 saatlik apoptotik etkisi tüm hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $p < 0.01$) bulundu (Şekil 111).



Şekil 111. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun 24 saatlik apoptotik etkisinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.4.1.2. Sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenen kombin doz gruplarının etkinliği ile Cabazitaxel etkinliğinin hücre canlılığı açısından karşılaştırılması

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun 24 saatte kanser hücre hatlarında tespit edilen anlamlı sitotoksik ve apoptotik etkisi Cabazitaxel'in etkinliği ile karşılaştırıldığında 5 ve 10 nM Cabazitaxel etkinliğinin 48 saatte benzer oranda hücre canlılığını inhibe ettiği görüldü. Kombin uygulamanın 24 saatlik sitotoksik ve apoptotik analiz verileri ile Cabazitaxel'in 48 saatlik sitotoksik ve apoptotik verileri her bir hücre hattı için % canlılık cinsinden Tablo 12'de sunuldu.

Tablo 12. Kombin uygulamanın 24 saatlik etkinliği ile Cabazitaxel'in 48 saatlik etkinliğinin her bir hücre hattında % hücre canlılığı açısından karşılaştırılması

Hücre hattı	Hücre canlılığı (%)					
	Cabazitaxel etkinliği (48 saat)			Apigenin + PEITC kombinasyon etkinliği (24 saat)		
	1 nM	5 nM	10 nM	20 µM Apigenin + 5 µM PEITC	40 µM Apigenin + 5 µM PEITC	80 µM Apigenin + 5 µM PEITC
LNCaP	54	50	30	51	45	36
LNCaP-HPR	68	63	48	71	65	49
C4-2	51	48	51	68	65	50
RWPE-1	67	53	60	90	83	84

Tablo 12’de her bir hücre hattı kendi içerisinde değerlendirilerek benzer oranda hücre canlılığında inhibisyona neden olan dozlardaki % hücre canlılık oranları kırmızı olarak belirtildi. Böylece, kanser hücrelerinde % hücre canlılıkları esas alındığında prooksidan etkileri karşılaştırılabilecek olan en uygun dozların Cabazitaxel için 5 ve 10 nM, kombin uygulama için ise 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC olduğu belirlendi.

Tez çalışması kapsamında devam eden bütün analizler Cabazitaxel’in 48 saatlik 5 ve 10 nM dozlardaki etkinliği; PEITC’in 24 saatlik 5 µM etkinliği; Apigenin’in 24 saatlik 40 ve 80 µM etkinliği; Apigenin ve PEITC kombinasyonunun 24 saatlik 2 farklı kombin doz grubundaki etkinliği (40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC) temel alınarak ilerletildi (Tablo 13).

Tablo 13. Tez çalışması kapsamında prooksidan etkileri araştırılan ajanların seçilen doz ve sürelerde her bir hücre hattında % hücre canlılığı üzerine etkileri

Hücre hattı	Hücre canlılığı (%)						
	48 saat		24 saat	24 saat		24 saat	
	5 nM Cabazitaxel	10 nM Cabazitaxel	5 µM PEITC	40 µM Apigenin	80 µM Apigenin	40 µM Apigenin + 5 µM PEITC	80 µM Apigenin + 5 µM PEITC
LNCaP	50	30	76	58	46	45	36
LNCaP-HPR	63	48	77	74	66	65	49
C4-2	48	51	73	70	65	65	50
RWPE-1	53	60	88	86	85	83	84

Böylelikle, Apigenin ve PEITC kombinasyonun 24 saatteki etkinliği aynı süre ve aynı dozlarda ajanların tek başlarına olan etkileri ile birlikte analiz edildi. Her bir hücre hattı kendi içerisinde değerlendirildiğinde hücre canlılığında benzer oranda inhibisyona yol açtığı belirlenen dozlar Tablo 13’de kırmızı olarak işaretlendi. Ajanların uygulama süreleri içerisindeki prooksidan etkileri belirlenen tüm dozlar için analiz edilirken karşılaştırmalar genel olarak % hücre canlılıkları kırmızı işaretli dozlar esas alınarak yapıldı.

4.4.2. Apigenin ve PEITC’in apoptotik etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması

LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında canlılık inhibisyonu ve apoptotik etki verilerine bağlı olarak Apigenin ve PEITC kombinasyonun Cabazitaxel’e göre daha etkin olduğu belirlendi. C4-2 hücre hattında ise Cabazitaxel’in apoptotik etkinliğinin

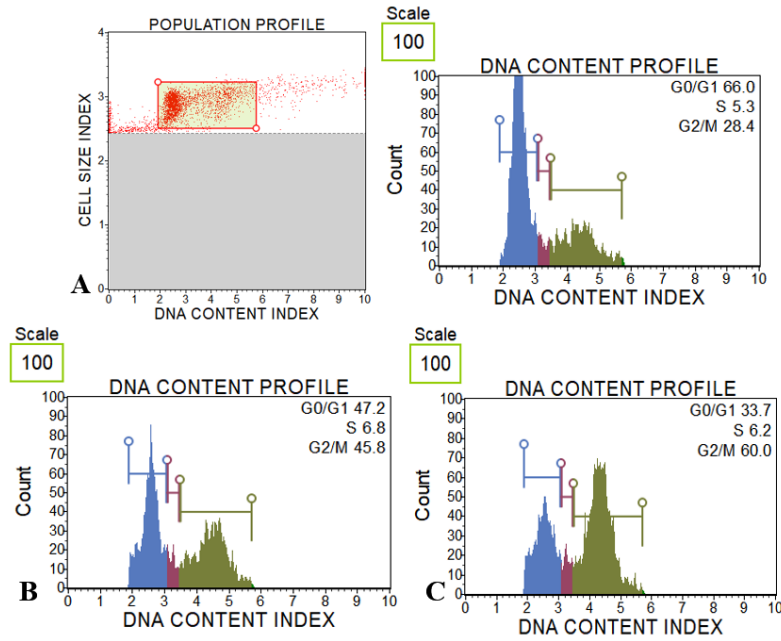
daha yüksek olduğu saptanmasına rağmen ilacın seçici toksik etkisinin düşük olması ve RWPE-1 normal prostat epitel hücre hattında Apigenin ve PEITC kombinasyonuna göre daha fazla sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olması nedeni ile Apigenin ve PEITC'in PK hücrelerinde Cabazitaxel'e göre apoptotik avantajları olduğu düşünüldü.

4.5. Hücre döngüsü üzerine etkiler

4.5.1. Cabazitaxel'in hücre döngüsü üzerine etkisi

4.5.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi

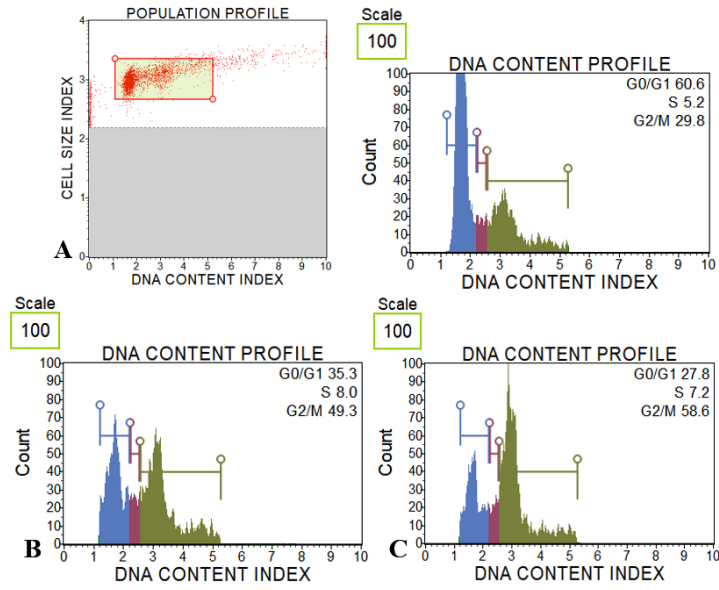
Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi analiz edildiğinde G2/M evresinde bulunan hücre oranının %28.4'ten Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak sırasıyla %45.8'e ve %60.0'a arttığı tespit edildi (Şekil 112).



Şekil 112. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.5.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi

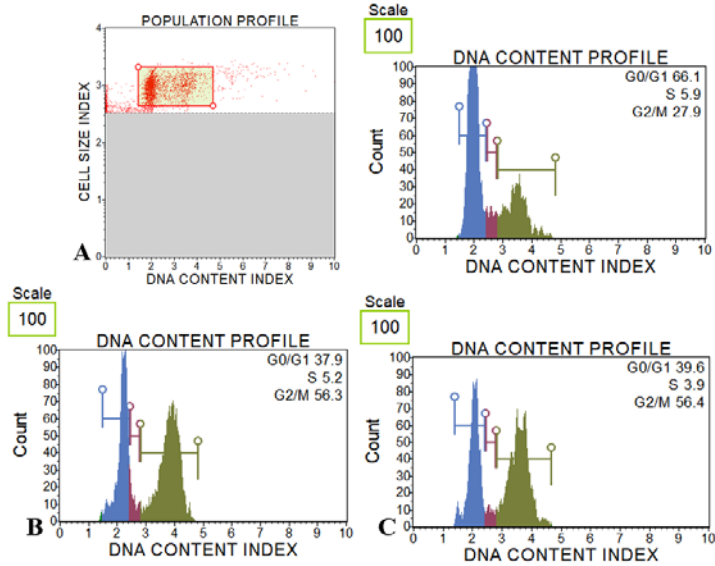
Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi analiz edildiğinde G2/M evresinde bulunan hücre oranının 29.8'den Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak sırasıyla %49.3'e ve %58.6'ya arttığı tespit edildi (Şekil 113).



Şekil 113. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.5.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi

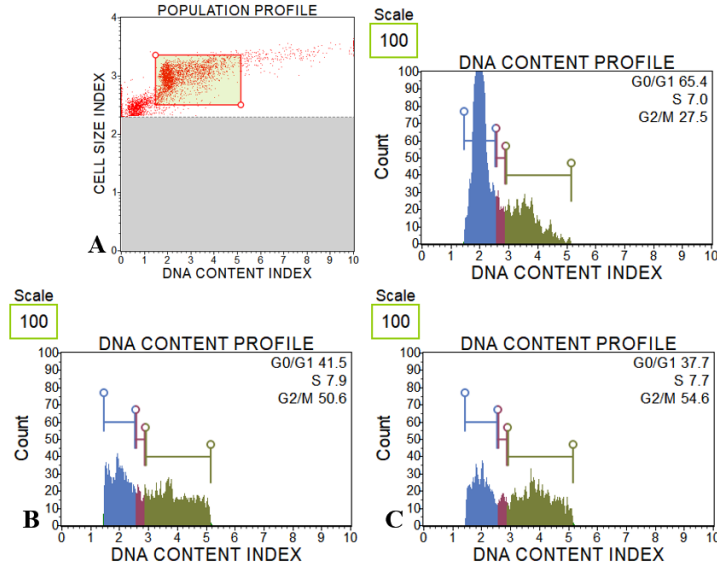
Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi analiz edildiğinde G2/M evresinde bulunan hücre oranının %27.9'dan Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak sırasıyla %56.3'e ve %56.4'e arttığı tespit edildi (Şekil 114).



Şekil 114. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.5.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi

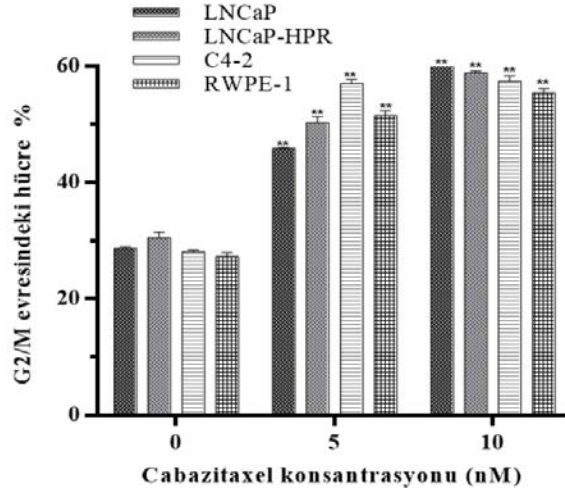
Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi analiz edildiğinde G2/M evresinde bulunan hücre oranının %27.5'den Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak sırasıyla %50.6'ya ve %54.6'ya arttığı tespit edildi (Şekil 115).



Şekil 115. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.5.1.5. Cabazitaxel'in hücre döngüsü üzerine etkisinin istatistiksel analizi

Cabazitaxel'in LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisinin ve tüm hücre hatlarında G2/M evresindeki hücre oranında saptanan artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) olduğu belirlendi (Şekil 116). Cabazitaxel'in hücre döngüsü sonuçları, tüm hücre hatlarında ilacın apoptotik etkileri ile uyumlu bulundu.



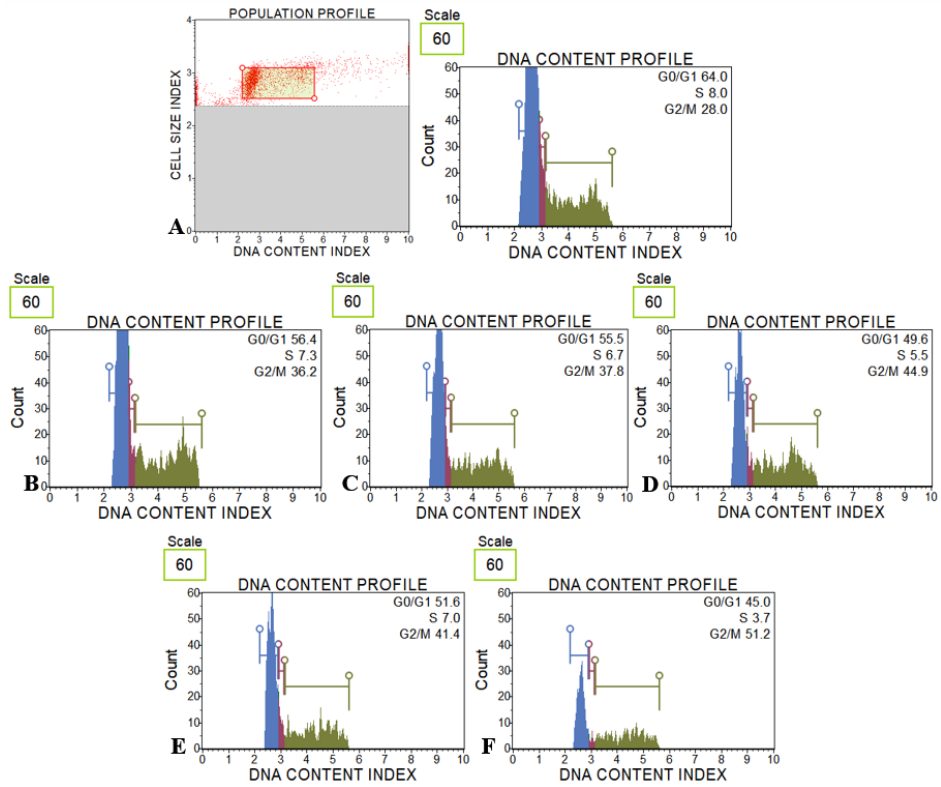
Şekil 116. Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

4.5.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hücre döngüsü üzerine etkisi

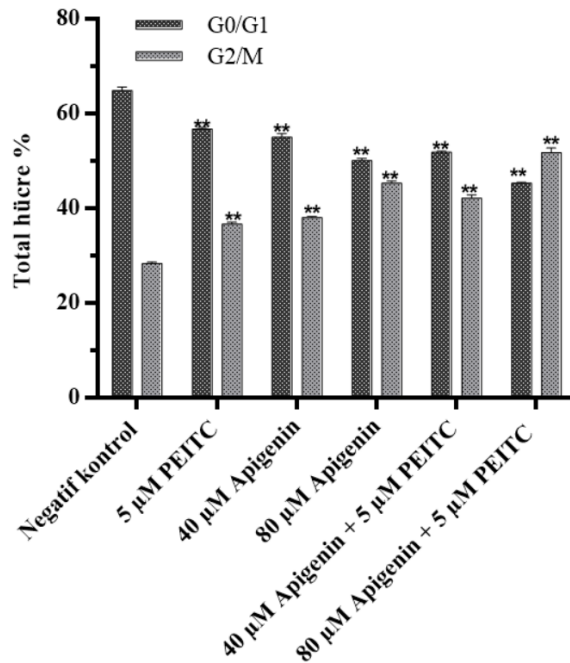
Apigenin ve PEITC'in LNCaP, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 24 saatte tek başlarına ve kombin olarak uygulandıklarında hücre döngüsünü G2/M evresinde durdurdukları saptandı. LNCaP-HPR hücre hattında tek başına 5 μ M PEITC'in diğer hücrelerden elde edilen veriden farklı olarak hücre döngüsünü G0/G1 evresinde durdurduğu bulundu. Buna rağmen tek başına Apigenin uygulamalarına ek olarak kombin doz gruplarının da LNCaP-HPR hücre hattında G2/M evresinde etkili oldukları tespit edildi. Ajanların tek başına ve kombin uygulamalarının 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkileri apoptotik etkileri ile uyumlu bulundu ve her bir hücre için elde edilen veriler detaylandırıldı.

4.5.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi

LNCaP hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkileri analiz edildiğinde G2/M evresinde bulunan hücre oranının %28.0'dan doz grubu sırasıyla %36.2'ye, %37.8'e, %44.9'a, %41.4'e ve %51.2'ye artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 117). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu G0/G1 evresindeki total hücre oranındaki azalış ve G2/M evresindeki total hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 118).



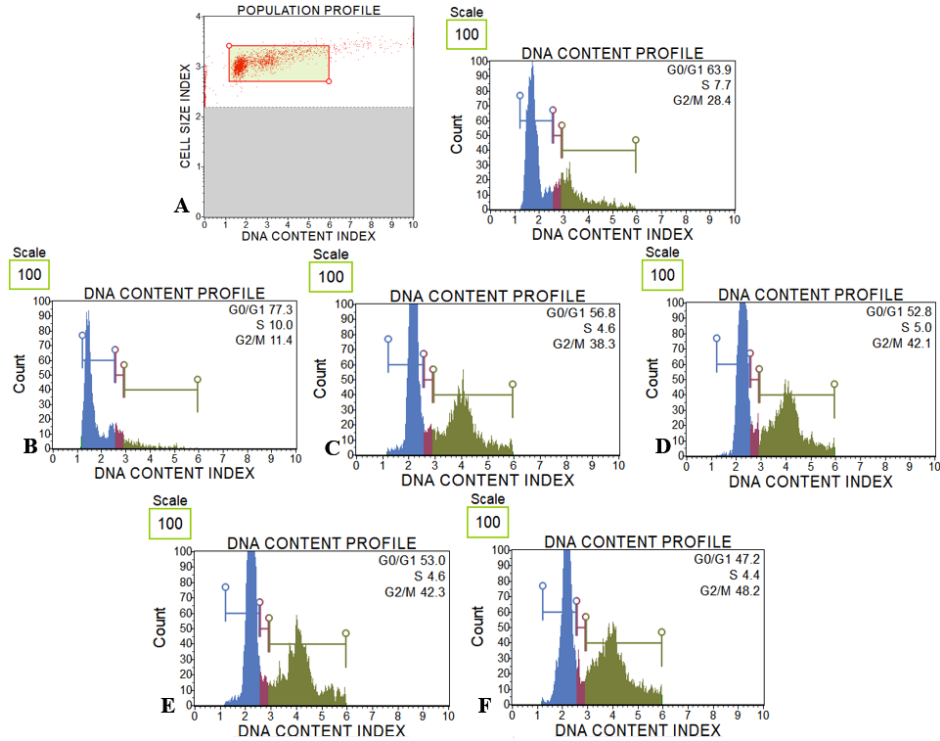
Şekil 117. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 µM PEITC (C) 40 µM Apigenin (D) 80 µM Apigenin (E) 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC (F) 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC



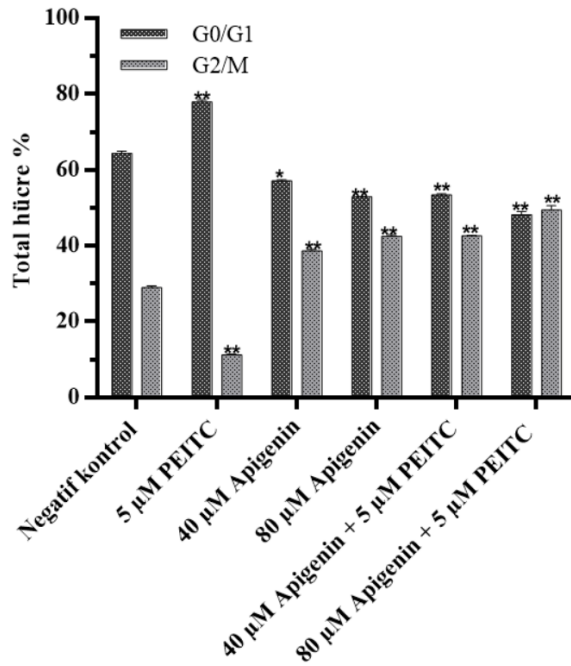
Şekil 118. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$).

4.5.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisi

LNCaP-HPR hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkileri analiz edildiğinde 5 µM PEITC uygulamasının G0/G1 evresinde tutulmaya neden olduğu, 24 saatlik uygulama sonrasında G0/G1 evresinde bulunan hücre oranının %63.9'dan %77.3'e yükseldiği saptandı. Ancak Apigenin'in tek başına ve PEITC ile kombin uygulamalarında hücre döngüsünün G2/M evresinde durdurulduğu belirlendi. G2/M evresinde bulunan hücre oranının %28.4'den doz grubu sırasıyla %38.3'e, %42.1'e, %42.3'e ve %48.2'ye artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 119). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saatlik 5 µM PEITC dışındaki doz uygulamalarının neden olduğu G0/G1 evresindeki total hücre oranındaki azalış ve G2/M evresindeki total hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, $p<0.01$) bulundu (Şekil 120). 5 µM PEITC'in ise neden olduğu G0/G1 evresindeki total hücre oranındaki artışın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.01$) tespit edildi (Şekil 120).



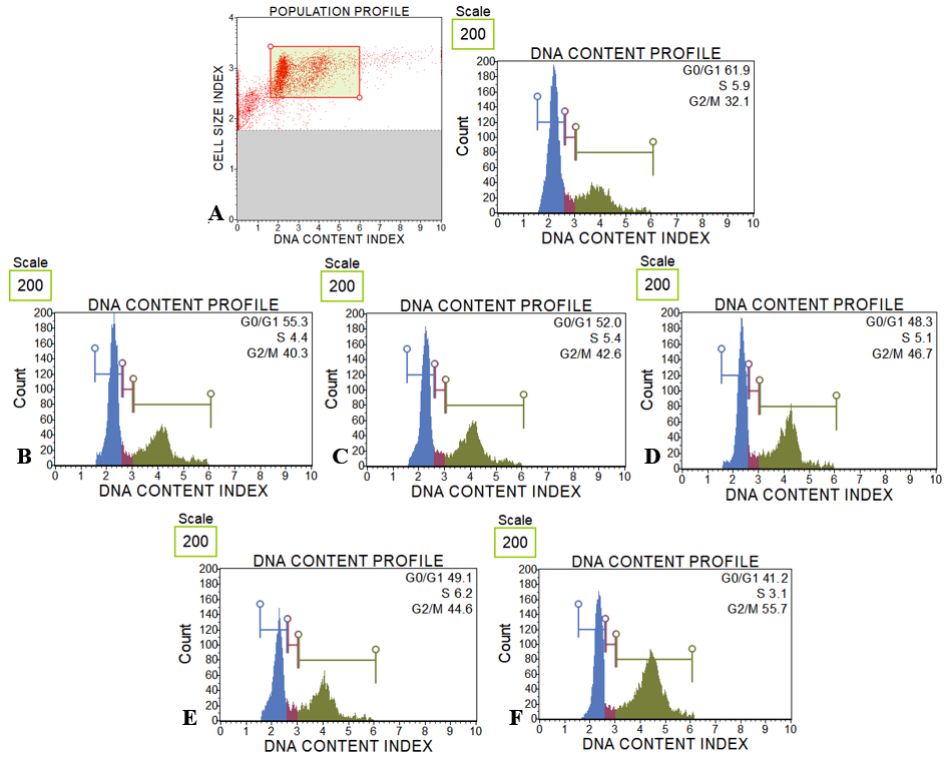
Şekil 119. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 µM PEITC (C) 40 µM Apigenin (D) 80 µM Apigenin (E) 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC (F) 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC



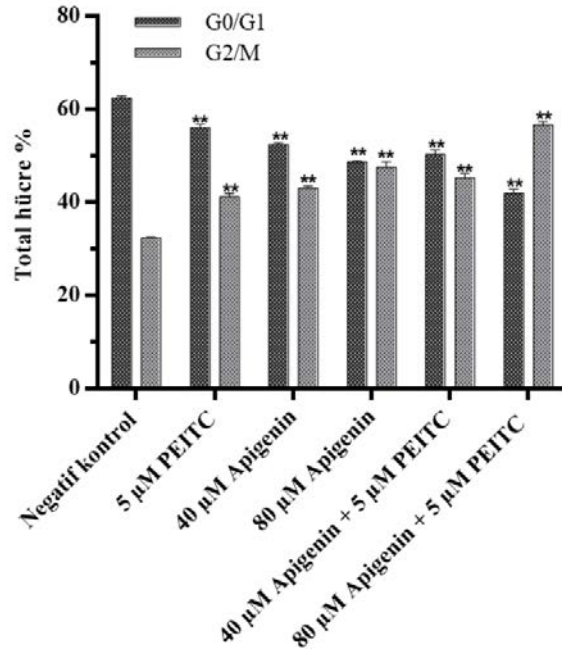
Şekil 120. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

4.5.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkileri

C4-2 hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkileri analiz edildiğinde G2/M evresinde bulunan hücre oranının %32.1'den doz grubu sırasıyla %40.3'e, %42.6'ya, %46.7'ye, %44.6'ya ve %55.7'ye artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 121). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu G0/G1 evresindeki total hücre oranındaki azalış ve G2/M evresindeki total hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 122).



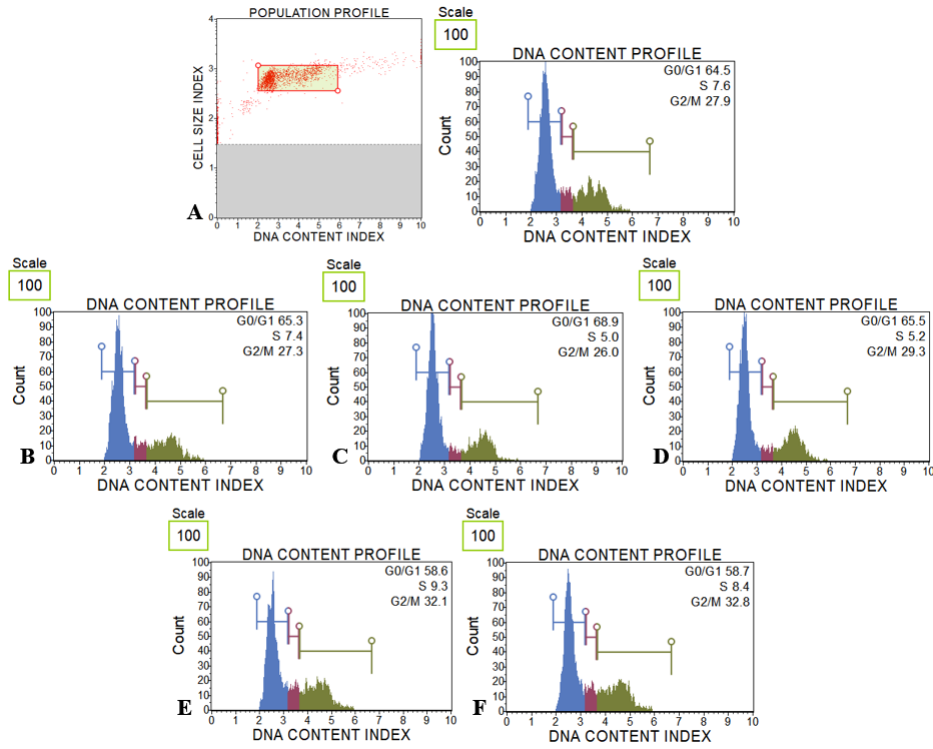
Şekil 121. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 µM PEITC (C) 40 µM Apigenin (D) 80 µM Apigenin (E) 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC (F) 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC



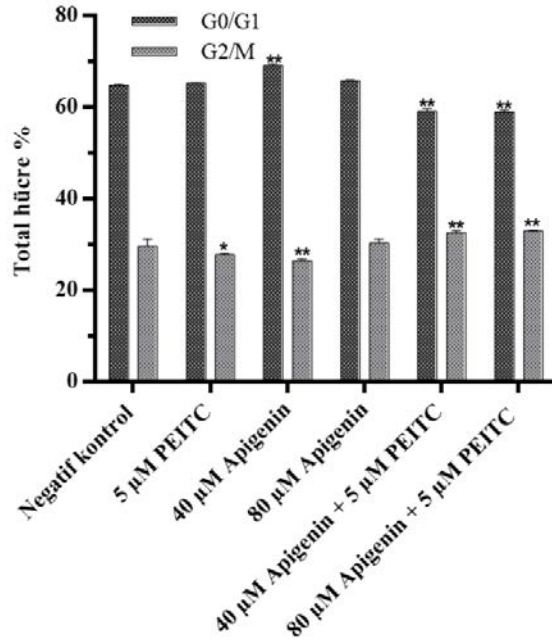
Şekil 122. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$).

4.5.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkileri

RWPE-1 hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkileri analiz edildiğinde G2/M evresinde bulunan hücre oranının %27.9'dan artan doz grubu sırasıyla %27.3'e, %26.0'a, %29.3'e, %32.1'e ve %32.8'e arttığı tespit edildi (Şekil 123). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saatlik doz uygulamalarının hücre döngüsü üzerine etkilerinin istatistiksel analizi Şekil 124'de sunuldu. RWPE-1 hücre hattında saptanan G2/M evresindeki total hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 124).



Şekil 123. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 124. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında hücre döngüsü üzerine etkisinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

4.5.3. Apigenin ve PEITC'in hücre döngüsü üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması

Hücre döngüsü verileri karşılaştırıldığında LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında Cabazitaxel'in hücre döngüsünü G2/M evresinde daha etkin olarak durdurduğu, C4-2 hücre hattında ise her iki uygulama grubunun benzer etkilere sahip olduğu tespit edildi. Apoptotik etkisi ile uyumlu olarak Cabazitaxel'in RWPE-1 normal prostat epitel hücre hattında Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile karşılaştırıldığında hücre döngüsünün G2/M evresinde durmasına daha fazla oranda yol açtığı saptandığından ilacın kanser seçici toksik etkisinin düşük olduğu doğrulandı. Apigenin ve PEITC kombinasyonu, kanser hücrelerinde hücre döngüsü üzerine daha fazla etkin olmasından dolayı avantajlı bulundu.

4.6. Oksidatif stres üzerine etkiler

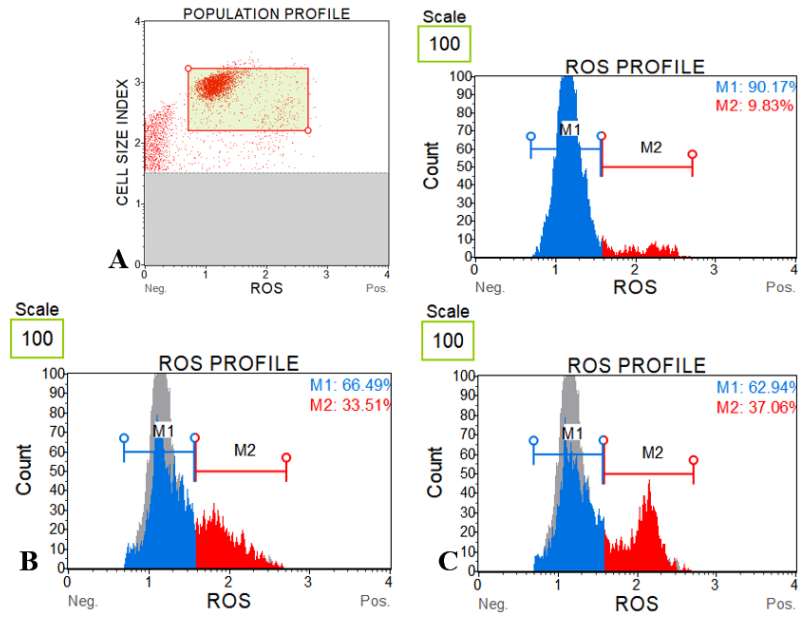
4.6.1. Cabazitaxel'in oksidatif stres üzerine etkisi

Gerçekleştirilen optimizasyonlar sonucunda Cabazitaxel'in tedavi süresi içerisinde maksimum ROS artışına 24. saatte neden olduğu saptandığından oksidatif stres analizlerinin tümü Cabazitaxel için 24 saatte gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Cabazitaxel'in prooksidan etkisinin bulunduğunu ve 24. saatte doz artışı ile orantılı olarak hücrelerde intrasellüler ROS artışına neden olduğunu ortaya koydu.

4.6.1.1. Cabazitaxel'in oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

4.6.1.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

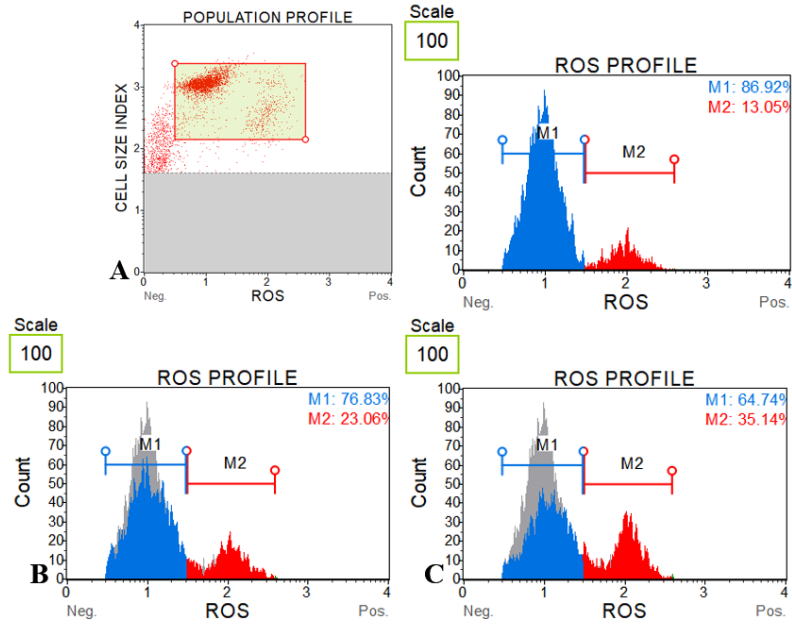
Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi analiz edildiğinde ROS-pozitif hücre oranının %9.83'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %33.5'e ve %37.06'ya arttığı saptandı (Şekil 125).



Şekil 125. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.6.1.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

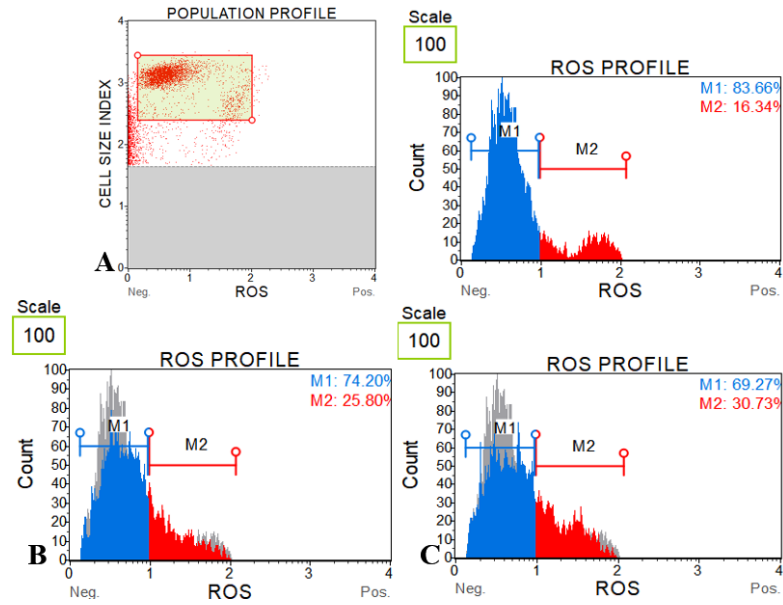
Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi analiz edildiğinde ROS-pozitif hücre oranının %13.05'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %23.06'ya ve %35.14'e arttığı saptandı (Şekil 126).



Şekil 126. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.6.1.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

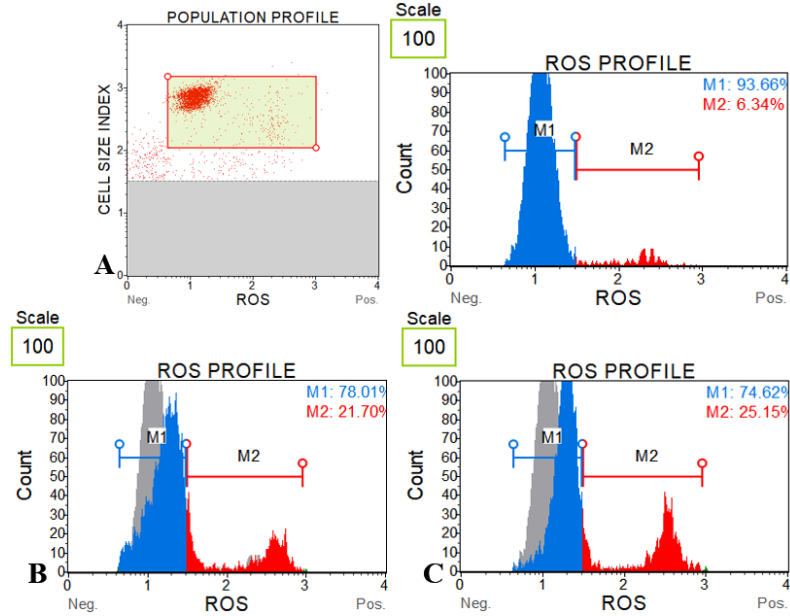
Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi analiz edildiğinde ROS-pozitif hücre oranının %16.34'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %25.80'e ve %30.73'e arttığı saptandı (Şekil 127).



Şekil 127. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.6.1.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

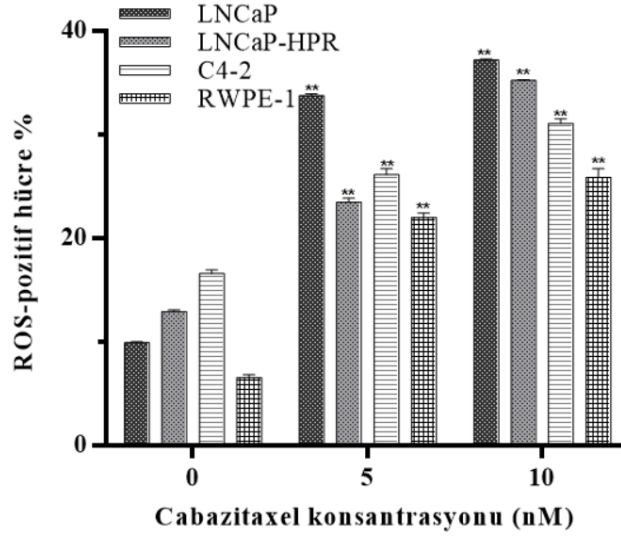
Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi analiz edildiğinde ROS-pozitif hücre oranının %6.34'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %21.70'e ve %25.15'e arttığı saptandı (Şekil 128).



Şekil 128. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.6.1.1.5. Cabazitaxel'in akış sitometrik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi

Cabazitaxel'in LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi ve anlamlılığı ($p < 0.01$) Şekil 129'da sunuldu.



Şekil 129. Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

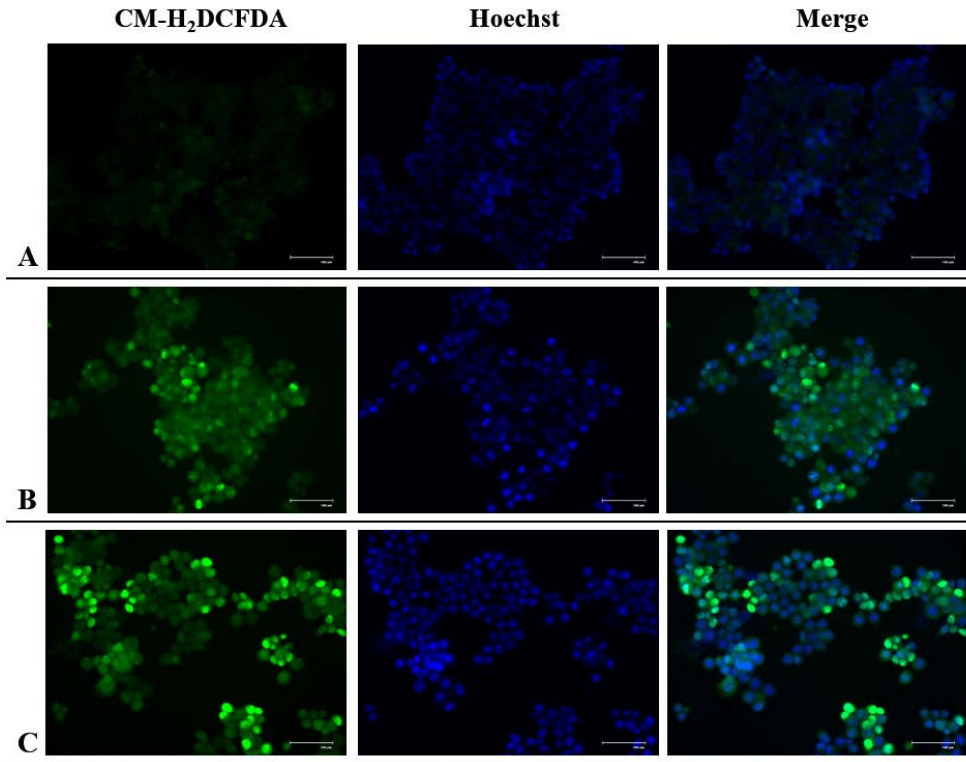
4.6.1.2. Cabazitaxel'in oksidatif stres üzerine etkilerinin mikroskopik analizi

Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi hücre hatlarında mikroskopik olarak analiz edildi. Bu kapsamda hücrelerde 24 saatlik uygulama süresi sonunda intrasellüler hidrojen peroksit ve süperoksit birikimleri görüntüledi. Hücrelerde, akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu olarak doz artışına bağlı yeşil floresan miktarındaki artış hidrojen peroksit lehine ve kırmızı floresan miktarındaki artış süperoksit anyonlarının birikimi lehine yorumlandı ve hücreler 100 μm ölçekte Hoechst nükleus boyaması ile çakışık olarak görüntüledi.

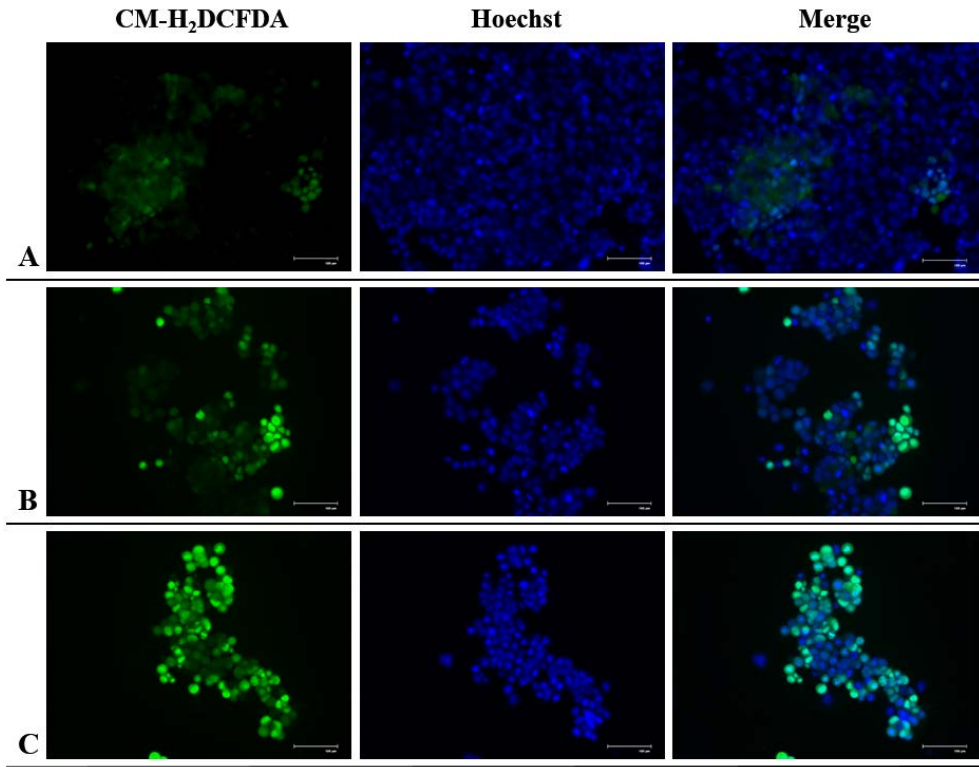
4.6.1.2.1. Hidrojen peroksit birikiminin mikroskopik analizi

Şekil 130-133'de görüntülediği üzere LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 24 saatlik 5 ve 10 nM dozlarda Cabazitaxel uygulamasının doz artışına bağlı şekilde intrasellüler hidrojen peroksit birikimine en belirgin olarak LNCaP hücre hattında neden olduğu gözlemlendi (Şekil 130). LNCaP hücrelerinde 24 saat sonunda nükleus morfolojisi korunan hücre popülasyonu içerisinde hidrojen peroksit miktarının artış gösterdiği ve yeşil floresan ışığa veren hücre yoğunluğunda belirgin bir artış olduğu tespit edildi. Benzer şekilde LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında da Cabazitaxel'in doz artışına bağlı hidrojen peroksit birikiminin tetiklendiği tespit edildi (Şekil 131 ve Şekil 132). Hidrojen peroksit artışına ek olarak kanser hücrelerinin tümünde nüklear morfolojide doz artışına bağlı değişimler gözlemlendi. RWPE-1 hücre hattında ise özellikle 10 nM dozda intrasellüler hidrojen peroksit miktarında artış ve

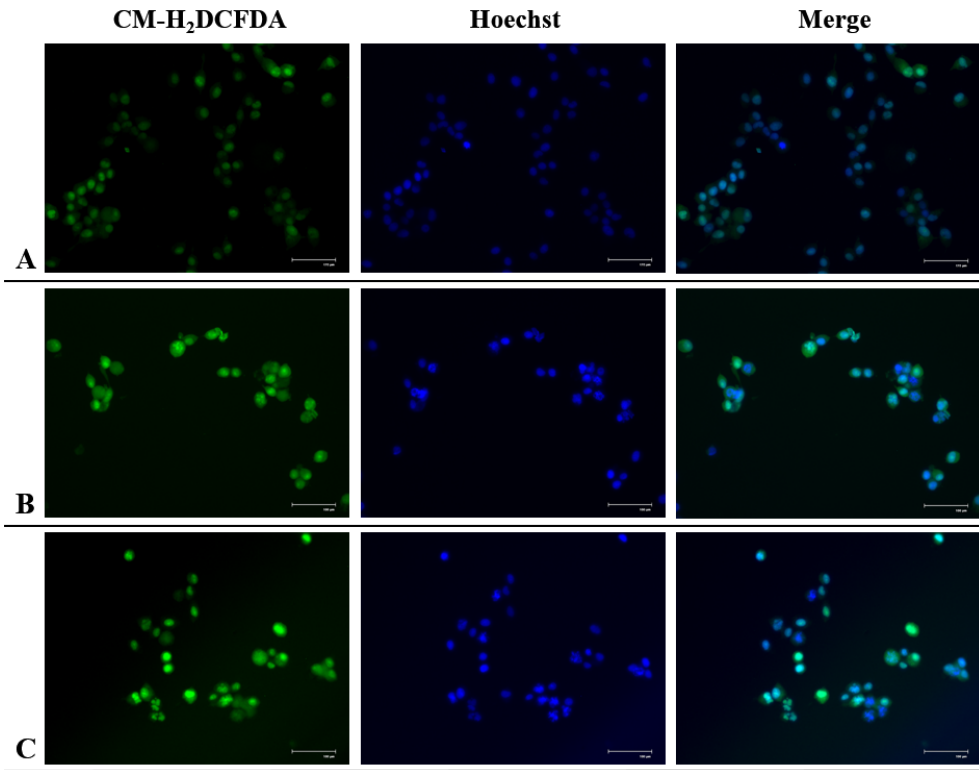
hücre morfolojisinde belirgin bozulmalar dikkat çekti (Şekil 133). Ek olarak, hücrelerin doz uygulanmadan intrasellüler hidrojen peroksit düzeyleri karşılaştırıldığında endojen hidrojen peroksit düzeyi en düşük olan hücrelerin RWPE-1 ve LNCaP olduğu, C4-2 ve LNCaP-HPR hücre hatlarında ise muamelesiz endojen oksidatif stresin daha yüksek bulunduğu tespit edildi. Bu durum akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu bulundu.



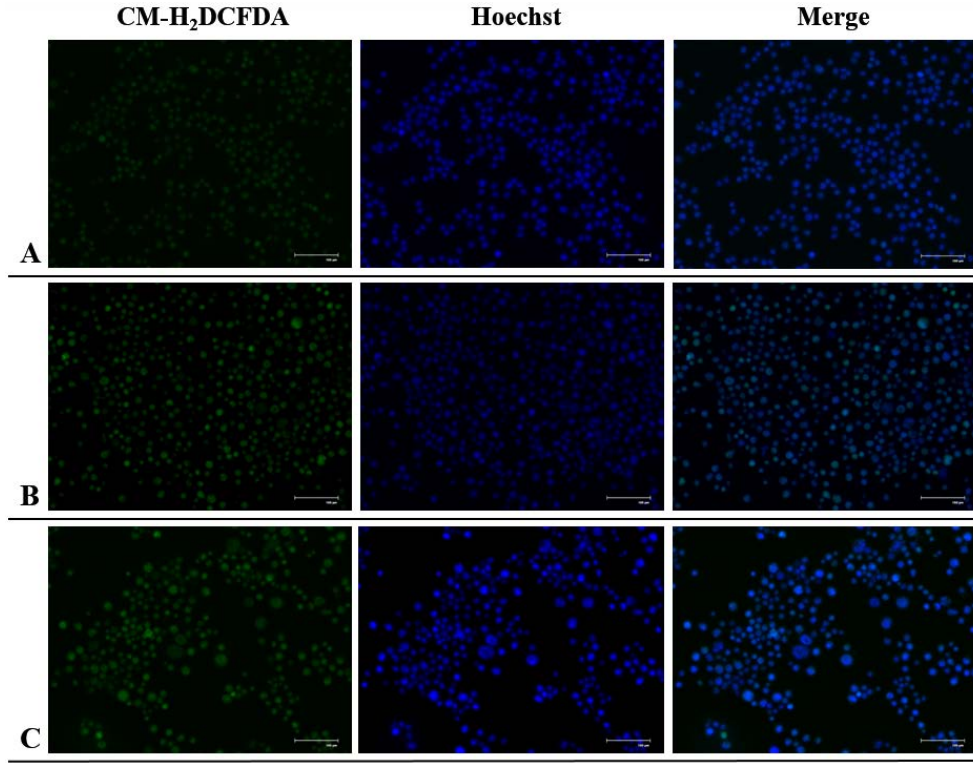
Şekil 130. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 131. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



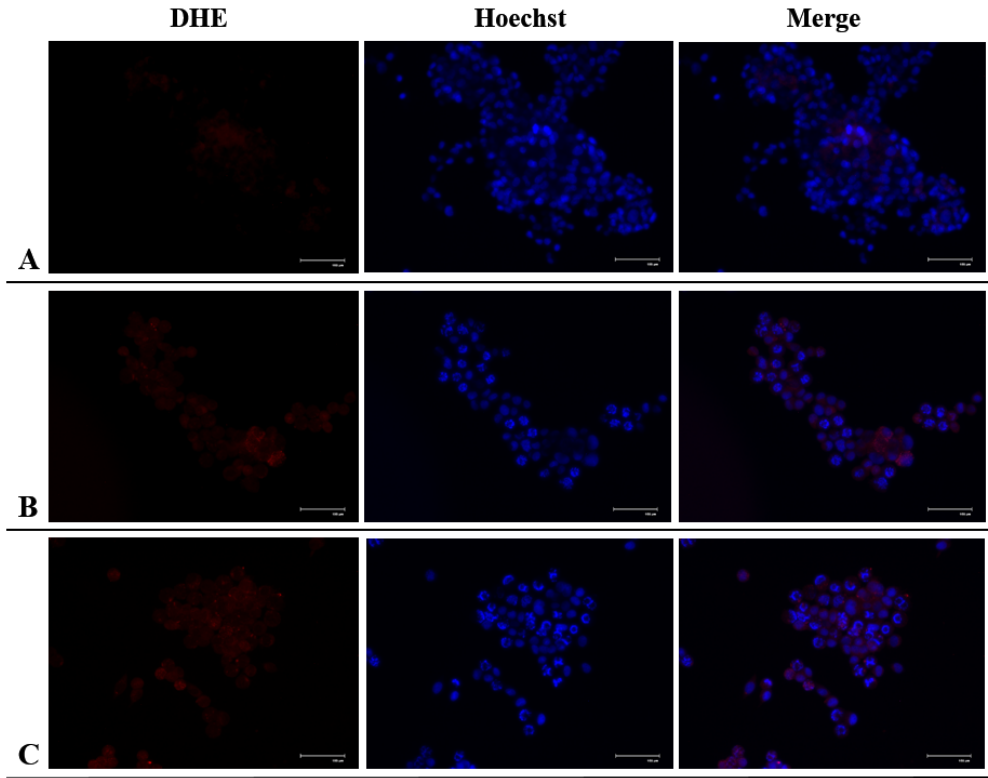
Şekil 132. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



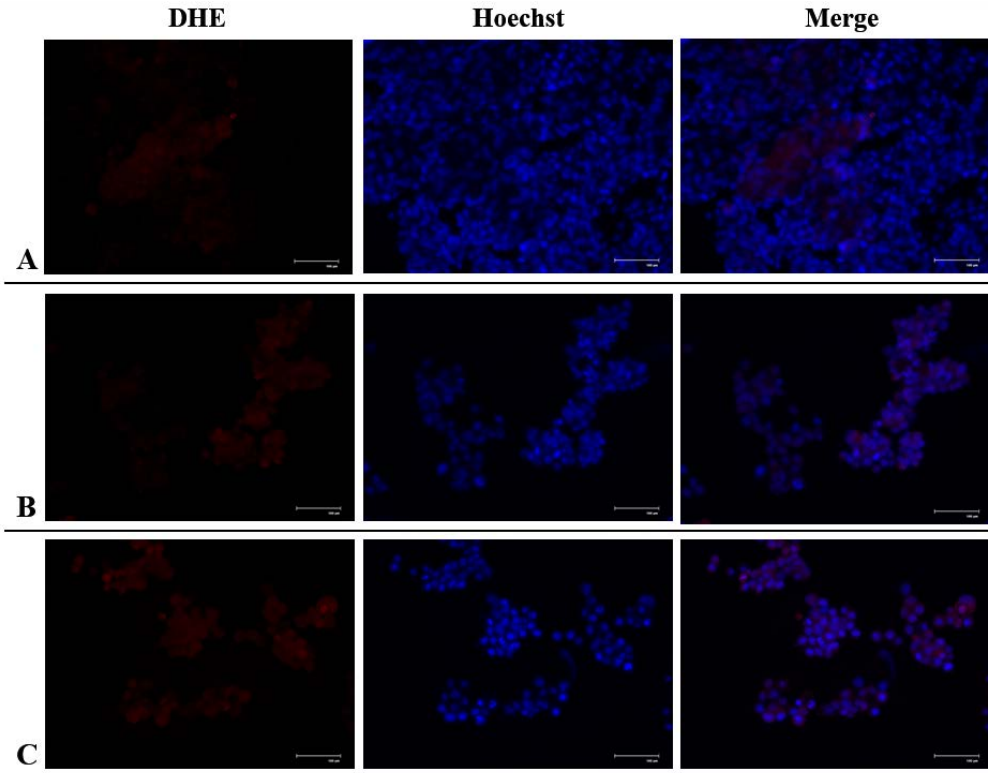
Şekil 133. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.6.1.2.2. Süperoksit birikiminin mikroskopik analizi

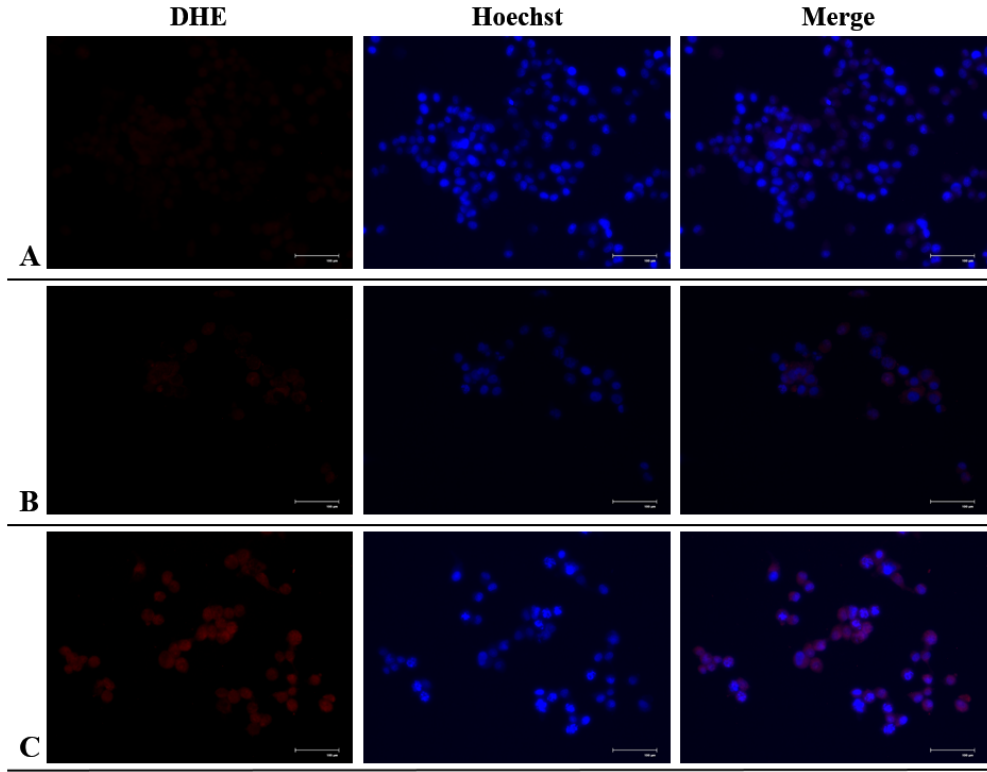
LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 24 saatlik 5 ve 10 nM dozlarda Cabazitaxel uygulamasının intrasellüler süperoksit birikimine etkileri mikroskopik olarak analiz edildiğinde elde edilen verilerin akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu olduğu, tüm hücre hatlarında Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak nükleus bütünlüğü korunan hücre popülasyonu içerisinde kırmızı floresan ışığa veren hücrelerin artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 134-137). Hücrelerde gözlenen kırmızı floresan miktarındaki artış ilaca 24 saatlik yanıt olarak intrasellüler süperoksit birikimini doğrular nitelikteydi. Süperoksit artışına ek olarak hücrelerin tümünde nükleer morfolojide doz artışına bağlı değişimler gözlemlendi (Şekil 134-137).



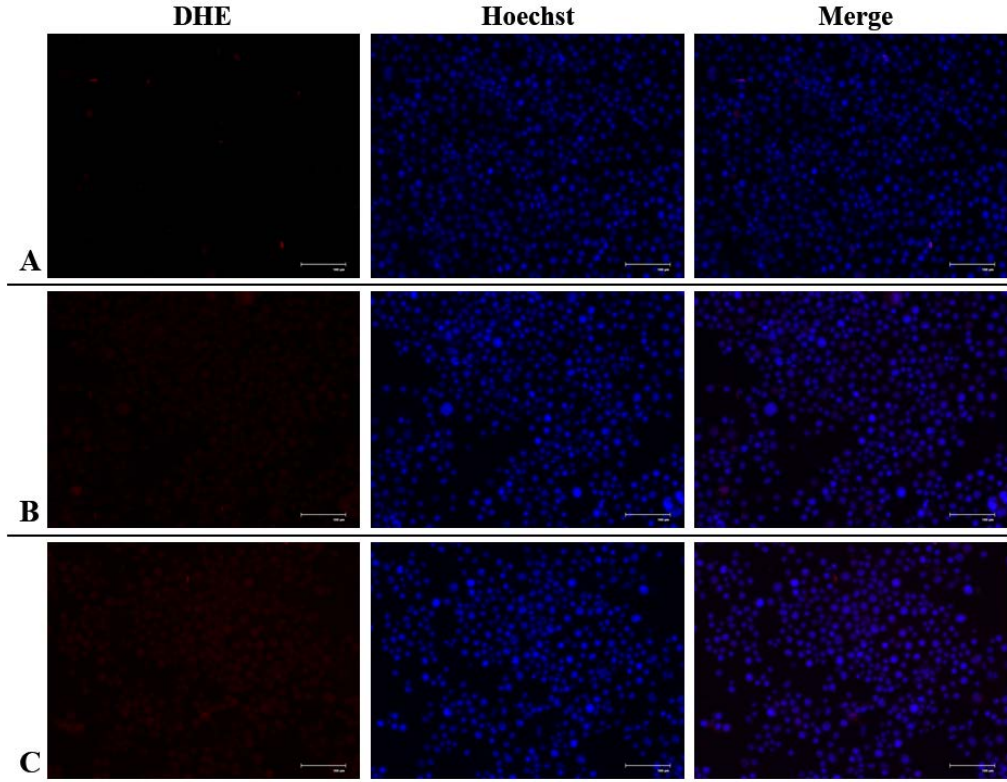
Şekil 134. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 135. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 136. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 137. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

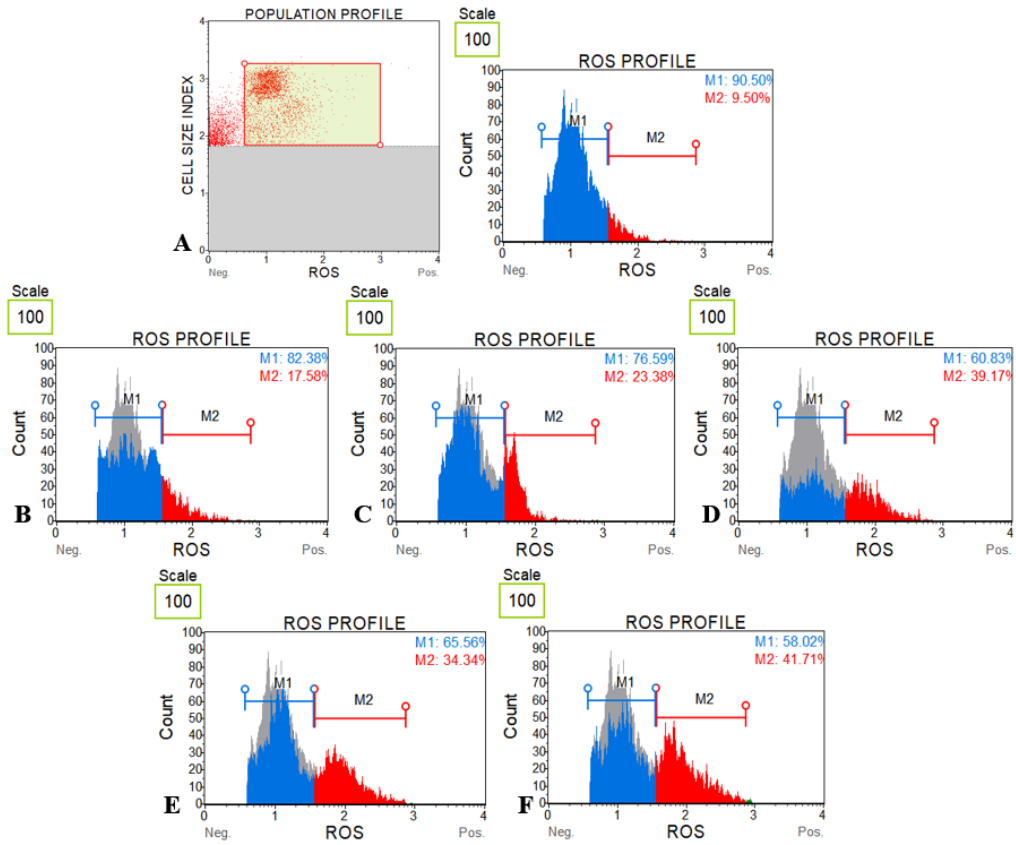
4.6.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun oksidatif stres üzerine etkisi

Gerçekleştirilen optimizasyonlar sonucunda Apigenin ve PEITC kombinasyonunun tedavi süresi içerisinde maksimum ROS artışına 12. saatte neden olduğu saptandığından oksidatif stres analizlerinin tümü 12 saatte gerçekleştirildi. Elde edilen oksidatif stres verileri Apigenin ve PEITC kombinasyonunun, ajanların tek başlarına uygulandıklarında neden oldukları prooksidan etkiden daha fazla prooksidan etkiye yol açtığını ortaya koydu. Kanser hücrelerinde 12. saatte doz artışına paralel olarak intrasellüler oksidatif stres düzeyinde artış saptanırken RWPE-1 normal prostat epitel hücrelerinde oksidatif stresin çok daha az düzeyde arttığı tespit edildi.

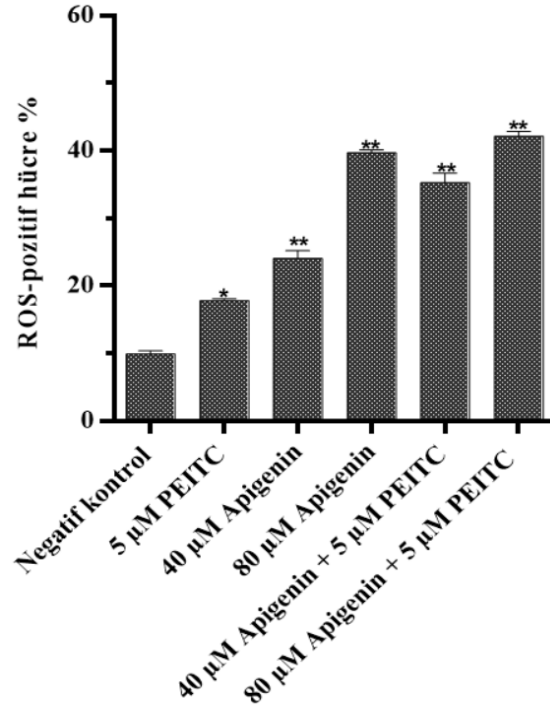
4.6.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun oksidatif stres üzerine etkilerinin akış sitometrik analizi

4.6.2.1.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

LNCaP hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkileri analiz edildiğinde, ROS-pozitif hücre oranının %9.50'den doz sırasına bağlı olarak %17.58'e, %23.38'e, %39.17'ye, %34.34'e ve %41.71'e arttığı saptandı (Şekil 138). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu ROS-pozitif hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, $p<0.01$) bulundu (Şekil 139).



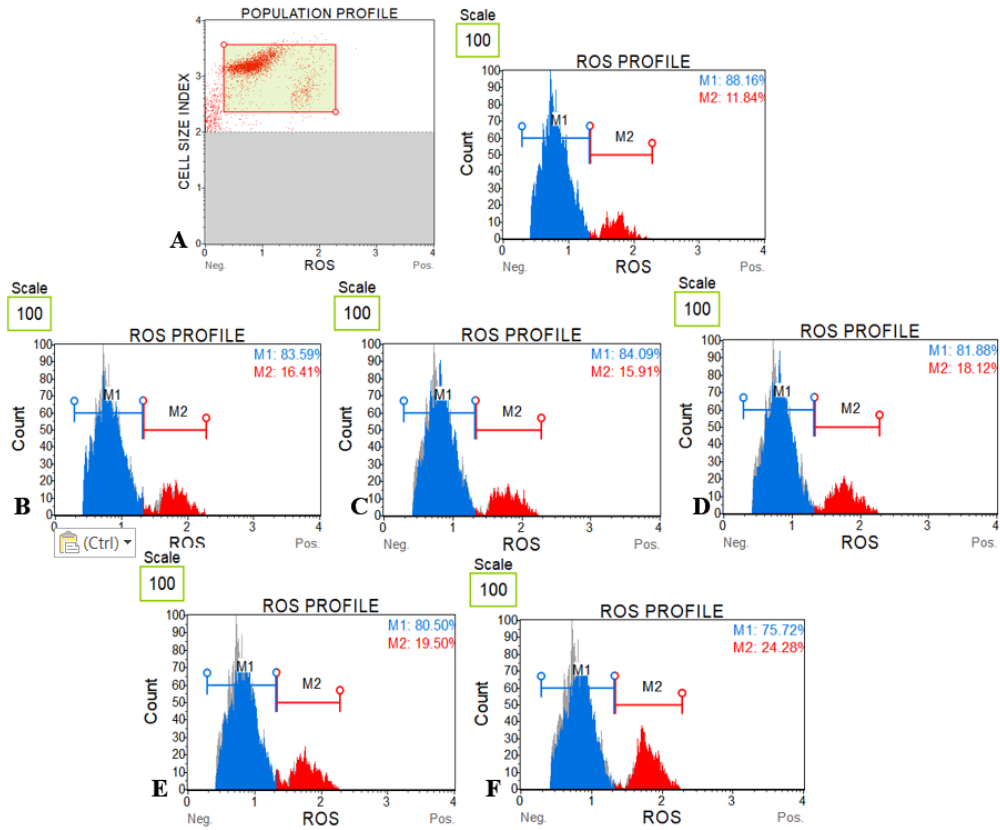
Şekil 138. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 µM PEITC (C) 40 µM Apigenin (D) 80 µM Apigenin (E) 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC (F) 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC



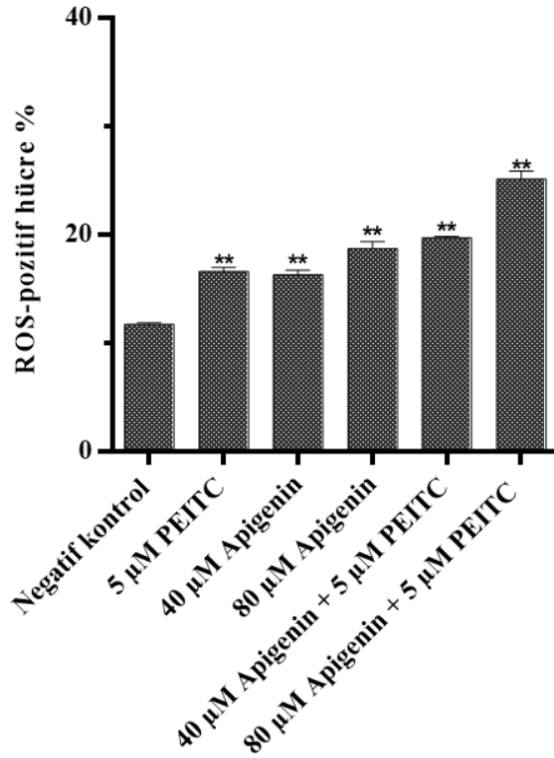
Şekil 139. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.6.2.1.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

LNCaP-HPR hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkileri analiz edildiğinde, ROS-pozitif hücre oranının %11.84'den doz sırasına bağlı olarak %16.41'e, %15.91'e, %18.12'ye, %19.50'ye ve %24.28'e arttığı saptandı (Şekil 140). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu ROS-pozitif hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $p < 0.01$) bulundu (Şekil 141).



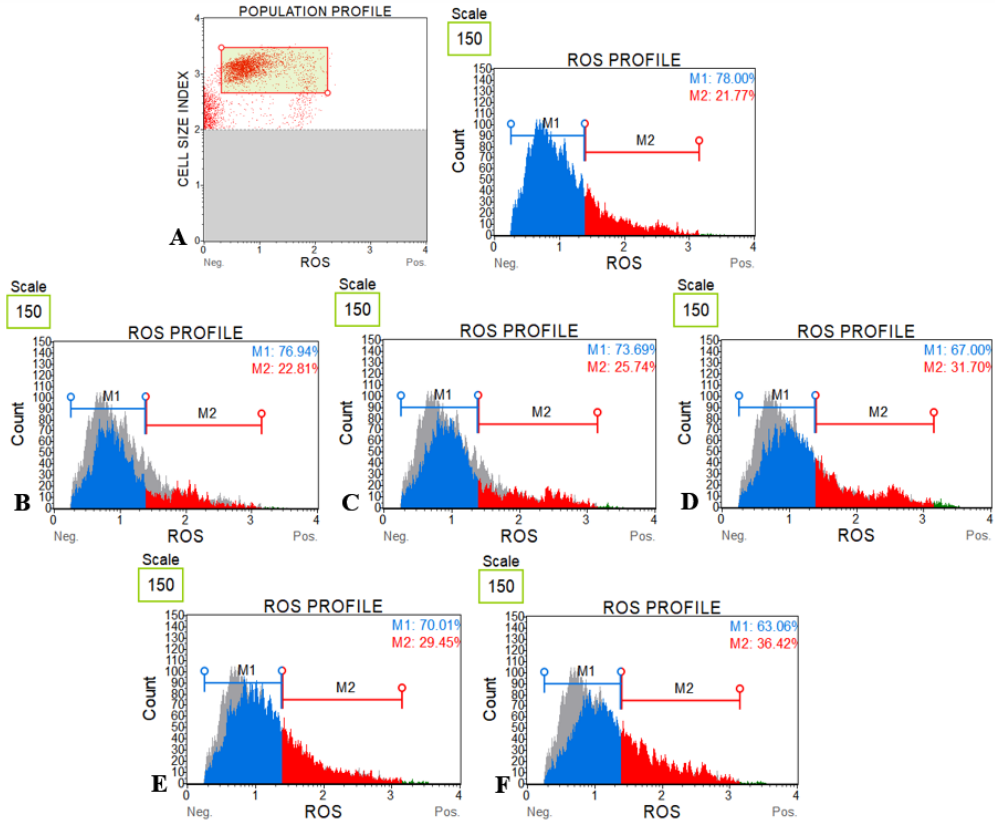
Şekil 140. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



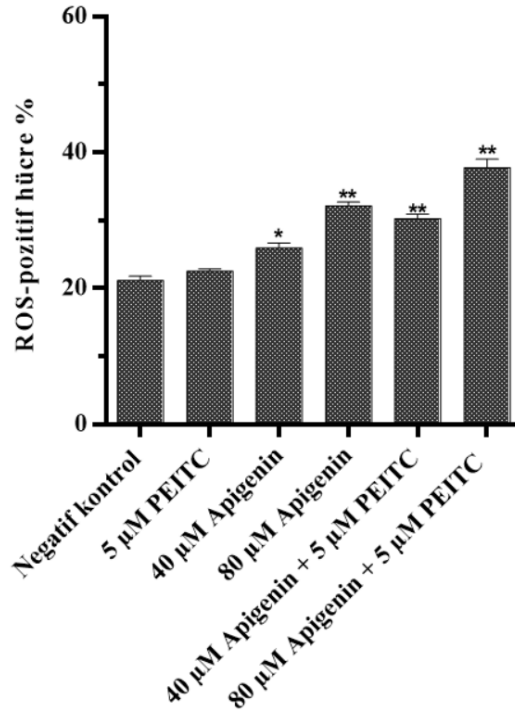
Şekil 141. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.6.2.1.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

C4-2 hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkileri analiz edildiğinde, ROS-pozitif hücre oranının %21.77'den doz sırasına bağlı olarak %22.81'e, %25.74'e, %31.70'e, %29.45'e ve %36.42'ye arttığı saptandı (Şekil 142). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu ROS-pozitif hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $p < 0.01$) bulundu (Şekil 143).



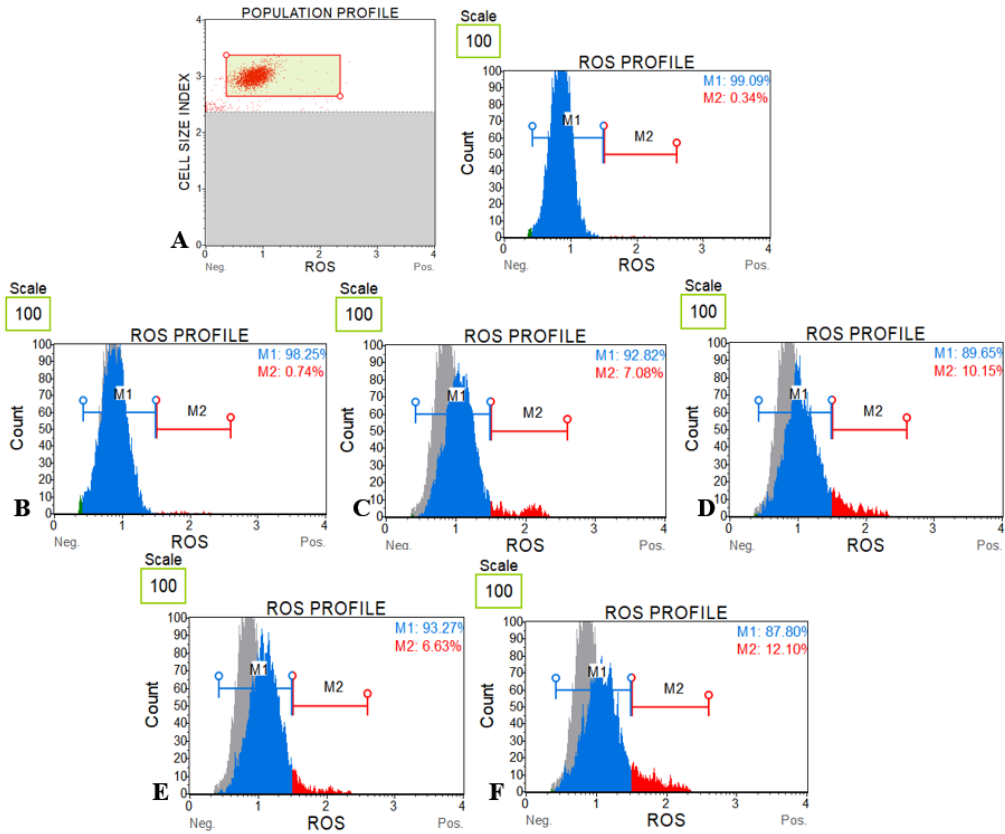
Şekil 142. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



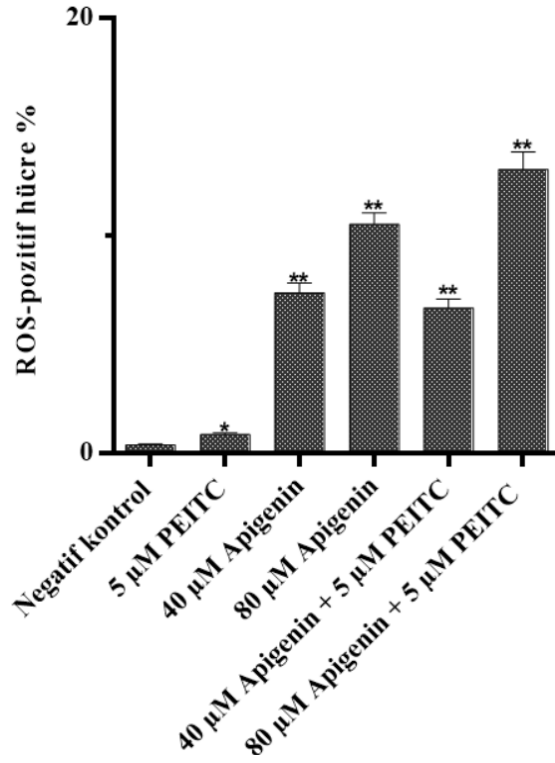
Şekil 143. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.6.2.1.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında oksidatif stres üzerine etkisinin akış sitometrik analizi

RWPE-1 hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkileri analiz edildiğinde, ROS-pozitif hücre oranının %0.34'den doz sırasına bağlı olarak %0.74'e, %7.08'e, %10.15'e, %6.63'e ve %12.10'a arttığı saptandı (Şekil 144). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu ROS-pozitif hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $p < 0.01$) bulundu (Şekil 145).



Şekil 144. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 145. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

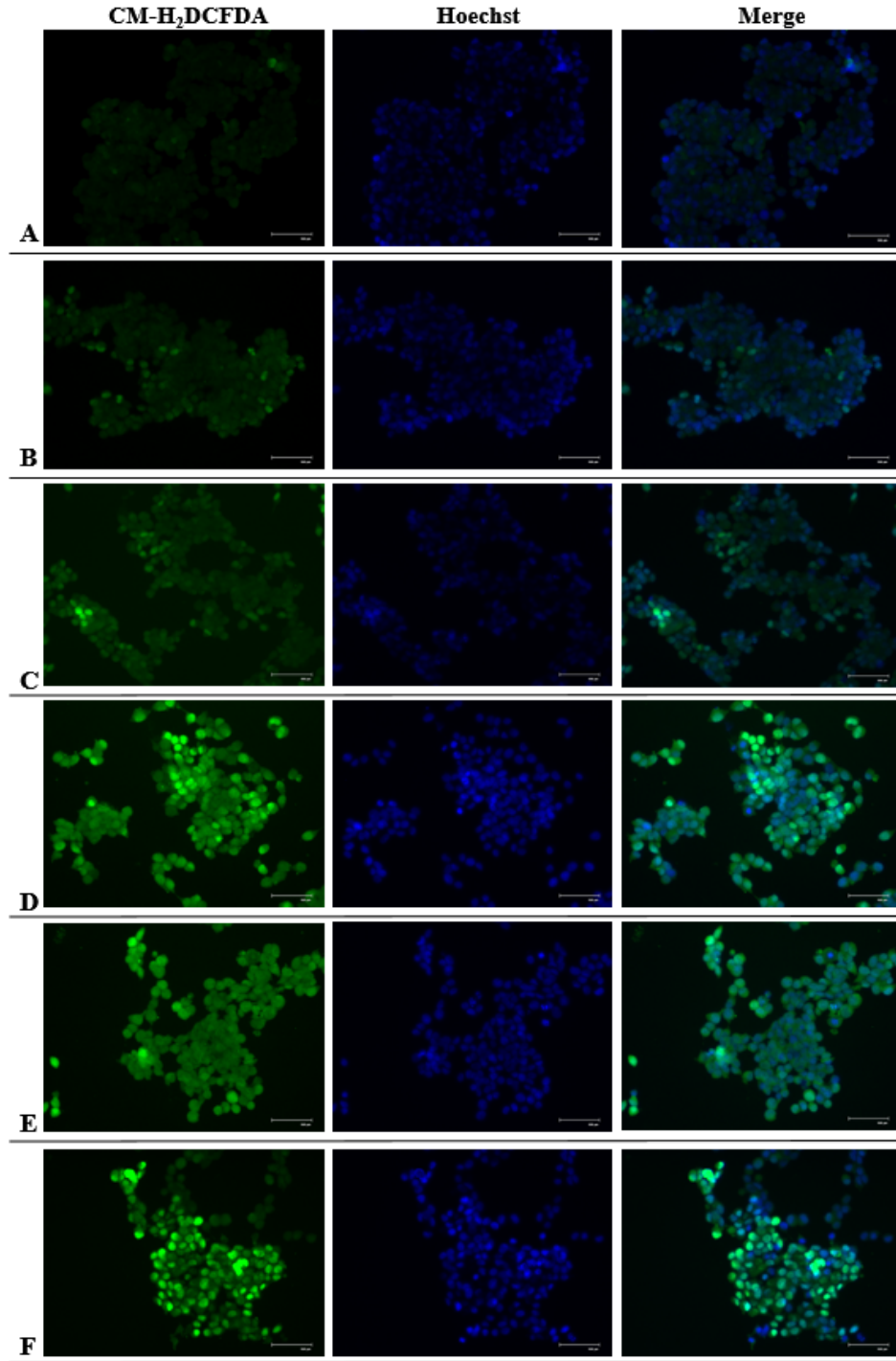
4.6.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun oksidatif stres üzerine etkilerinin mikroskopik analizi

Apigenin ve PEITC'in 12 saatlik oksidatif stres üzerine etkisi tüm hücre hatlarında mikroskopik olarak analiz edildi. Bu kapsamda hücrelerde 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik uygulama süresi sonunda neden oldukları intrasellüler hidrojen peroksit ve süperoksit birikimleri görüntülendi. Hücrelerde, akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu olarak doz grubu sırasına bağlı yeşil floresan miktarındaki artış hidrojen peroksit lehine ve kırmızı floresan miktarındaki artış süperoksit anyonlarının birikimi lehine yorumlandı ve hücreler 100 µm ölçekte Hoechst nükleus boyaması ile çakışık olarak görüntülendi.

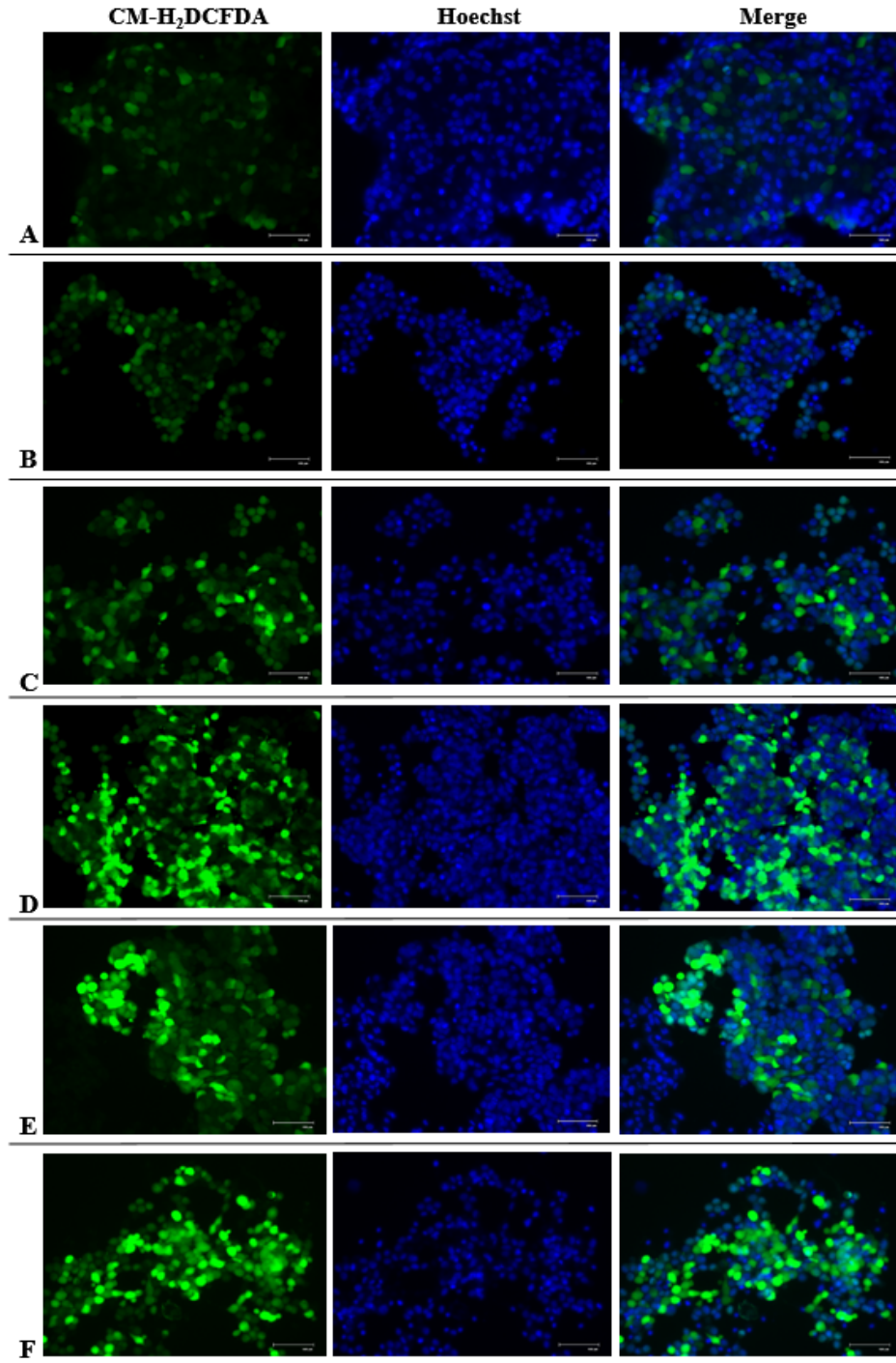
4.6.2.2.1. Hidrojen peroksit birikiminin mikroskopik analizi

Şekil 147-150'de görüntülediği üzere LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 12 saatlik 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının uygulanması sonucu nükleus morfolojisi korunan hücre popülasyonu içerisinde yeşil

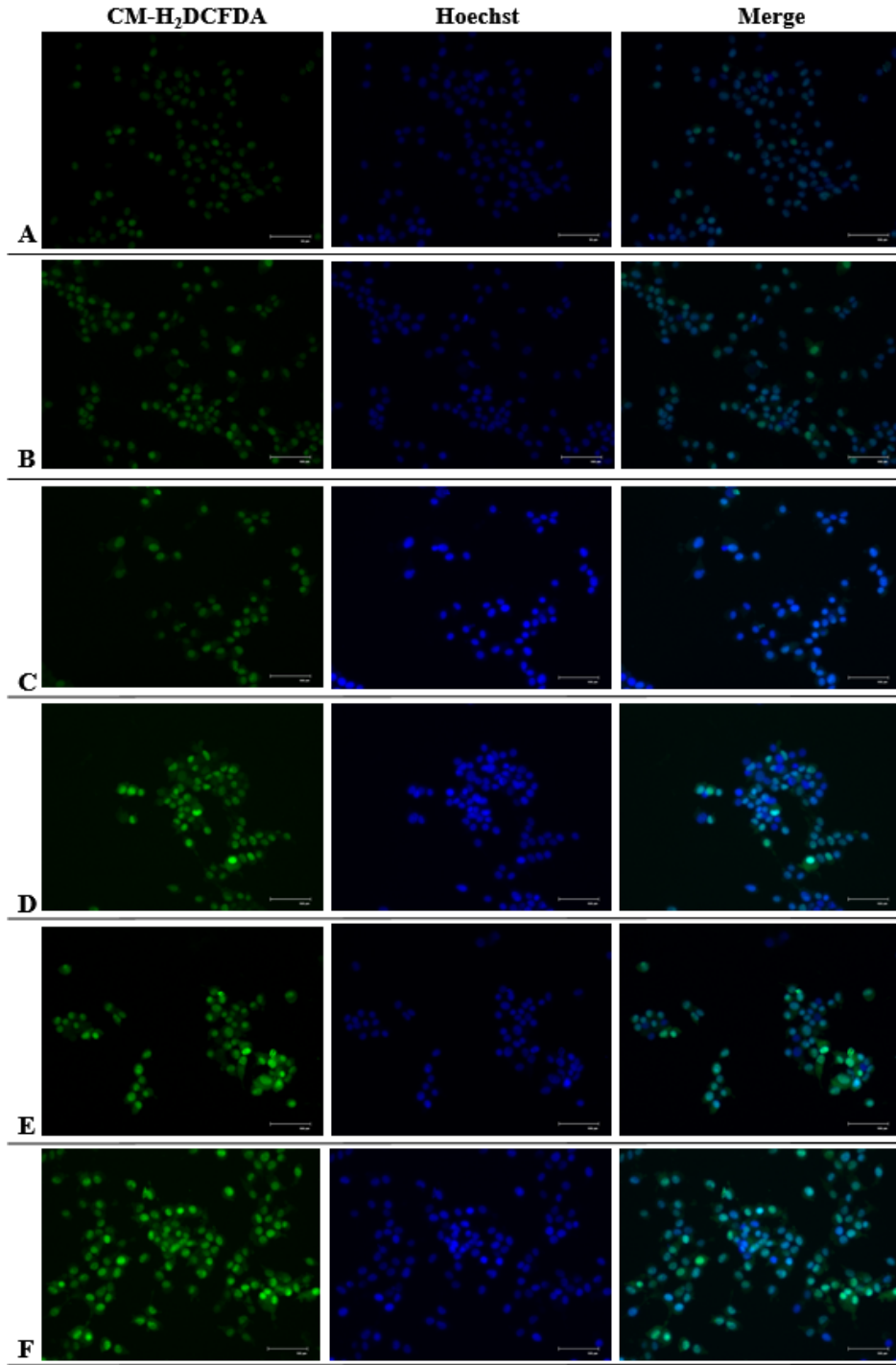
floresan ışımaya veren hücre oranının ve dolayısıyla intrasellüler hidrojen peroksit düzeyinin artış gösterdiği gözlemlendi. Özellikle 5 µM PEITC doz grubu dışındaki doz gruplarının intrasellüler hidrojen peroksit düzeyinde belirgin artışa neden olduğu, kombin doz gruplarının ajanların tek başlarına uygulandıkları doz grupları ile kıyaslandığında hidrojen peroksit miktarındaki artışı daha fazla tetiklediği tespit edildi. Ek olarak mikroskopik veriler, akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu olarak intrasellüler hidrojen peroksit düzeyindeki artışın kanser hücrelerinde daha fazla tetiklendiğini doğruladı (Şekil 146-149).



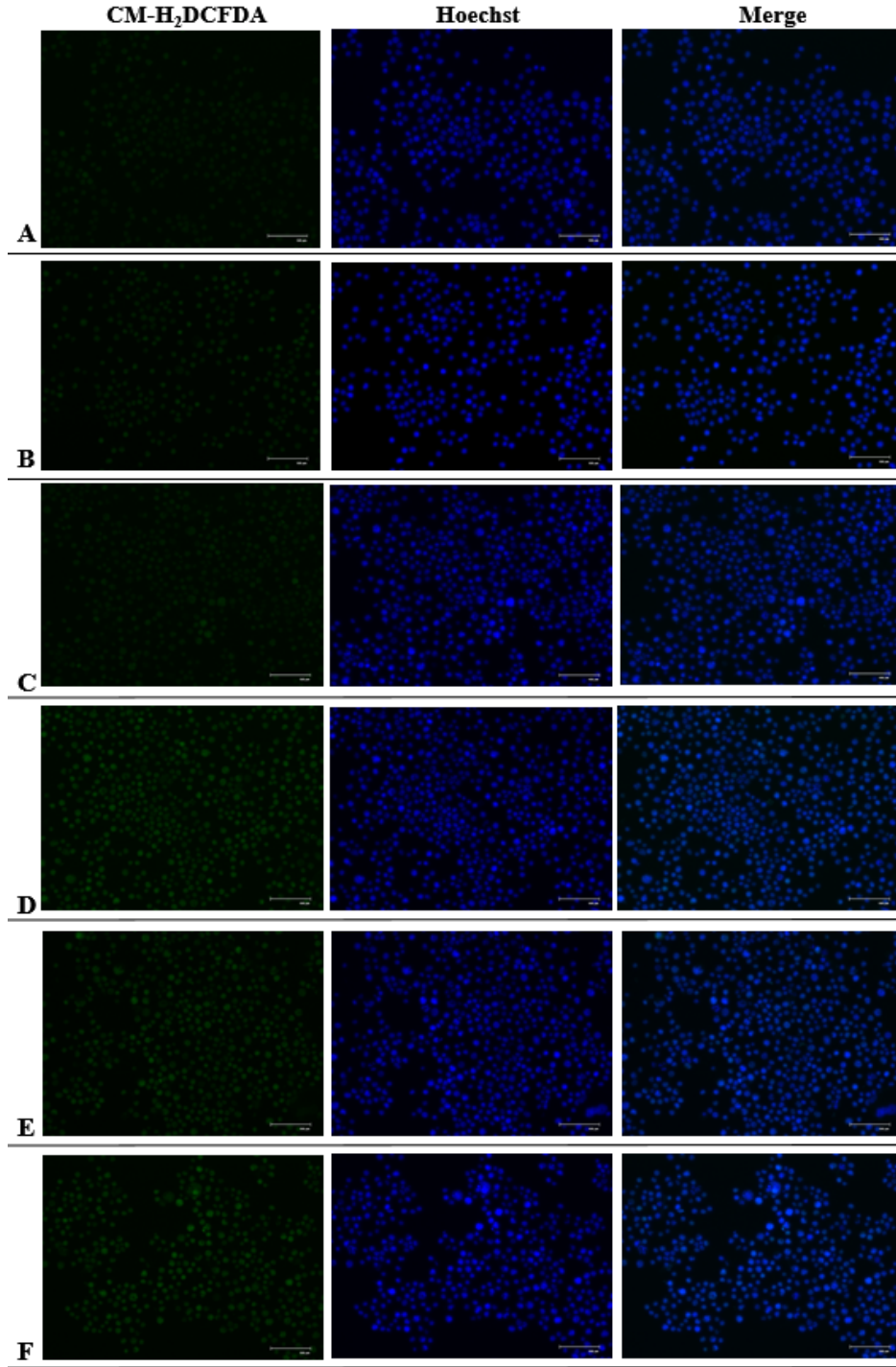
Şekil 146. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 12 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 µm) (A) Kontrol (B) 5 µM PEITC (C) 40 µM Apigenin (D) 80 µM Apigenin (E) 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC (F) 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC



Şekil 147. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 12 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 μ m) (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



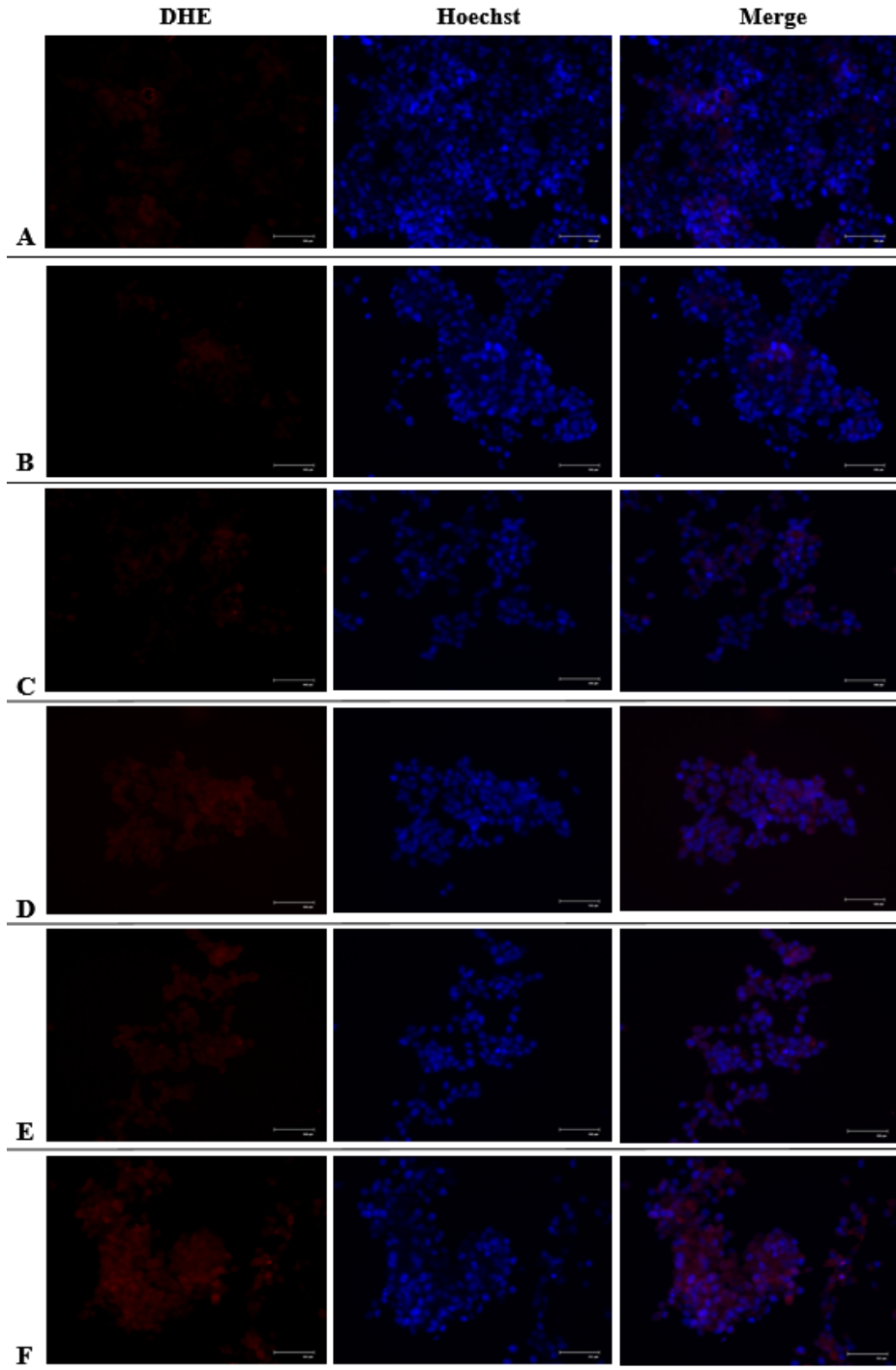
Şekil 148. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 12 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 μ m) (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



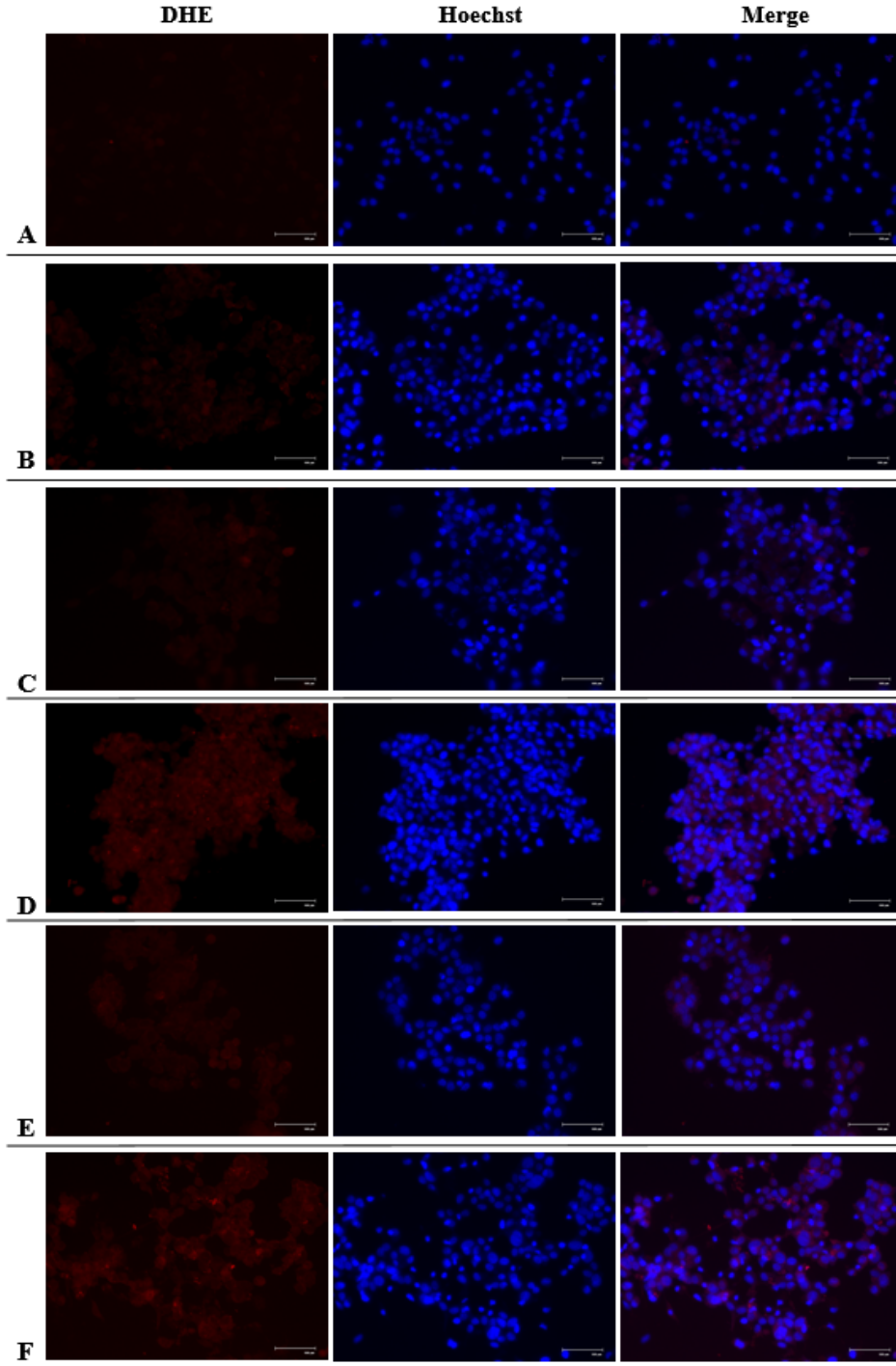
Şekil 149. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 12 saatlik hidrojen peroksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 μm) (A) Kontrol (B) 5 μM PEITC (C) 40 μM Apigenin (D) 80 μM Apigenin (E) 40 μM Apigenin + 5 μM PEITC (F) 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC

4.6.2.2.2. Süperoksit birikiminin mikroskobik analizi

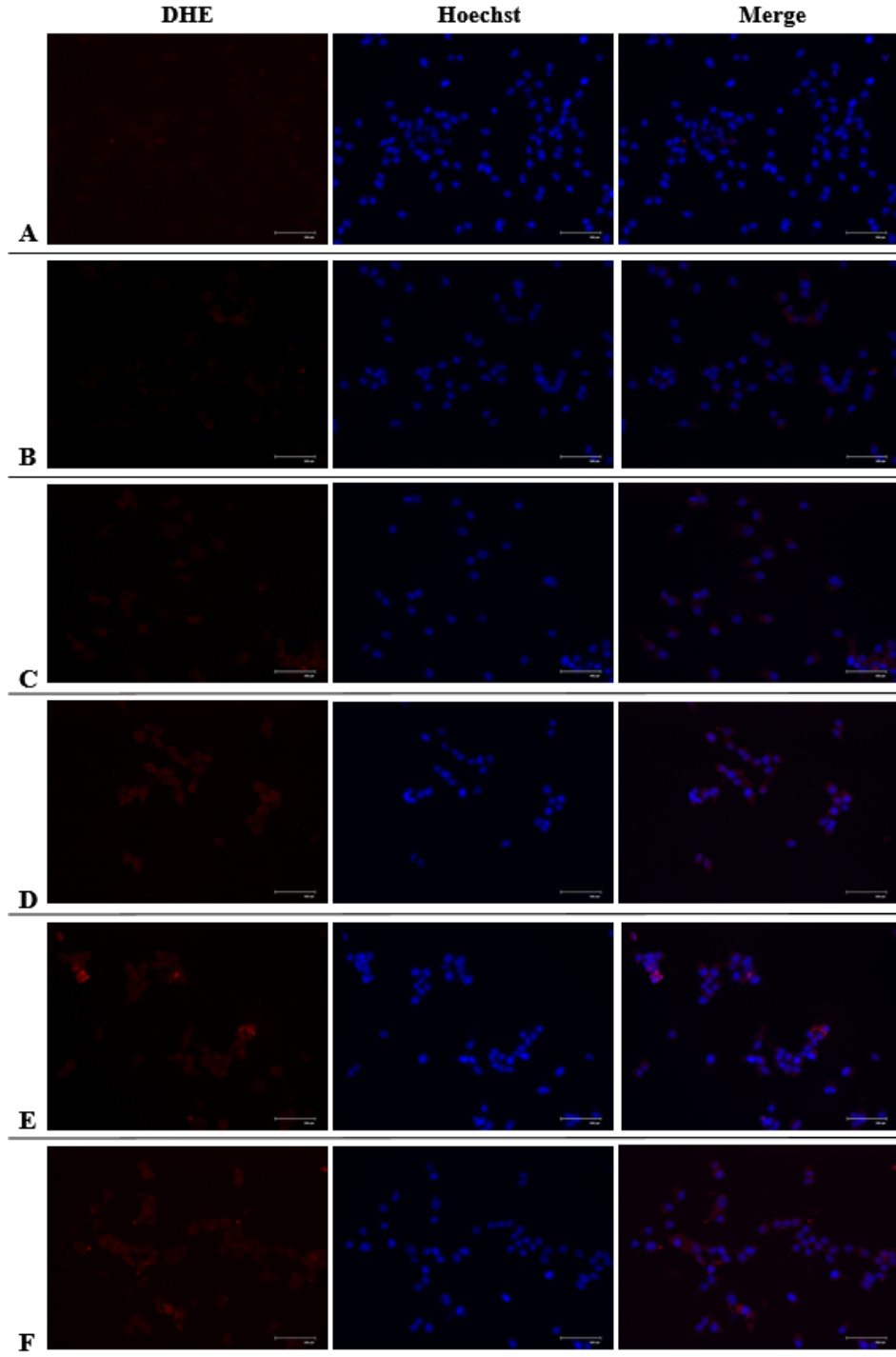
LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarına 12 saatlik 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının uygulanmasını takiben intrasellüler süperoksit düzeyi mikroskobik olarak analiz edildiğinde elde edilen verilerin akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu olduğu, tüm hücre hatlarında doz grubu sırasına bağlı olarak nükleus bütünlüğü korunan hücre popülasyonu içerisinde kırmızı floresan ışığa veren ve dolayısıyla süperoksit düzeyi yükselmiş olan hücrelerin artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 150-153). Hidrojen peroksit birikiminin mikroskobik analiz verileri ile uyumlu olarak, özellikle 5 μ M PEITC doz grubu dışındaki doz gruplarının intrasellüler süperoksit düzeyinde belirgin artışa neden olduğu, kombin doz gruplarının ajanların tek başlarına uygulandıkları doz grupları ile kıyaslandığında süperoksit miktarındaki artışı daha fazla tetiklediği tespit edildi. Ek olarak süperoksit birikiminin mikroskobik verileri, akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu olarak intrasellüler süperoksit düzeyindeki artışın kanser hücrelerinde daha fazla tetiklendiğini doğruladı (Şekil 150-153).



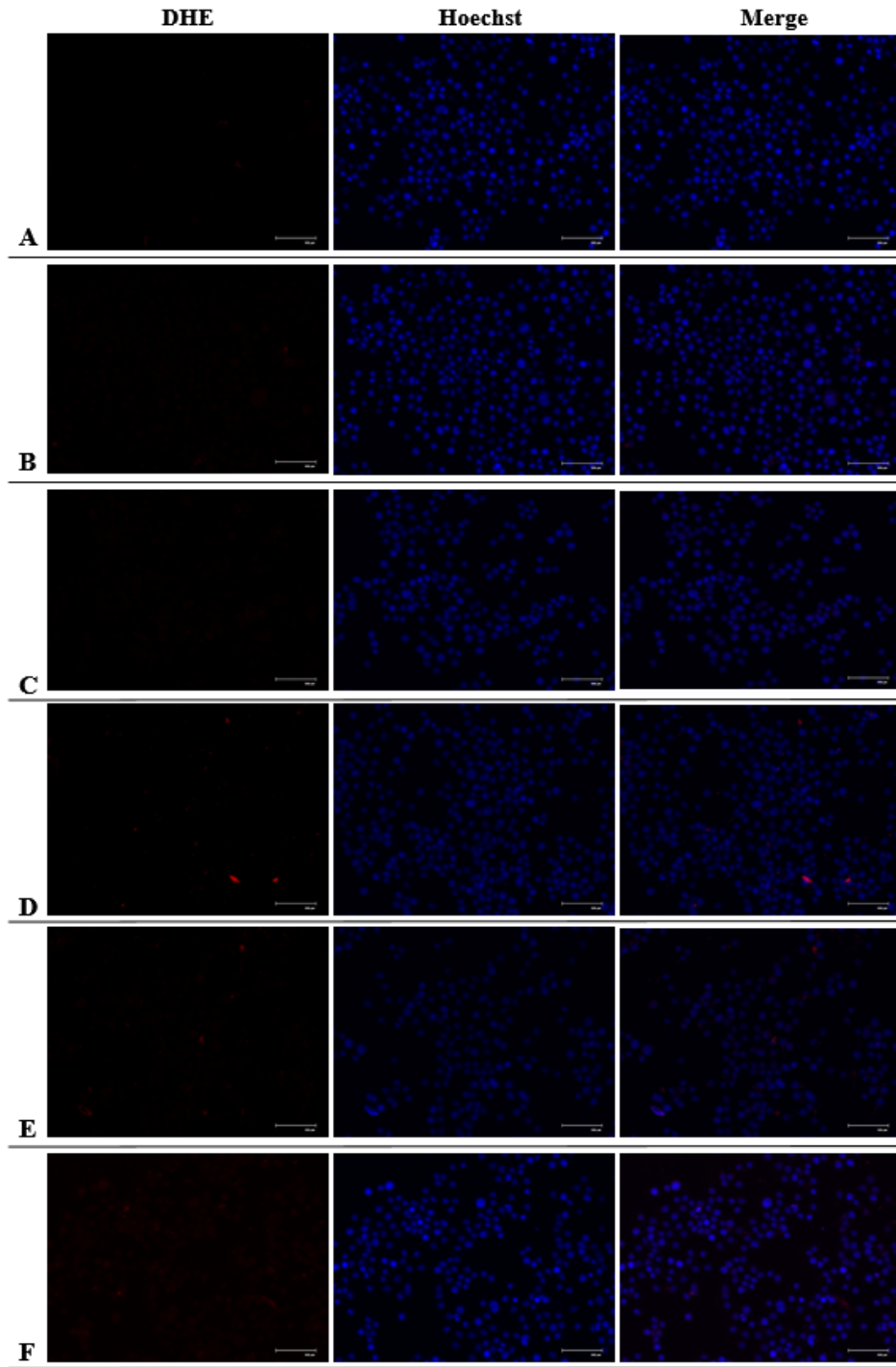
Şekil 150. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 12 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 μ m) (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 151. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 12 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 μm) (A) Kontrol (B) 5 μM PEITC (C) 40 μM Apigenin (D) 80 μM Apigenin (E) 40 μM Apigenin + 5 μM PEITC (F) 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC



Şekil 152. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 12 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskopik analizi (100 μ m) (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 153. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 12 saatlik süperoksit birikimine etkisinin mikroskobik analizi (100 μ m) (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.6.3. Apigenin ve PEITC'in oksidatif stres üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması

Oksidatif stres verileri karşılaştırıldığında LNCaP hücre hattında Apigenin ve PEITC kombinasyonunun prooksidan etkilerinin Cabazitaxel'e göre daha yüksek düzeyde olduğu, ancak redoks adapte LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında özellikle son doz gruplarında (10 nM Cabazitaxel ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC) Cabazitaxel'in ROS artışını çok az oranda fazla tetiklediği tespit edildi. Ek olarak RWPE-1 hücre hattında akış sitometrik oksidatif stres verileri ve daha belirgin olarak hidrojen peroksitin floresan mikroskopik analizi, kanser hücreleri üzerinde Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre daha fazla seçici prooksidan etkiye sahip olduğunu ortaya koydu.

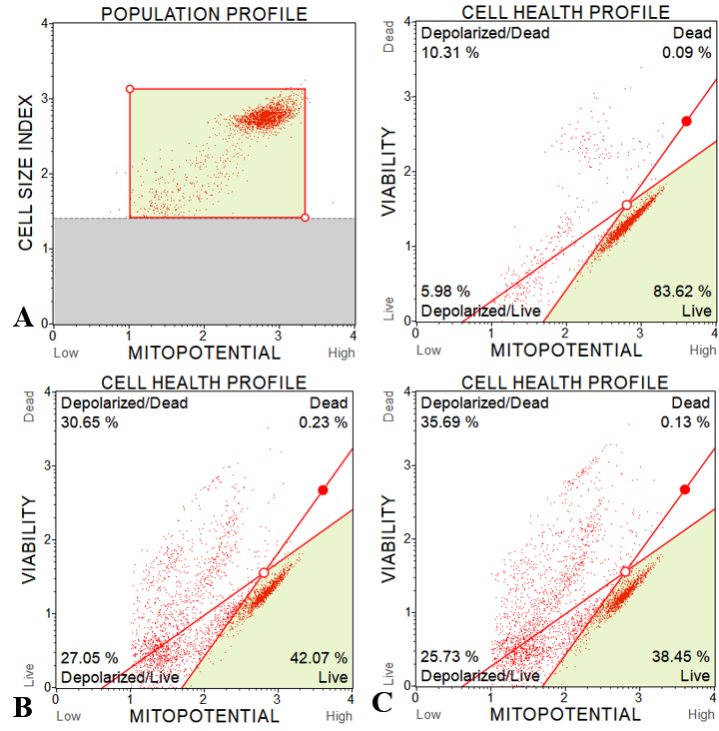
4.7. Mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkiler

4.7.1. Cabazitaxel'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

Cabazitaxel'in tedavi süresi içerisinde maksimum ROS artışına 24. saatte neden olduğu saptandığından mitokondriyal membran potansiyeli analizleri de tüm hücre hatlarında aynı zaman diliminde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Cabazitaxel'in prooksidan özelliği ile uyumlu olarak mitokondriyal membran potansiyelinde değişimlere neden olduğunu ve doza bağlı olarak kontrol grubu ile kıyaslandığında depolarize mitokondriye sahip hücre oranını arttırdığını gösterdi.

4.7.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

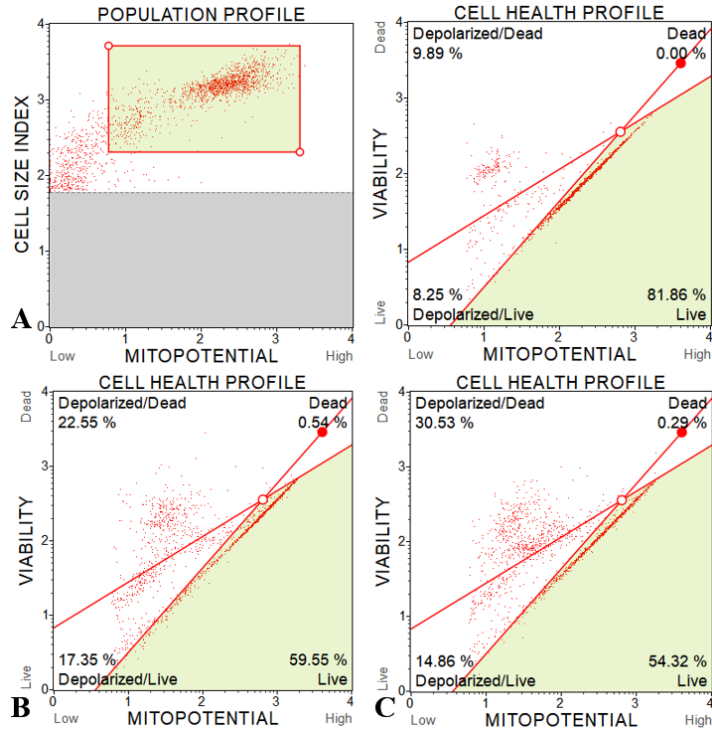
Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi analiz edildiğinde depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %16.29'dan doz artışına bağlı sırası ile %57.7'ye ve %61.42'ye arttığı saptandı (Şekil 154).



Şekil 154. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.7.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

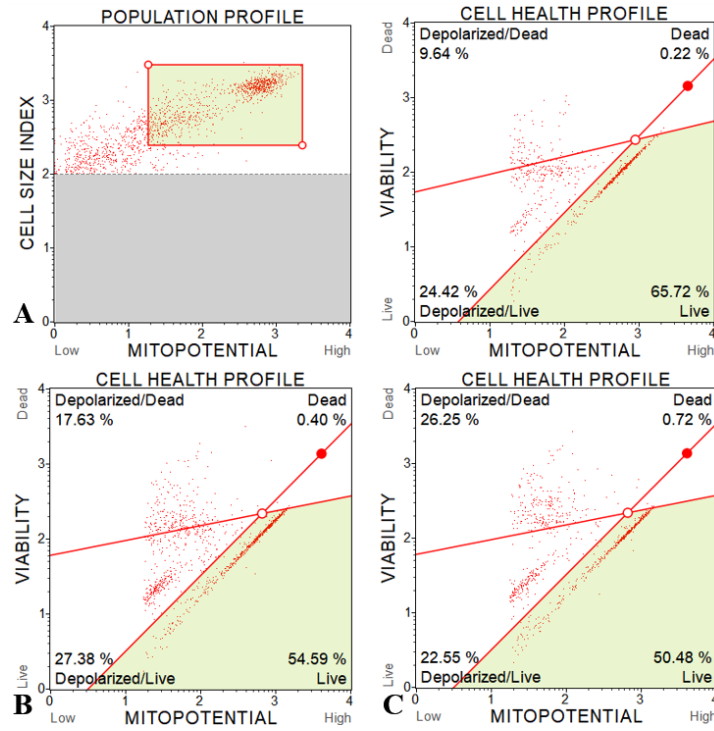
Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi analiz edildiğinde depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %18.14'den doz artışına bağlı sırası ile %39.9'a ve %45.39'a arttığı saptandı (Şekil 155).



Şekil 155. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.7.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

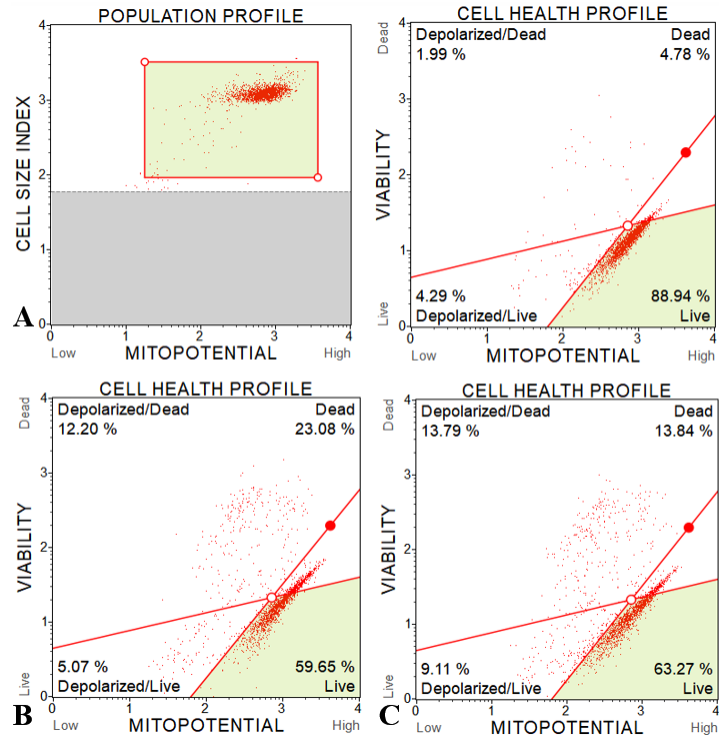
Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi analiz edildiğinde depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %34.06'dan doz artışına bağlı sırası ile %45'e ve %48.8'e arttığı saptandı (Şekil 156).



Şekil 156. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.7.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

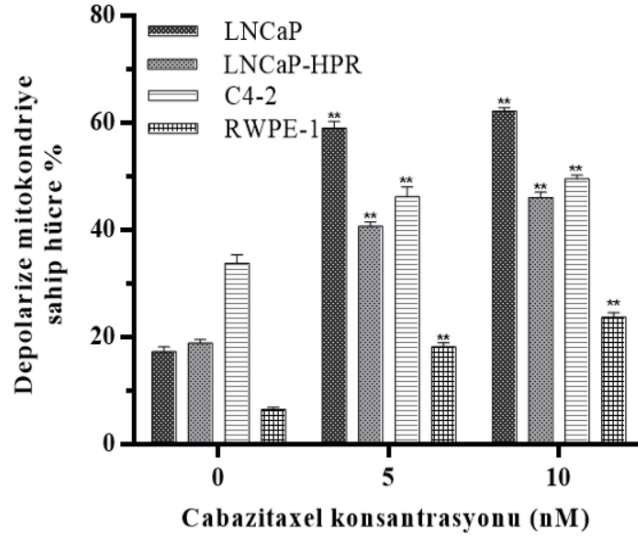
Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi analiz edildiğinde depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %6.28'den doz artışına bağlı sırası ile %17.27'ye ve %22.9'a arttığı saptandı (Şekil 157).



Şekil 157. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.7.1.5. Cabazitaxel'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi

Cabazitaxel'in LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 5 ve 10 nM dozlarda 24 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi ve anlamlılığı ($p < 0.01$) Şekil 158'de sunuldu.



Şekil 158. Cabazitaxel'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

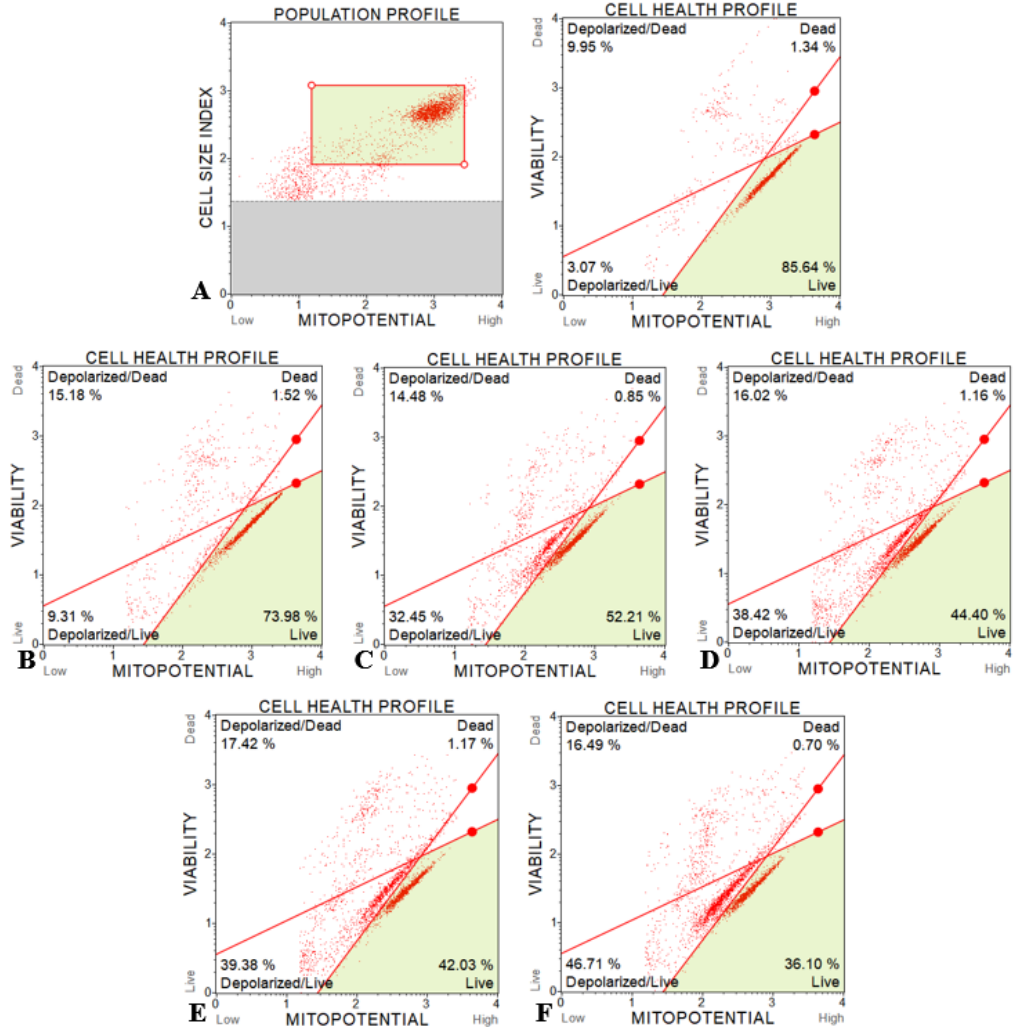
4.7.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

Apigenin ve PEITC'in tedavi süresi içerisinde maksimum ROS artışına 12. saatte neden olduğu saptandığından mitokondriyal membran potansiyeli analizleri de tüm hücre hatlarında aynı zaman diliminde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler, Apigenin ve PEITC'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri bulunduğunu, doz sırasına bağlı olarak depolarize mitokondriye sahip hücre oranında artış olduğunu ortaya koydu. Apigenin ve PEITC'in kombin olarak uygulandıkları doz gruplarında ajanların tek başlarına uygulandıkları doz gruplarına göre mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimler daha belirgin olarak saptandı. Ek olarak ajanların hem tek başlarına hem de kombin olarak uygulandıklarında kanser hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyelinde neden olduğu değişimlerin daha fazla olduğu tespit edildi. Mitokondriyal membran potansiyeli ile ilgili mevcut veriler, ajanların seçici prooksidan etkileri ile uyumlu bulundu.

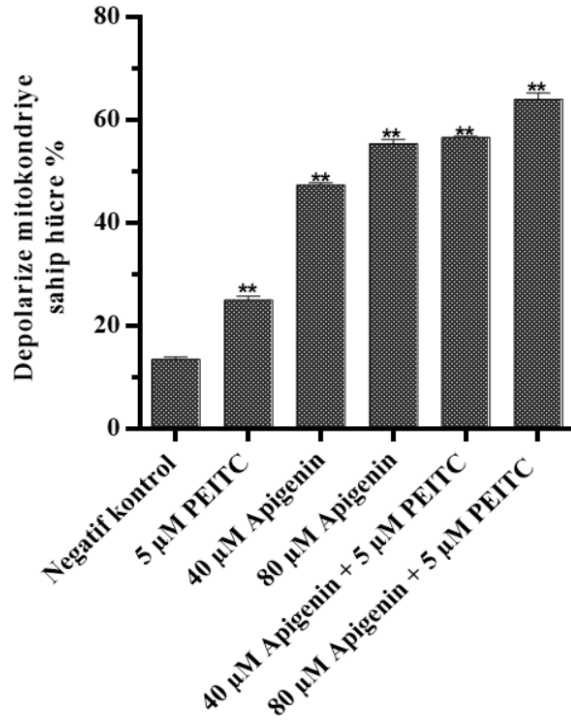
4.7.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

LNCaP hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri analiz edildiğinde, depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %13.02'den doz sırasına bağlı olarak

%24.49'a, %46.93'e, %54.44'e, %56.8'e ve %63.2'ye arttığı saptandı (Şekil 159). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu depolarize mitokondriye sahip hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 160).



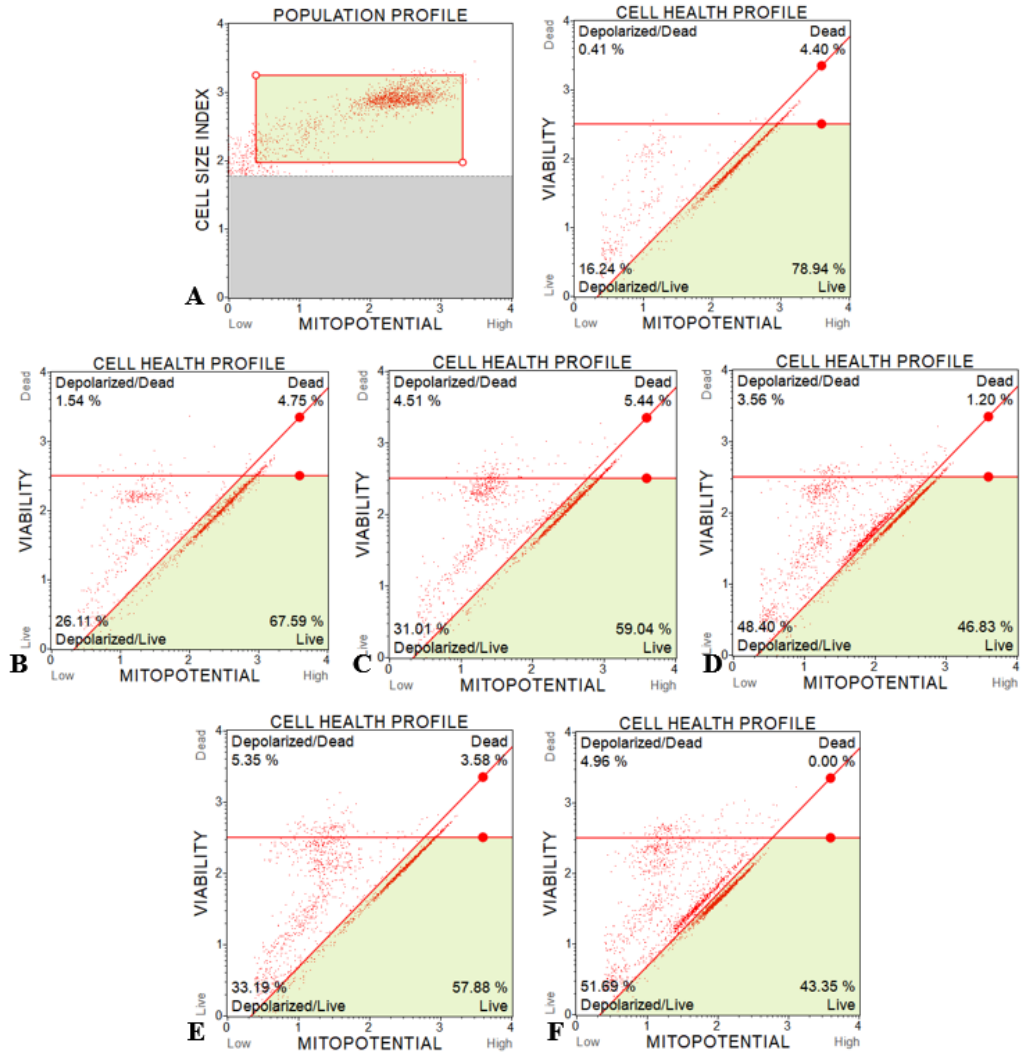
Şekil 159. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



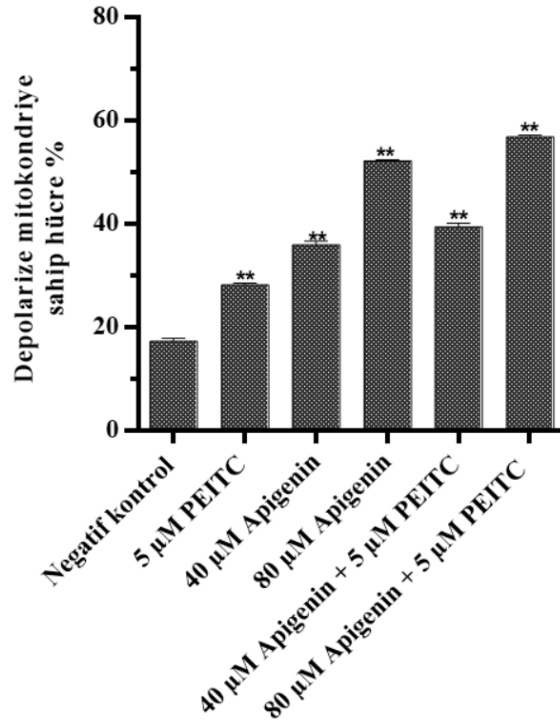
Şekil 160. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.7.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

LNCaP-HPR hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri analiz edildiğinde, depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %16.65'den doz sırasına bağlı olarak %27.65'e, %35.52'ye, %51.96'ya, %38.54'e ve %56.65'e arttığı saptandı (Şekil 161). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu depolarize mitokondriye sahip hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) bulundu (Şekil 162).



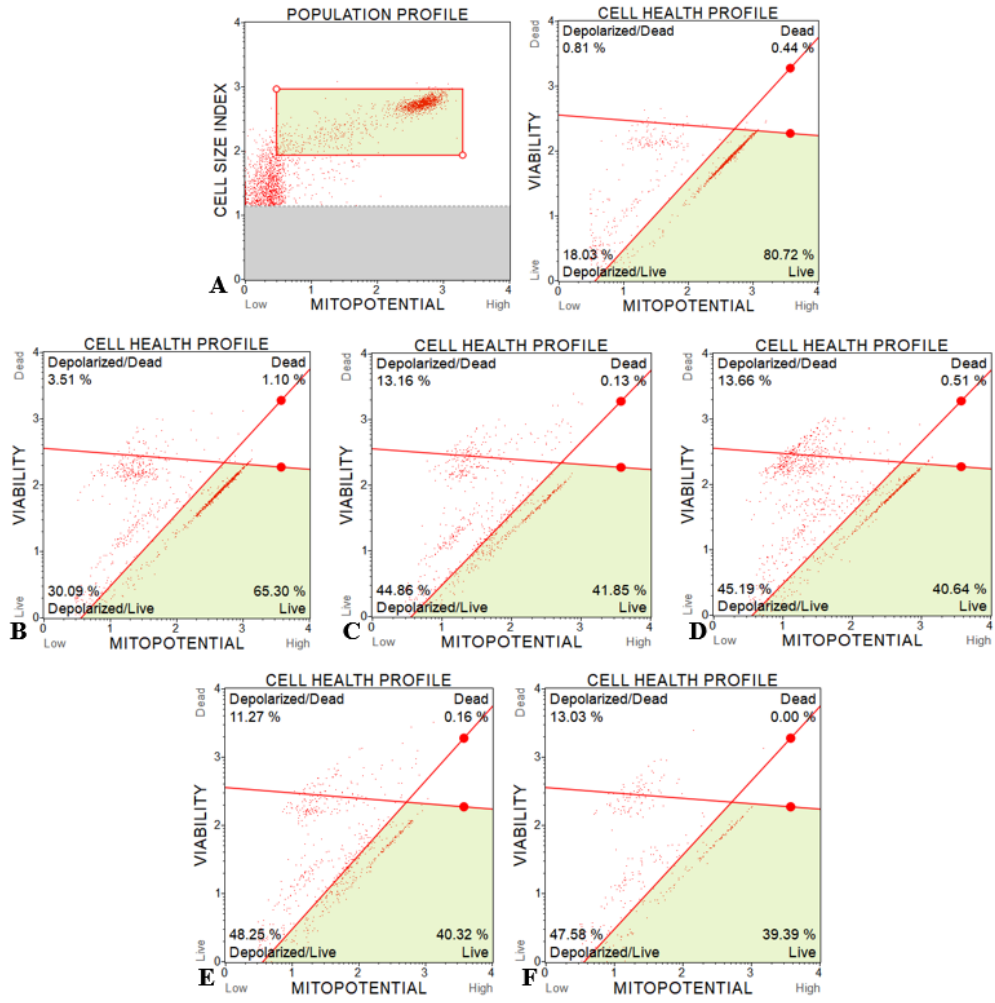
Şekil 161. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



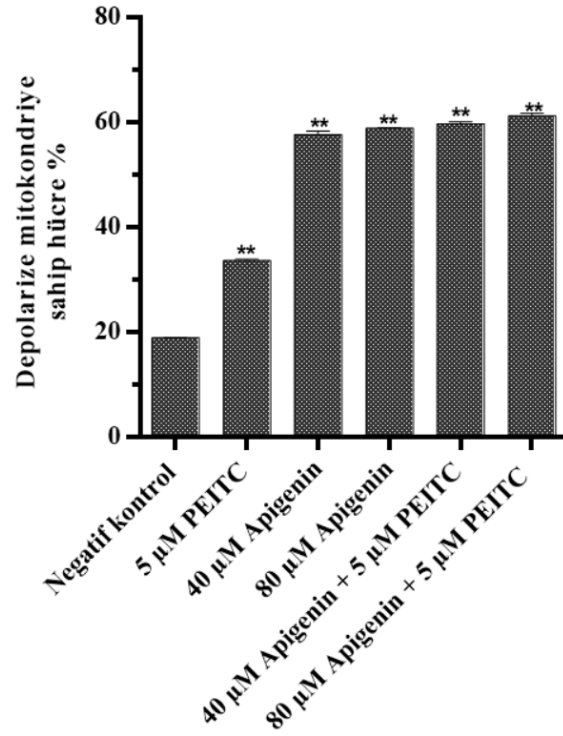
Şekil 162. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.7.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

C4-2 hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri analiz edildiğinde, depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %18.84'den doz sırasına bağlı olarak %33.6'ya, %58.02'ye, %58.85'e, %59.52'ye ve %60.61'e arttığı saptandı (Şekil 163). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu depolarize mitokondriye sahip hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) bulundu (Şekil 164).



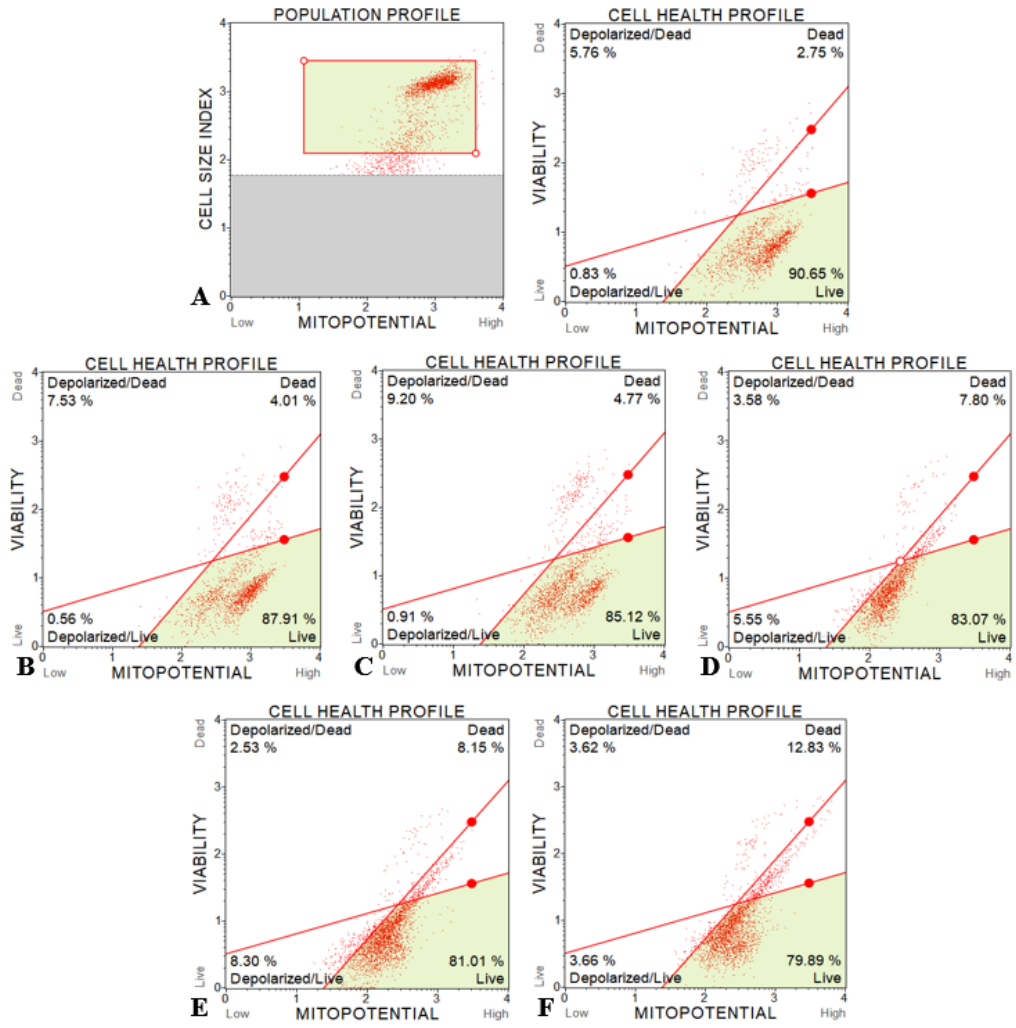
Şekil 163. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



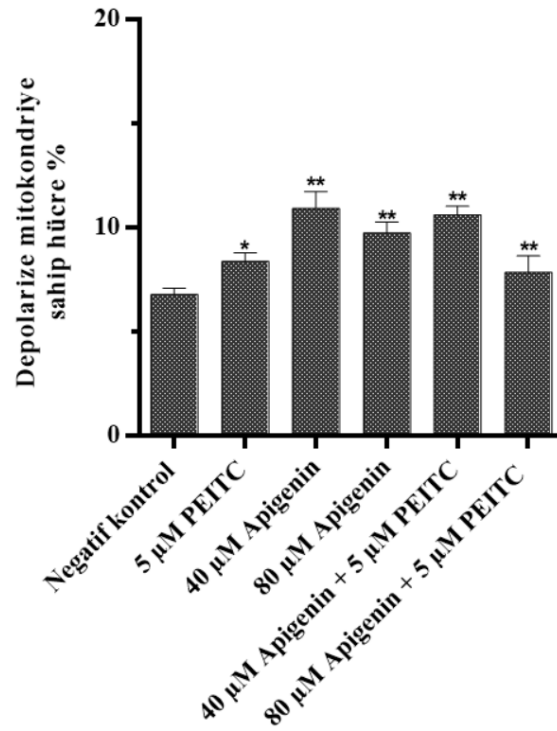
Şekil 164. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.7.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi

RWPE-1 hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri analiz edildiğinde, depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %6.59'dan doz sırasına bağlı olarak %8.09'a, %10.11'e, %9.13'e, %10.83'e ve %7.28'e arttığı saptandı (Şekil 165). Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu depolarize mitokondriye sahip hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, $p < 0.01$) bulundu (Şekil 166).



Şekil 165. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi (A) Kontrol (B) 5 μ M PEITC (C) 40 μ M Apigenin (D) 80 μ M Apigenin (E) 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC (F) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 166. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 12 saatlik mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin istatistiksel analizi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.7.3. Apigenin ve PEITC'in mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması

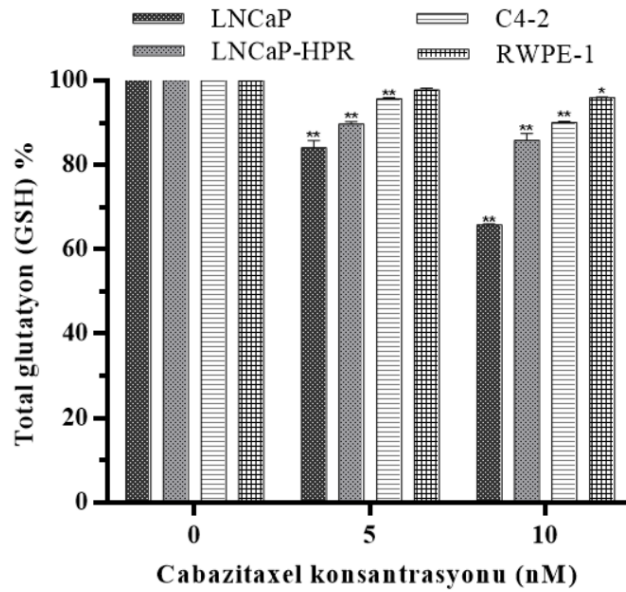
Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri karşılaştırıldığında kombin uygulamanın tüm kanser hücre hatlarında seçici olarak daha fazla etkiye sahip olduğu tespit edildi. Mitokondriyal membran potansiyeli verileri kombin uygulamanın prooksidan etkileri ile uyumlu bulundu.

4.8. Total GSH miktarı üzerine etkiler

4.8.1. Cabazitaxel'in total GSH miktarı üzerine etkisi

Cabazitaxel'in tedavi süresi içerisinde maksimum ROS artışına 24. saatte neden olduğu saptandığından hücrelerin total GSH miktarındaki değişimler de tüm hücre hatlarında aynı zaman diliminde gerçekleştirildi. Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarında 24 saatlik total GSH miktarı üzerine etkisi analiz edildiğinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında doz artışına bağlı olarak sırasıyla total GSH miktarının LNCaP hücre hattında %85.05'e ve %65.76'ya; LNCaP-HPR hücre hattında %89.67'ye ve %85.84'e; C4-2 hücre hattında %95.46'ya ve %90.12'ye; RWPE-1 hücre hattında

%97.52'ye ve %95.89'a azaldığı saptandı (Şekil 167). Elde edilen veriler Cabazitaxel'in özellikle LNCaP hücre hattında hücrelerde bulunan total GSH miktarını azaltıcı etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koydu ($p<0.01$). Ancak istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) olmasına rağmen LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarının GSH miktarlarındaki düşüşün LNCaP hücrelerindeki düşüşe göre daha az oranda olduğu saptandı. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 5 nM doz için total GSH miktarı üzerine anlamlı bir etkisi bulunmazken, 10 nM doz grubundaki total GSH miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulundu.



Şekil 167. Cabazitaxel'in total GSH miktarı üzerine etkisinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

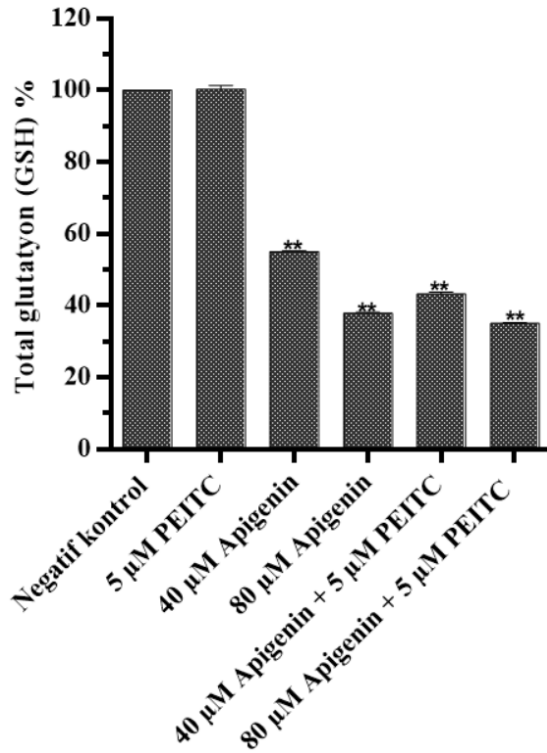
4.8.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun total GSH miktarı üzerine etkisi

Apigenin ve PEITC'in tedavi süresi içerisinde maksimum ROS artışına 12. saatte neden olduğu saptandığından hücrelerin total GSH miktarındaki değişimler de tüm hücre hatlarında aynı zaman diliminde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler 5 μ M PEITC'in kanser hücrelerinde total GSH miktarı üzerinde bir etkisi bulunmadığını, RWPE-1 normal prostat epitel hücrelerinde ise total GSH miktarını arttırıcı etkiye sahip olduğunu gösterdi. 5 μ M PEITC dışındaki artan doz gruplarının, belirgin olarak LNCaP hücre hattında olmak üzere kanser hücrelerinde doz sırasına bağlı olarak total GSH miktarını inhibe edici etkilerinin olduğu tespit edildi. Kombin doz gruplarının kanser hücrelerinde ajanların tek başlarına uygulandıkları doz grupları ile

kıyaslandığında daha fazla oranda GSH miktarını azalttığı, ancak ters bir etki ile RWPE-1 hücrelerinde ajanların tek başına total GSH miktarı üzerine etkilerinin kombin dozlara göre daha fazla olduğu belirlendi.

4.8.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi

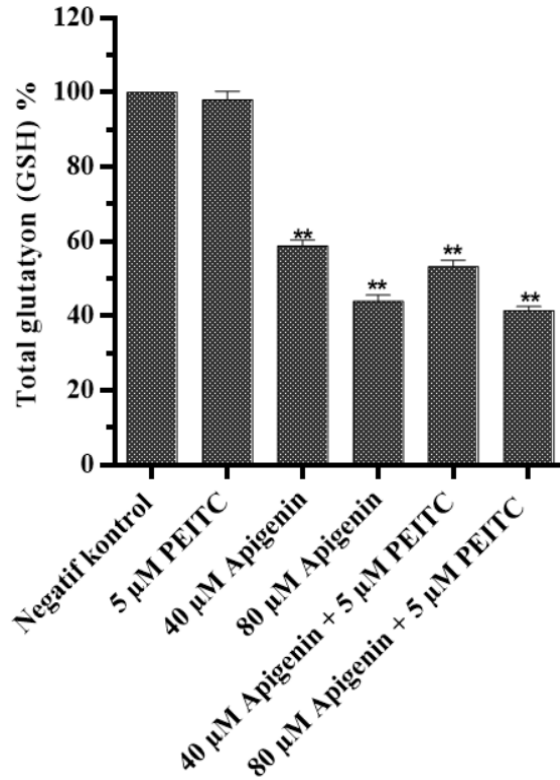
LNCaP hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkileri analiz edildiğinde 5 μ M PEITC'in GSH miktarı üzerine anlamlı bir etkisi saptanmazken diğer doz gruplarında hücrelerin total GSH miktarının doz sırasına bağlı olarak %55.6'ya, %38.03'e, %43.25'e ve %35.08'e azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu GSH miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 168).



Şekil 168. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

4.8.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi

LNCaP-HPR hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkileri analiz edildiğinde 5 µM PEITC'in GSH miktarı üzerine anlamlı bir etkisi saptanmazken diğer doz gruplarında hücrelerin total GSH miktarının doz sırasına bağlı olarak %58.74'e, %43.93'e, %53.25'e ve %41.41'e azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu GSH miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 169).

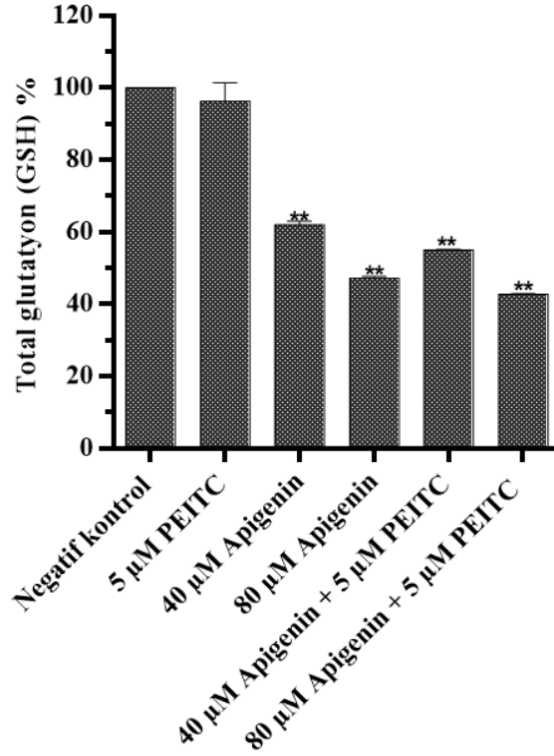


Şekil 169. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

4.8.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi

C4-2 hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkileri analiz edildiğinde 5 µM PEITC'in GSH miktarı üzerine anlamlı bir etkisi saptanmazken diğer doz gruplarında hücrelerin total GSH

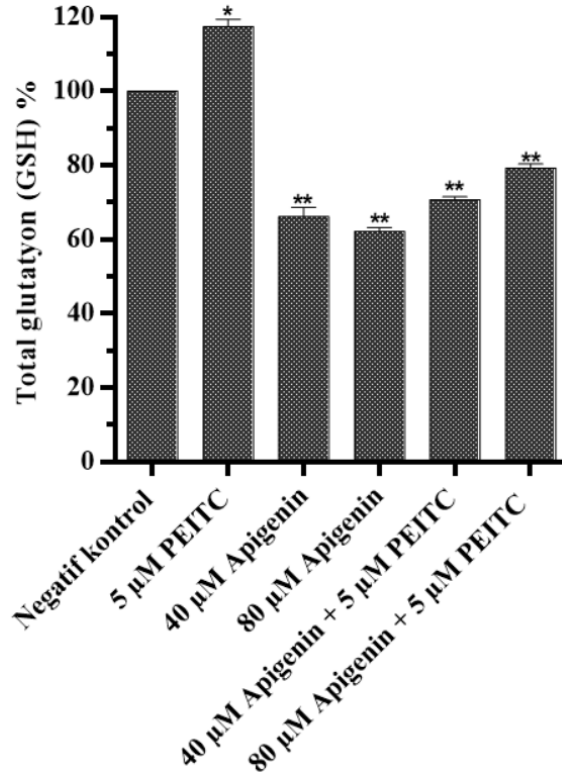
miktarının doz sırasına bağlı olarak %62.85'e, %47.17'ye, %55.13'e ve %42.82'ye azaldığı tespit edildi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu GSH miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bulundu (Şekil 170).



Şekil 170. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

4.8.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında total GSH miktarı üzerine etkisi

RWPE-1 hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkileri analiz edildiğinde 5 µM PEITC'in hücrelerin total GSH miktarını %118.57'ye arttırdığı saptanırken diğer doz gruplarının doz sırasına bağlı olarak total GSH miktarını %66.21'e, %62.17'ye, %70.89'a ve %76.42'ye azalttığı tespit edildi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 12 saatlik doz uygulamalarının neden olduğu GSH miktarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$, $p<0.01$) bulundu (Şekil 171).



Şekil 171. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 12 saatlik total GSH miktarı üzerine etkisinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.8.3. Apigenin ve PEITC'in total GSH miktarı üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre total GSH miktarı üzerine etkileri karşılaştırıldığında kombin uygulamanın belirgin olarak daha fazla total GSH miktarını inhibe edici etkileri olduğu belirlendi. Cabazitaxel'in ise prooksidan etkileri bulunmasına rağmen total GSH miktarı üzerindeki etkilerinin oldukça düşük olduğu saptandı.

4.9. Gen ekspresyonu üzerine etkiler

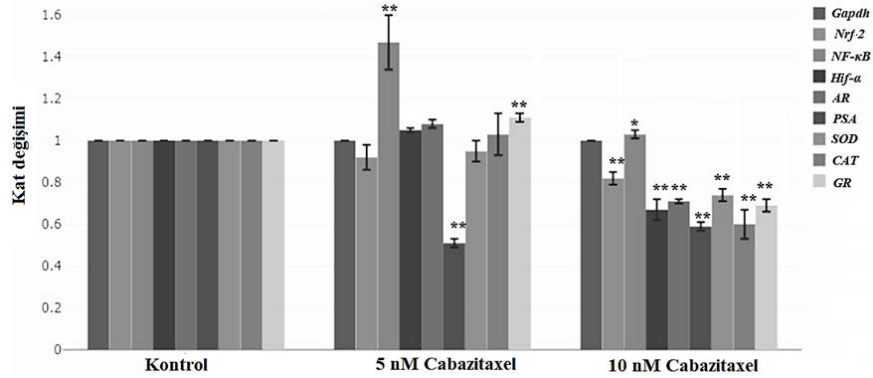
4.9.1. Cabazitaxel'in gen ekspresyonu üzerine etkileri

Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarında 48 saatlik uygulaması sonucu LNCaP, LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinden *Nrf2*, *Hif-α* ve *NF-κB*, antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genleri ile prostat kanseri progresyonunda önemli genler olan *AR* ve *KLK3* (*PSA*) genlerinin; RWPE-1 hücre hattında ise *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT* ve *GR*

genlerinin transkripsiyon seviyesi üzerine etkileri analiz edildi ve bulgular her bir hücre hattında detaylandırıldı.

4.9.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi

Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT*, *GR*, *AR* ve *KLK3 (PSA)* genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, 5 nM dozda *NF-κB* geninin mRNA düzeyinde 1.47-kat ($p<0.01$) anlamlı artış ve *PSA* geninin mRNA düzeyinde 1.95-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma tespit edildi (Şekil 172). 10 nM uygulama sonrasında ise redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinden *Nrf2* ve *Hif-α* genlerinin mRNA düzeylerinde sırası ile 1.22-kat ($p<0.01$) ve 1.50-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma saptanırken, *AR* ve *PSA*'da sırası ile 1.41-kat ($p<0.01$) ve 1.69-kat ($p<0.01$); antioksidan genler *SOD*, *CAT* ve *GR*'de sırası ile 1.35-kat ($p<0.01$), 1.67-kat ($p<0.01$) ve 1.46-kat ($p<0.01$) azalma tespit edildi. LNCaP hücre hattında 48 saatlik Cabazitaxel uygulamasının gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 172'de sunuldu.

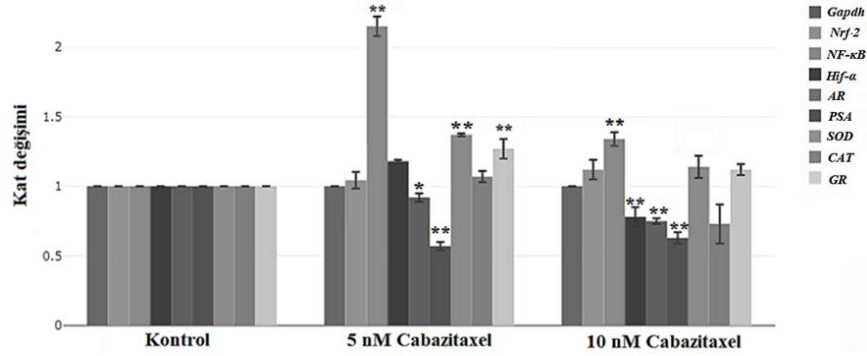


Şekil 172. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 48 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.9.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi

Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT*, *GR*, *AR* ve *KLK3 (PSA)* genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, 5 nM dozda *NF-κB* geninin mRNA düzeyinde 2.15-kat ($p<0.01$), *SOD* ve *GR* genlerinin mRNA düzeylerinde ise sırası ile 1.37-kat ($p<0.01$) ve 1.27-kat ($p<0.01$) anlamlı artış saptandı (Şekil 173). 10 nM uygulama sonrasında ise *NF-κB* geninin mRNA düzeyinde 1.34-kat ($p<0.01$) anlamlı artış saptanırken *Hif-α* geninde 1.27-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu tespit edildi. Ek

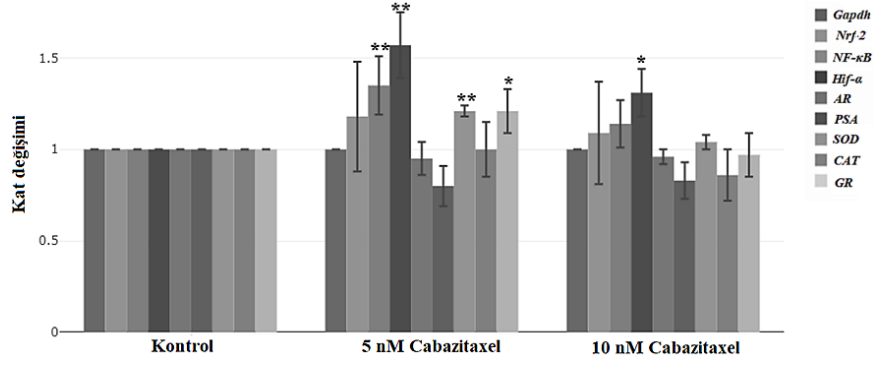
olarak 5 ve 10 nM doz uygulamaları sonrasında *AR* ve *PSA* genlerinin mRNA düzeylerinde doza bağlı olarak sırası ile 1.12-kat ($p<0.05$) ve 1.77-kat ($p<0.01$); 1.33-kat ($p<0.01$) ve 1.59-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 173). LNCaP-HPR hücre hattında 48 saatlik Cabazitaxel uygulamasının gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 173’de sunuldu.



Şekil 173. Cabazitaxel’in LNCaP-HPR hücre hattında 48 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.9.1.3. Cabazitaxel’in C4-2 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi

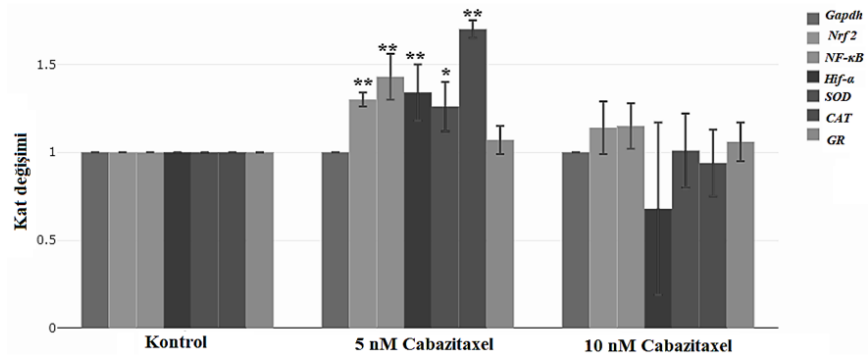
Cabazitaxel’in C4-2 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT*, *GR*, *AR* ve *KLK3* (*PSA*) genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, 5 nM dozda redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini kodlayan *NF-κB* ve *Hif-α* genlerinin mRNA düzeylerinde sırası ile 1.35 kat ($p<0.01$) ve 1.57-kat ($p<0.01$); antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD* ve *GR* genlerinin mRNA düzeylerinde ise sırası ile 1.21-kat ($p<0.01$) ve 1.20-kat ($p<0.05$) anlamlı artış saptandı (Şekil 174). 10 nM uygulama sonrasında ise transkripsiyon düzeyinde artış saptanan genlerden yalnızca *Hif-α*’nın ($p<0.05$) 1.31-kat anlamlı artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 174). Ek olarak 5 ve 10 nM doz uygulamaları sonrasında *AR* ve *PSA* genlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen transkripsiyon düzeylerinde azalmalar olduğu belirlendi (Şekil 174). C4-2 hücre hattında 48 saatlik Cabazitaxel uygulamasının gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 174’de sunuldu.



Şekil 174. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 48 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.9.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkisi

Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, 5 nM dozda redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini kodlayan *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* genlerinin mRNA düzeylerinde sırası ile 1.30-kat ($p<0.01$), 1.43-kat ($p<0.01$) ve 1.34-kat ($p<0.01$) anlamlı artış olduğu belirlendi (Şekil 175). Ayrıca aynı dozda antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD* ve *CAT* genlerinin mRNA düzeylerinde ise sırası ile 1.26-kat ($p<0.05$) ve 1.70-kat ($p<0.01$) anlamlı artış saptandı (Şekil 175). 10 nM dozda ilgili genlerin mRNA düzeylerinde anlamlı bir değişim tespit edilmedi. RWPE-1 hücre hattında 48 saatlik Cabazitaxel uygulamasının gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 175'de sunuldu.



Şekil 175. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 48 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

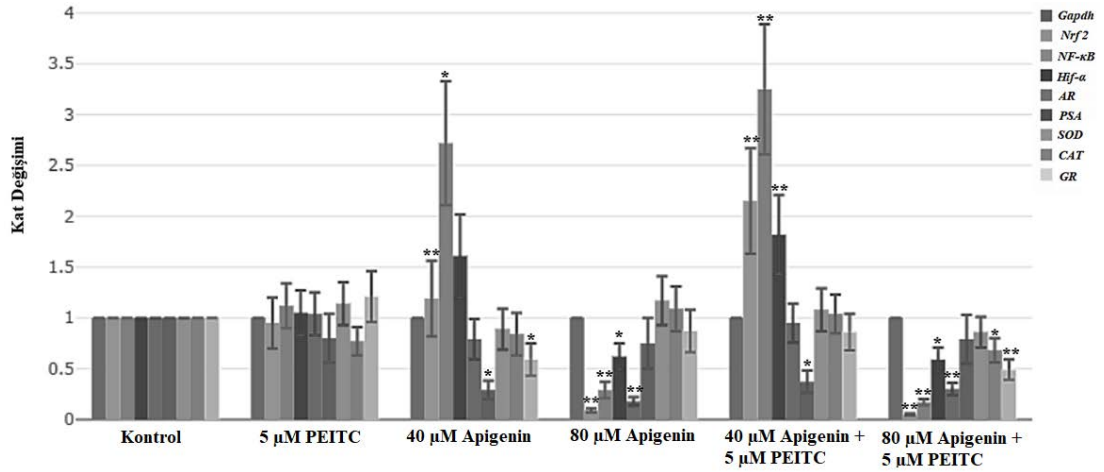
4.9.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun gen ekspresyonu üzerine etkileri

LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 24 saatlik uygulamaları sonrasında LNCaP, LNCaP-HPR ve C4-2 hücrelerinde redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinden *Nrf2*, *Hif-α* ve *NF-κB*, antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genleri ile prostat kanseri progresyonunda önemli genler olan *AR* ve *KLK3 (PSA)* genlerinin; RWPE-1 hücresinde ise *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon seviyelerindeki değişimler analiz edildi ve bulgular her bir hücre hattında detaylandırıldı.

4.9.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri

LNCaP hücre hattında 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT*, *GR*, *AR* ve *KLK3 (PSA)* genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde 5 µM PEITC'in gen ekspresyon seviyeleri üzerine tek başına anlamlı bir etkisi olmadığı, 40 µM Apigenin ile birlikte uygulandığında ise 40 µM Apigenin'in tek başına etkilerini arttırdığı, *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α*'nın mRNA düzeylerinde sırasıyla 2.15-kat ($p<0.01$), 3.25-kat ($p<0.01$) ve 1.82-kat ($p<0.01$) anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 176). 80 µM Apigenin uygulaması sonucu ise *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α*'nın mRNA düzeylerinde sırasıyla 10.95-kat ($p<0.01$), 3.47-kat ($p<0.01$) ve 1.62-kat ($p<0.05$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 176). 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin birlikte uygulaması sonucu ise genlerin mRNA seviyelerindeki düşüşün 80 µM Apigenin'in tek başına neden olduğu düşüşe göre daha fazla olduğu, *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* genlerinin mRNA düzeylerinde sırasıyla 18.94-kat ($p<0.01$), 5.84-kat ($p<0.01$) ve 1.70-kat ($p<0.05$) anlamlı azalma bulunduğu tespit edildi (Şekil 176). Antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon düzeylerindeki azalma yönünde en anlamlı değişimin ise 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubunda olduğu saptandı. Son olarak *AR* ve *PSA* genlerinde de Apigenin uygulanan doz gruplarında anlamlı azalmalar olduğu, *AR* geninin ekspresyon seviyesinin 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarında sırasıyla 5.62-kat ($p<0.01$) ve 3.29-kat

($p<0.01$) azaldığı, *PSA* geninde ise 40 μ M Apigenin ve 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında sırasıyla 3.51-kat ($p<0.01$) ve 2.67-kat ($p<0.01$) azalma olduğu belirlendi. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 176’da sunuldu.

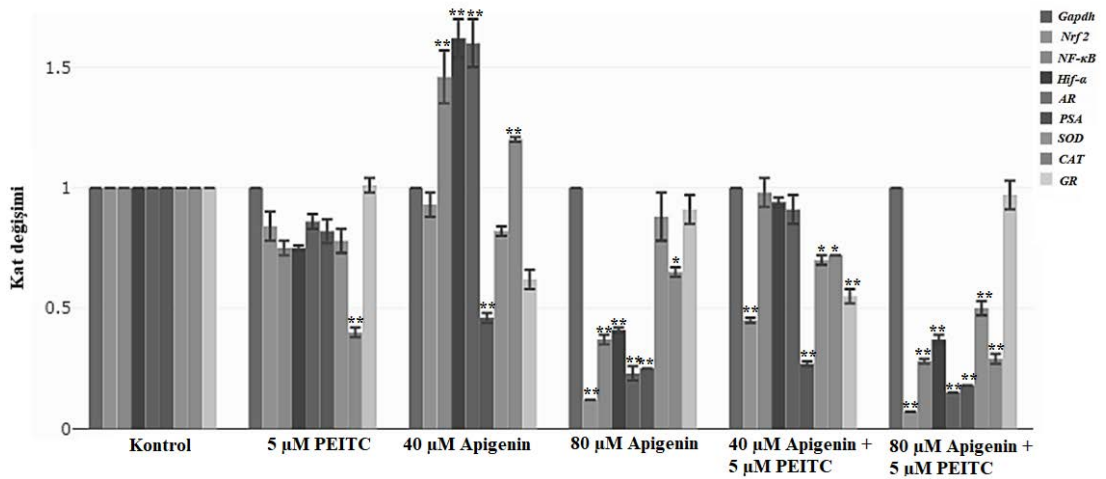


Şekil 176. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.9.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri

LNCaP-HPR hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının *Nrf2*, *Hif- α* , *NF- κ B*, *SOD*, *CAT*, *GR*, *AR* ve *KLK3* (*PSA*) genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde 5 μ M PEITC’in *CAT* geninde neden olduğu azalma dışında (2.50-kat, $p<0.01$) diğer genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine tek başına anlamlı bir etkisinin bulunmadığı belirlendi. 40 μ M Apigenin’in tek başına uygulandığı doz grubunda *Nrf2*, *NF- κ B* ve *Hif- α* ’nın mRNA düzeylerinde sırasıyla 1.46-kat ($p<0.01$), 1.62-kat ($p<0.01$) ve 1.60-kat ($p<0.01$) anlamlı artış olduğu belirlendi (Şekil 177). Ancak 5 μ M PEITC ve 40 μ M Apigenin’in birlikte uygulaması sonucu bu genlerin transkripsiyon seviyelerinde artışın olmadığı, *Nrf2* geninin mRNA seviyesinde ise 2.21-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu tespit edildi (Şekil 177). 80 μ M Apigenin doz grubunda *Nrf2*, *NF- κ B* ve *Hif- α* genlerinin transkripsiyon seviyelerinde sırasıyla 8.63-kat ($p<0.01$), 2.69-kat ($p<0.01$) ve 2.46-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu, 80 μ M Apigenin’in 5 μ M PEITC ile uygulandığı doz grubunda ise azalma yönündeki değişimin daha belirgin olduğu ve kombin doz

grubunun *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* genlerinin transkripsiyon seviyelerinde sırasıyla 13.45-kat ($p<0.01$), 3.52-kat ($p<0.01$) ve 2.69-kat ($p<0.01$) anlamlı azalmaya neden olduğu belirlendi (Şekil 177). Ek olarak antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon düzeylerindeki azalma yönünde en anlamlı değişimlerin kombin doz gruplarında olduğu, 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz grubunda *SOD* ve *CAT* genlerinde sırasıyla 2.0-kat ($p<0.01$) ve 3.49-kat ($p<0.01$) azalma bulunduğu saptandı (Şekil 177). Son olarak *AR* ve *PSA* genlerinin transkripsiyon düzeylerindeki anlamlı azalmaların 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında belirgin olduğu, kombin doz grubunda daha fazla olmak üzere *AR* ve *PSA* genlerinin mRNA düzeylerinin sırasıyla 6.67-kat ($p<0.01$) ve 5.51-kat ($p<0.01$) azalma gösterdiği bulundu. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 177’de sunuldu.

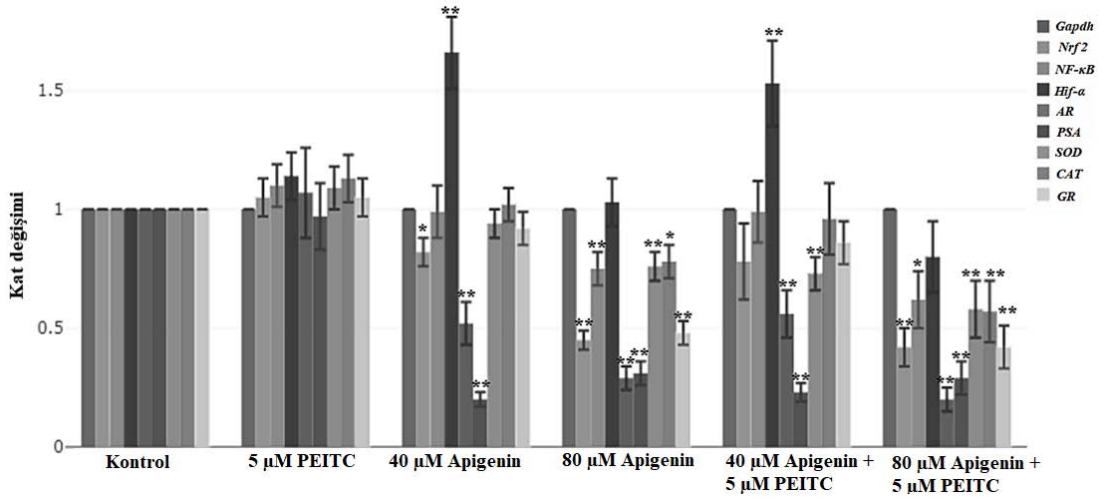


Şekil 177. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.9.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri

C4-2 hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının *Nrf2*, *Hif-α*, *NF-κB*, *SOD*, *CAT*, *GR*, *AR* ve *KLK3* (*PSA*) genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde 5 μ M PEITC’in gen ekspresyon seviyeleri üzerine tek başına anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenmesine rağmen kombin doz gruplarında Apigenin’in tek başına etkilerine ek olarak genlerin transkripsiyonel

düzyde regülasyonuna katkı sağladığı belirlendi (Şekil 178). 40 µM Apigenin doz grubunda *Hif-α* geninin mRNA düzeyinin 1.66 kat ($p<0.01$), 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubunda ise 1.53-kat ($p<0.01$) artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 178). Buna rağmen diğer redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri *Nrf2* ve *NF-κB* transkripsiyon seviyelerinin 40 µM Apigenin uygulanan doz gruplarında azalma gösterdiği ancak 80 µM Apigenin uygulanan doz gruplarında redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin tümünde azalma yönündeki değişimlerin daha belirgin olduğu belirlendi. 80 µM Apigenin'in tek başına uygulandığı doz grubunda özellikle *Nrf2* ve *NF-κB* genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 2.22-kat ($p<0.01$) ve 1.34-kat ($p<0.01$) azalma olduğu, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubunda ise aynı genlere ait regülasyonun 2.40-kat ($p<0.01$) ve 1.61-kat ($p<0.05$) azalma yönünde değiştii saptandı (Şekil 178). LNCaP-HPR hücre hattındaki bulguya benzer şekilde antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon düzeylerindeki azalma yönünde en anlamlı değişim 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubunda gerçekleştiği belirlendi. 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubunda *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla 1.71-kat ($p<0.01$), 1.75-kat ($p<0.01$) ve 2.38-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu tespit edildi (Şekil 178). Son olarak *AR* ve *PSA* genlerinin transkripsiyon düzeylerindeki anlamlı azalmaların 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarında belirgin olduğu, kombin doz grubunda daha fazla olmak üzere *AR* ve *PSA* genlerinin mRNA düzeylerinin sırasıyla 4.96-kat ($p<0.01$) ve 3.42-kat ($p<0.01$) azalma gösterdiği bulundu. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 178'de sunuldu.

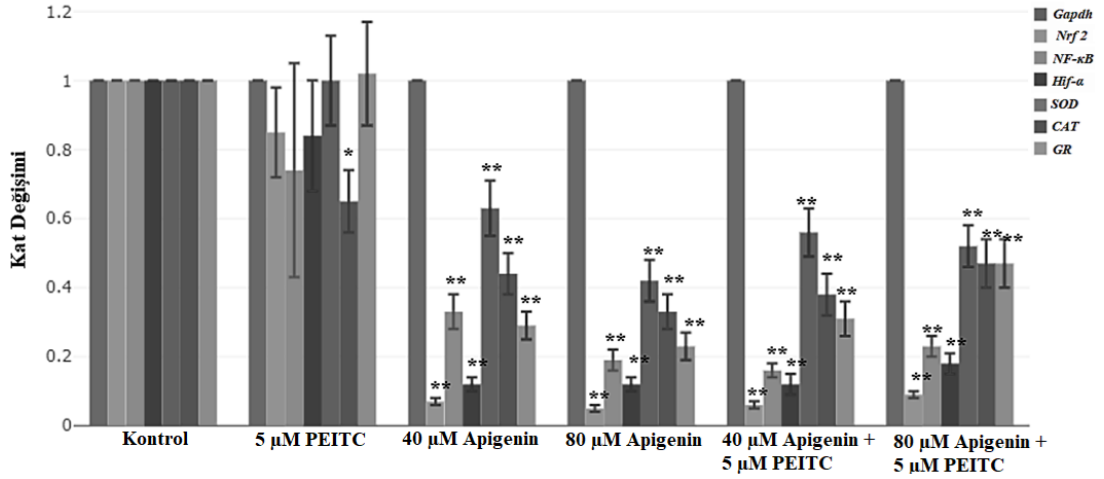


Şekil 178. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.9.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında gen ekspresyonu üzerine etkileri

RWPE-1 hücre hattında 5 μ M PEITC, 40 μ M Apigenin, 80 μ M Apigenin, 40 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının *Nrf2*, *Hif- α* , *NF- κ B*, *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon düzeyi üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde 5 μ M PEITC'in *CAT* geninde neden olduğu azalma dışında (1.53-kat, $p<0.05$) diğer genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine tek başına anlamlı bir etkisinin bulunmadığı, RWPE-1 hücre hattında 5 μ M PEITC hariç diğer doz gruplarının tamamında tüm genlerin azalma yönünde anlamlı olarak yeniden düzenlendiği ve en belirgin azalmanın *Nrf2* geninde olduğu belirlendi (Şekil 179). 80 μ M Apigenin doz grubunda *Nrf2*, *NF- κ B* ve *Hif- α* 'nın mRNA düzeylerinde sırasıyla 21.76-kat ($p<0.01$), 5.15-kat ($p<0.01$) ve 8.26-kat ($p<0.01$) azalma olduğu tespit edildi. Ancak RWPE-1 hücre hattında kanser hücrelerindeki bulguların aksine aynı genlerin transkripsiyon seviyelerindeki azalmaların, Apigenin'in tek başına uygulandığı doz grupları ile karşılaştırıldığında kombinasyon doz gruplarında daha az olduğu saptandı (Şekil 179). Son olarak, kanser hücrelerinde antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan genlerde en belirgin azalmanın tespit edildiği 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz grubunda, RWPE-1 hücre hattında *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon düzeylerinde sırasıyla 1.91-kat ($p<0.01$), 2.13-kat ($p<0.01$) ve 2.11-kat azalma ($p<0.01$) olduğu belirlendi. Ancak RWPE-1 hücre hattında 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz grubunda tespit edilen azalma katsayıları, diğer doz gruplarına göre

daha az düzeyde idi (Şekil 179). Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon verilerine ait istatistiksel analiz Şekil 179’da sunuldu.



Şekil 179. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.9.3. Apigenin ve PEITC’in gen ekspresyonu üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel’e göre gen ekspresyonu üzerine etkileri karşılaştırıldığında, Cabazitaxel’in prooksidan etkisine rağmen tüm hücre hatlarında *NF-κB* geninin mRNA seviyesini arttırdığı belirlendi; ancak Apigenin ve PEITC kombinasyonunun *NF-κB*’nin de yer aldığı redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin tümünün transkripsiyon seviyesinde azalmaya neden olduğu tespit edildi. Buna ek olarak, Cabazitaxel’in diğer redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri *Nrf2* ve *Hif-α*’nın mRNA düzeylerindeki değişimleri daha az etkilediği hatta C4-2 hücre hattında transkripsiyonu baskılama yönündeki etkilerinin bulunmadığı belirlendi. Mevcut bulguya rağmen, Apigenin ve PEITC kombinasyonu için elde edilen veriler, kombin uygulamanın tüm hücre hatlarında hem redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin hem de antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan genlerin mRNA seviyeleri üzerinde azaltıcı etkileri olduğunu ortaya koydu. Ayrıca iki uygulamanın mRNA düzeyinde anti-androjenik etkileri karşılaştırıldığında, Apigenin ve PEITC kombinasyonunun ilişkili etkilerinin belirgin olarak fazla olduğu saptandı.

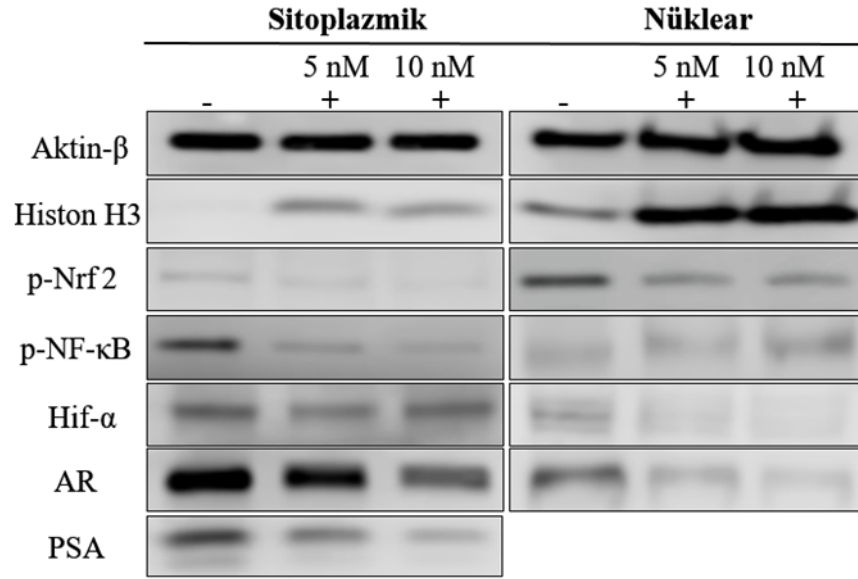
4.10. Protein ekspresyonu üzerine etkiler

4.10.1. Cabazitaxel'in protein ekspresyonu üzerine etkileri

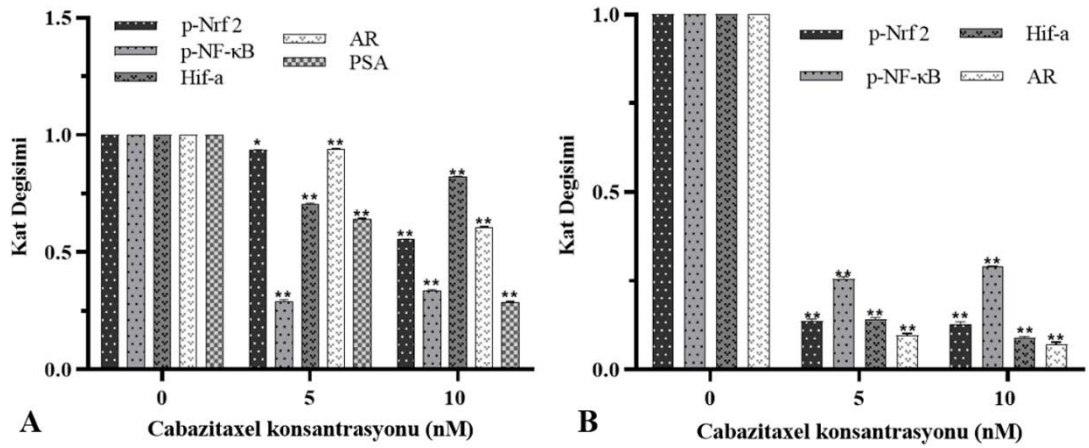
Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik uygulaması sonucu LNCaP, LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında p-Nrf2, p-NF-κB, Hif-α, AR ve PSA; RWPE-1 hücre hattında ise p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyelerindeki değişimler analiz edildi ve bulgular her bir hücre hattında detaylandırıldı.

4.10.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda p-Nrf2, p-NF-κB, Hif-α, AR ve PSA proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, tüm doz gruplarında analiz edilen proteinlerin ekspresyon seviyelerinin doz artışına bağlı olarak farklı kat değişimlerinde azaldığı saptandı (Şekil 180). 5 nM dozda sitoplazmik p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin sırasıyla 1.07-kat ($p<0.05$), 3.5-kat ($p<0.01$) ve 1.43-kat ($p<0.01$); 10 nM dozda ise 1.81-kat ($p<0.01$), 2.95-kat ($p<0.01$) ve 1.22-kat ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 181_A). Nükleer ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde ise 5 nM dozda p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin seviyelerinde sırasıyla 7.5-kat ($p<0.01$), 4.0-kat ($p<0.01$) ve 7.4-kat ($p<0.01$); 10 nM dozda 8.3-kat ($p<0.01$), 3.5-kat ($p<0.01$) ve 12.0-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu belirlendi (Şekil 181_B). Sitoplazmik AR seviyesinde doz artışına bağlı sırası ile 1.06-kat ($p<0.01$) ve 1.66-kat ($p<0.01$) azalma olduğu (Şekil 181_A), nükleer AR seviyesinin ise doz artışına bağlı şekilde belirgin olarak düştüğü (10.8-kat, $p<0.01$ ve 15.2-kat, $p<0.01$) bulundu (Şekil 181_B). Ek olarak PSA ekspresyonunda Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak 1.55-kat ($p<0.01$) ve 3.5-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 181_A).



Şekil 180. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında 48 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi

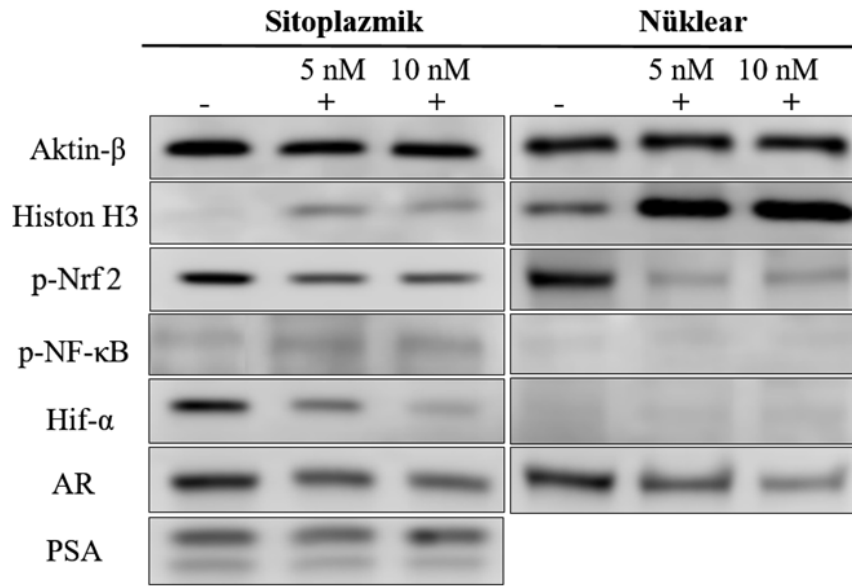


Şekil 181. 48 saatlik Cabazitaxel uygulanan LNCaP hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

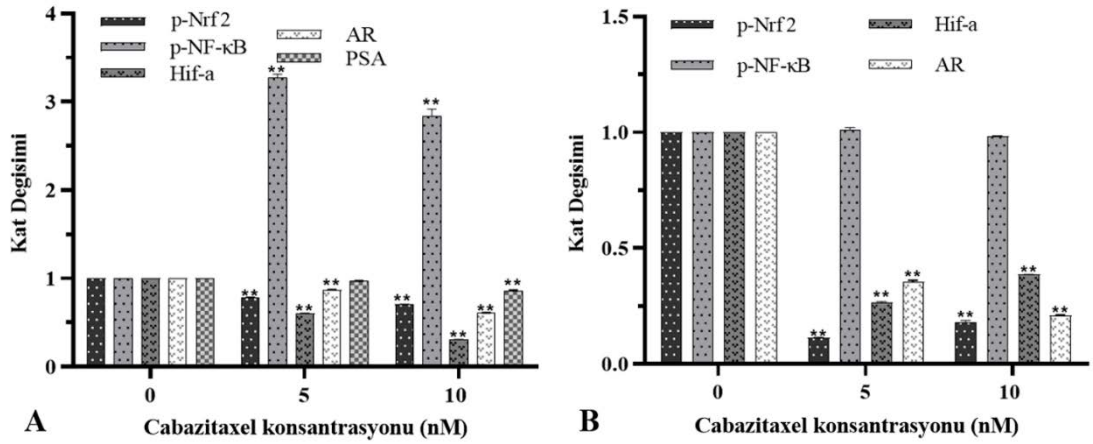
4.10.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda p-Nrf2, p-NF-κB, Hif-α, AR ve PSA proteinlerinin sitoplazmik ve nüklear ekspresyon seviyeleri üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, tüm doz gruplarında p-NF-κB dışında analiz edilen proteinlerin ekspresyon seviyelerinin doz artışına bağlı olarak farklı kat değişimlerinde azaldığı saptandı (Şekil 182). 5 nM dozda sitoplazmik p-Nrf2 ve Hif-α proteinlerinin sırasıyla 1.28-kat ($p<0.01$) ve 1.67-kat ($p<0.01$); 10 nM dozda ise

1.42-kat ($p<0.01$) ve 3.3-kat ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 183_A). Nükleer ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde ise 5 nM dozda p-Nrf2 ve Hif- α proteinlerinin seviyelerinde sırasıyla 9.0-kat ($p<0.01$) ve 3.8-kat ($p<0.01$); 10 nM dozda 5.4-kat ($p<0.01$) ve 2.6-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu belirlendi (Şekil 183_B). Sitoplazmik p-NF- κ B seviyesinde ise Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak sırası ile 3.24-kat ($p<0.01$) ve 2.78-kat ($p<0.01$) anlamlı artış tespit edilmesine rağmen proteinin nükleer seviyesinde anlamlı bir değişim belirlenmedi (Şekil 183_{A,B}). Sitoplazmik AR seviyesinde doz artışına bağlı olarak sırası ile 1.15-kat ($p<0.01$) ve 1.65-kat ($p<0.01$) azalma olduğu (Şekil 183_A), nükleer AR seviyesinin ise doz artışına bağlı şekilde (2.8-kat, $p<0.01$ ve 4.9-kat, $p<0.01$) azaldığı bulundu (Şekil 183_B). Ek olarak PSA ekspresyonunda 5 nM dozda anlamlı bir değişim tespit edilmezken 10 nM dozda protein seviyesinde 1.2-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 183_A).



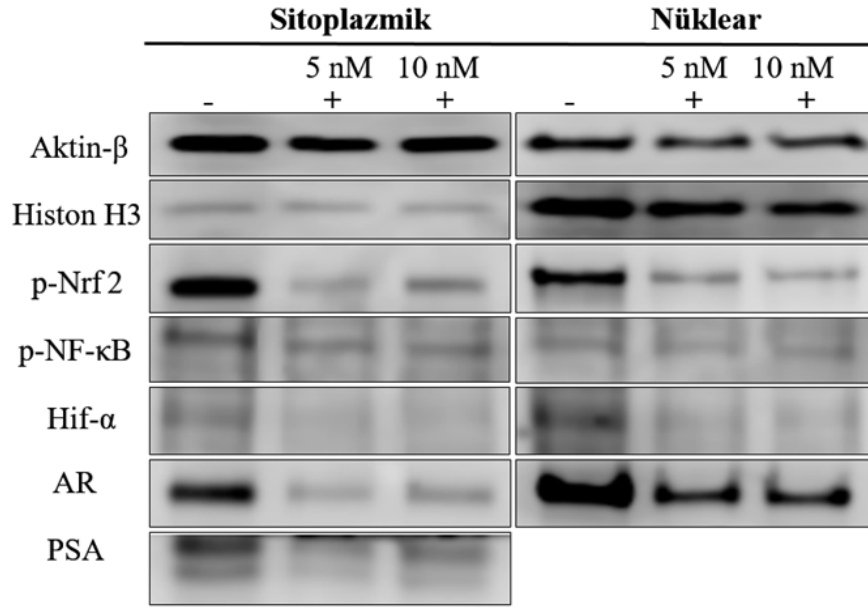
Şekil 182. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında 48 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi



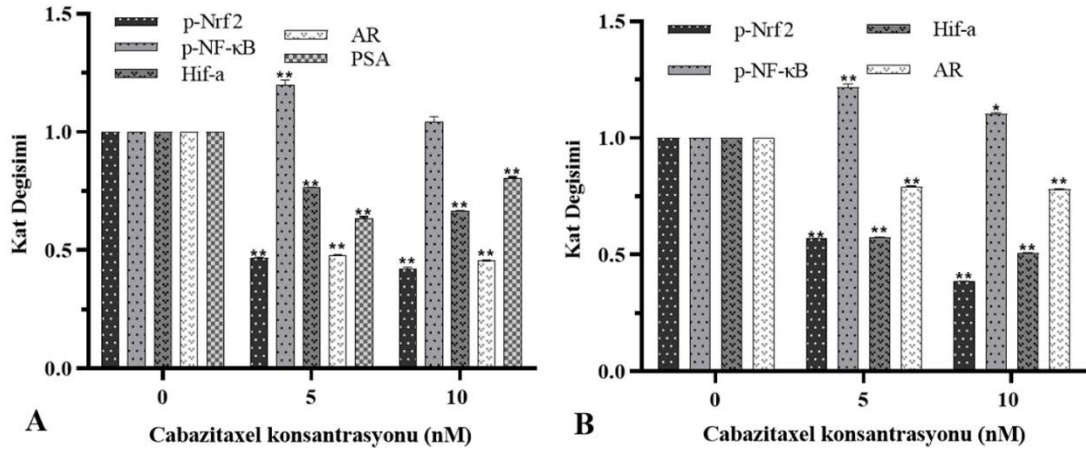
Şekil 183. 48 saatlik Cabazitaxel uygulanan LNCaP-HPR hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nükleer protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

4.10.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda p-Nrf2, p-NF-κB, Hif-α, AR ve PSA proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, tüm doz gruplarında p-NF-κB dışında analiz edilen proteinlerin ekspresyon seviyelerinin doz artışına bağlı olarak farklı kat değişimlerinde azaldığı saptandı (Şekil 184). 5 nM dozda sitoplazmik p-Nrf2 ve Hif-α proteinlerinin sırasıyla 2.15-kat ($p<0.01$) ve 1.31-kat ($p<0.01$); 10 nM dozda ise 2.38-kat ($p<0.01$) ve 1.5-kat ($p<0.01$) anlamlı azaldığı tespit edildi (Şekil 185_A). Nükleer ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde ise 5 nM dozda p-Nrf2 ve Hif-α proteinlerinin seviyelerinde sırasıyla 1.76-kat ($p<0.01$) ve 1.75-kat ($p<0.01$); 10 nM dozda 2.6-kat ($p<0.01$) ve 1.98-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu belirlendi (Şekil 185_B). Sitoplazmik p-NF-κB seviyesinde 5 nM doz uygulaması sonrasında 1.20-kat ($p<0.01$) anlamlı artış tespit edildi. Proteinin nükleer ekspresyon seviyesinde ise 5 nM dozda 1.20-kat ($p<0.01$) ve 10 nM dozda 1.10-kat ($p<0.05$) anlamlı artış olduğu belirlendi (Şekil 185_{A,B}). Sitoplazmik AR seviyesinde doz artışına bağlı sırası ile 2.1-kat ($p<0.01$) ve 2.2-kat ($p<0.01$) azalma olduğu (Şekil 185_A), nükleer AR seviyesinin ise doz artışına bağlı şekilde (1.26-kat, $p<0.01$ ve 1.28-kat, $p<0.01$) azaldığı bulundu (Şekil 185_B). Ek olarak PSA ekspresyonunda 5 nM dozda 1.58-kat ($p<0.01$) ve 10 nM dozda 1.25-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 185_A).



Şekil 184. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında 48 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi

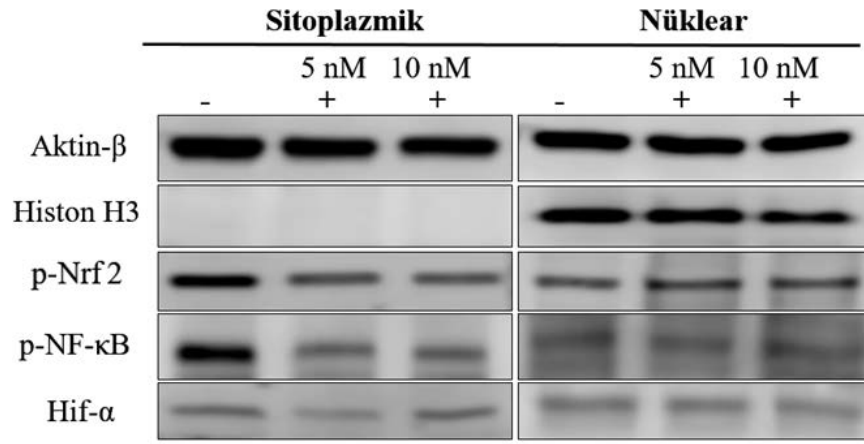


Şekil 185. 48 saatlik Cabazitaxel uygulanan C4-2 hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

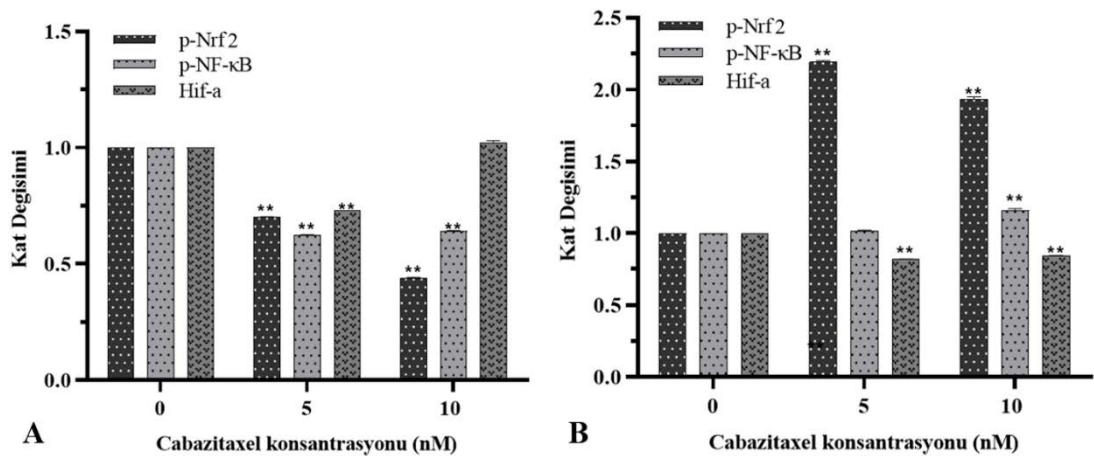
4.10.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 5 ve 10 nM dozlarda p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin sitoplazmik ve nüklear ekspresyon seviyeleri üzerine 48 saatlik etkileri analiz edildiğinde, tüm doz gruplarında analiz edilen proteinlerin sitoplazmik ekspresyon seviyelerinin doz artışına bağlı olarak farklı kat değişimlerinde azaldığı ancak nüklear p-Nrf2 ve p-NF-κB seviyelerinin artış gösterdiği tespit edildi (Şekil

186). 5 nM dozda sitoplazmik p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α proteinlerinin sırasıyla 1.43-kat ($p<0.01$), 1.6-kat ($p<0.01$) ve 1.37-kat ($p<0.01$) azaldığı, 10 nM dozda ise sadece sitoplazmik p-Nrf2 ve p-NF- κ B'nın sırasıyla 2.27-kat ($p<0.01$) ve 1.55-kat ($p<0.01$) azalma yönünde değişim gösterdiği tespit edildi (Şekil 187_A). Nüklear ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde ise 5 nM dozda p-NF- κ B seviyesinde anlamlı bir değişim belirlenmemesine rağmen 10 nM dozda 1.17-kat ($p<0.01$) artış olduğu ve p-Nrf2 seviyesinde de doz artışına bağlı olarak sırasıyla 2.18-kat ($p<0.01$) ve 1.92-kat ($p<0.01$) anlamlı artma olduğu saptandı. Nüklear Hif- α seviyesinin ise doz artışına bağlı olarak sırasıyla 1.22-kat ($p<0.01$) ve 1.20-kat ($p<0.01$) azaldığı tespit edildi (Şekil 187_B).



Şekil 186. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında 48 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi



Şekil 187. 48 saatlik Cabazitaxel uygulanan RWPE-1 hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

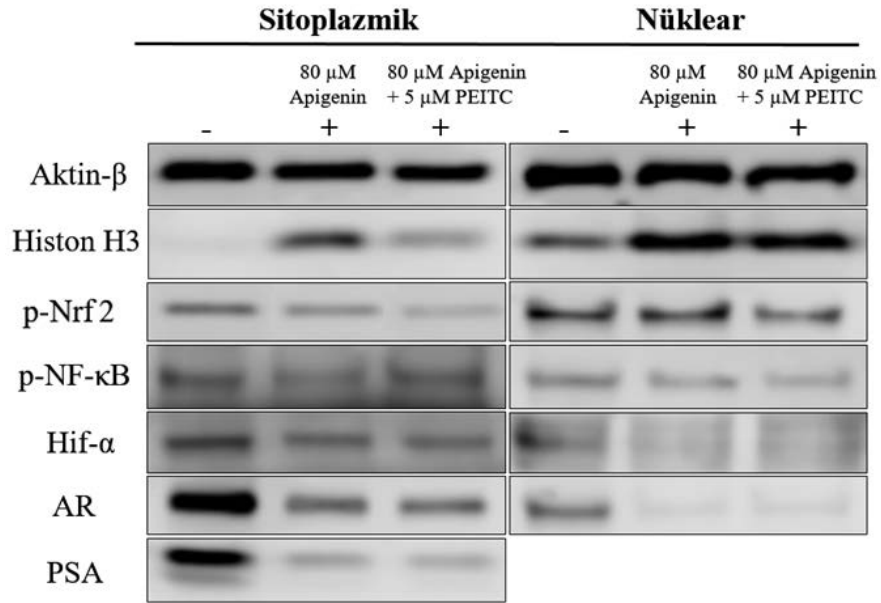
4.10.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun protein ekspresyonu üzerine etkileri

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun protein ekspresyon seviyesi üzerine etkileri, kanser hücre hatlarında 24 saatlik gen ekspresyonu analizi sonuçlarına göre en anlamlı değişimlerin tespit edildiği 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC olmak üzere iki farklı doz grubunda gerçekleştirildi. LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 24 saatlik uygulamaları sonrasında LNCaP, LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında p-Nrf2, p-NF-κB, Hif-α, AR ve PSA; RWPE-1 hücre hattında ise p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyelerindeki değişimler analiz edildi ve bulgular her bir hücre hattında detaylandırıldı.

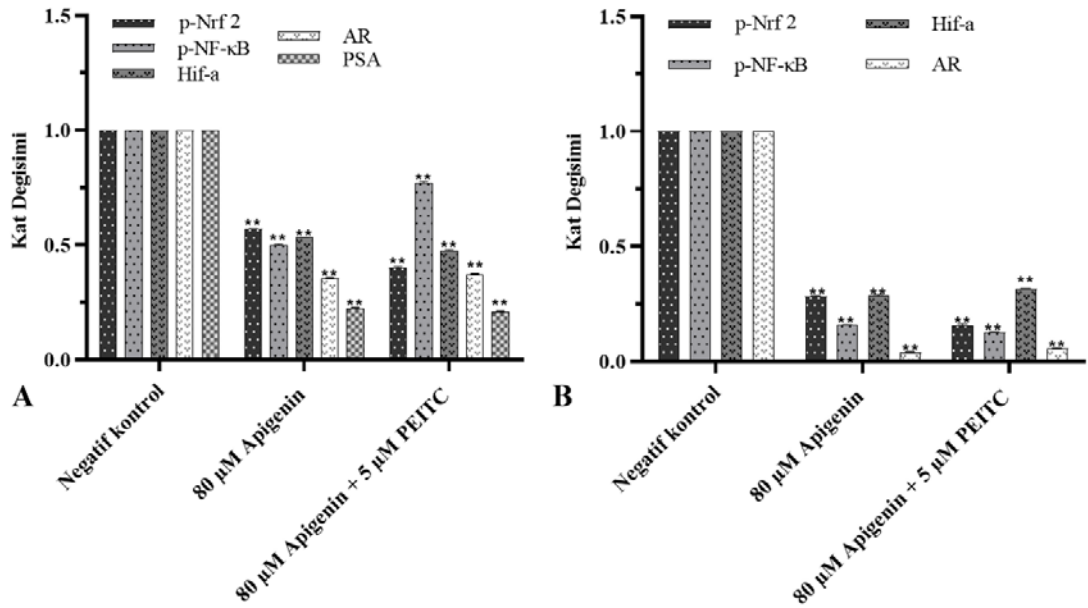
4.10.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

LNCaP hücre hattında 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının p-Nrf2, p-NF-κB, Hif-α, AR ve PSA proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde doz uygulamaları sonrasında tüm proteinlerin farklı kat sayılarda azaldığı belirlendi (Şekil 188). Sitoplazmik protein ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirildiğinde 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarında p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 1.75-kat ($p<0.01$) ve 2.5-kat ($p<0.01$), 2.0-kat ($p<0.01$) ve 1.3-kat ($p<0.01$), 1.87-kat ($p<0.01$) ve 2.1-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 189_A). 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının proteinlerin nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri incelendiğinde ise p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki azalma katsayıları doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 4.2-kat ($p<0.01$) ve 6.4-kat ($p<0.01$), 6.3-kat ($p<0.01$) ve 7.7-kat ($p<0.01$), 3.5-kat ($p<0.01$) ve 3.2-kat ($p<0.01$) olarak tespit edildi (Şekil 189_B). Ayrıca sitoplazmik AR seviyesinde doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 2.8-kat ($p<0.01$) ve 2.7-kat ($p<0.01$) azalma olduğu (Şekil 189_A), nükleer AR seviyesinin ise doz grubuna bağlı şekilde belirgin olarak düştüğü (26-kat, $p<0.01$ ve 18-kat, $p<0.01$)

belirlendi (Şekil 189_B). Ek olarak PSA ekspresyonunda doz grubu sırasına bağlı olarak 4.5-kat ($p<0.01$) ve 4.8-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 189_A).



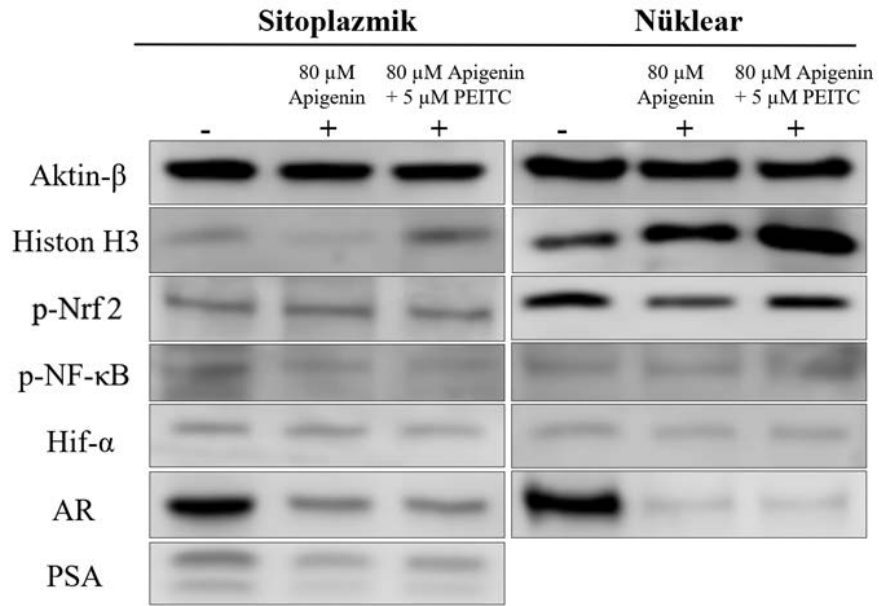
Şekil 188. Apigenin ve PEITC'in LNCaP hücre hattında 24 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi



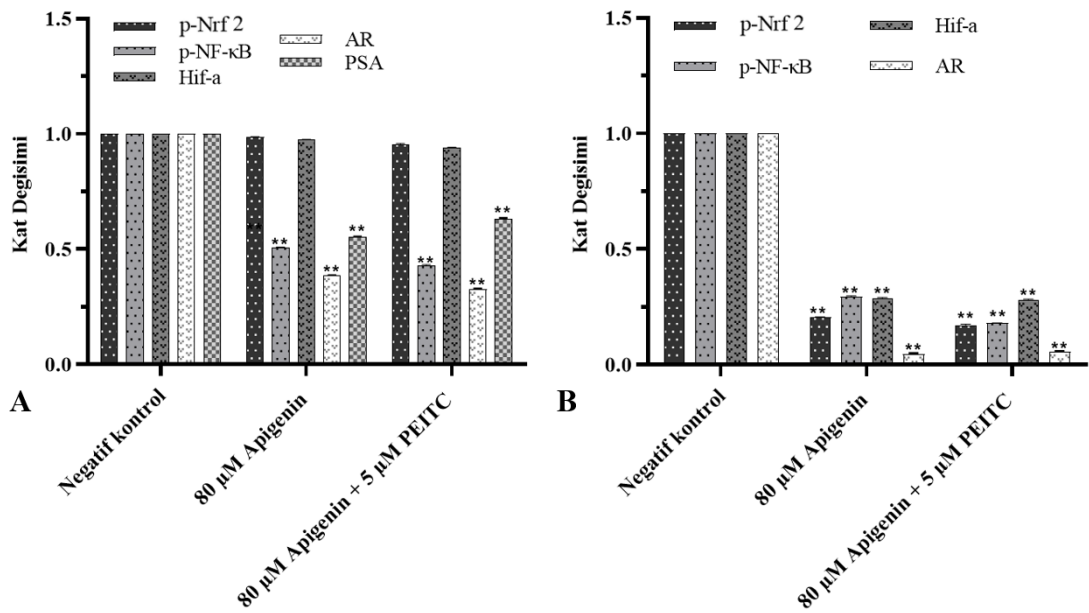
Şekil 189. 24 saatlik Apigenin ve PEITC uygulanan LNCaP hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (** $p<0.01$)

4.10.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

LNCaP-HPR hücre hattında 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının p-Nrf2, p-NF-κB, Hif-α, AR ve PSA proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde proteinlerin nükleer ekspresyon seviyelerinde daha fazla olmak üzere azalmalar olduğu belirlendi (Şekil 190). Sitoplazmik protein ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirildiğinde 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarında p-Nrf2 ve Hif-α proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişim belirlenmemesine rağmen p-NF-κB seviyesinde doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 1.97-kat ($p<0.01$) ve 2.34-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 191_A). 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının proteinlerin nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri incelendiğinde ise p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki azalma katsayıları doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 4.9-kat ($p<0.01$) ve 5.7-kat ($p<0.01$), 3.4-kat ($p<0.01$) ve 5.5-kat ($p<0.01$), 3.5-kat ($p<0.01$) ve 3.6-kat ($p<0.01$) olarak tespit edildi (Şekil 191_B). Ayrıca sitoplazmik AR seviyesinde doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 2.6-kat ($p<0.01$) ve 3.08-kat ($p<0.01$) azalma olduğu (Şekil 191_A), nükleer AR seviyesinin ise doz grubuna bağlı şekilde belirgin olarak düştüğü (22.0-kat, $p<0.01$ ve 18.2-kat, $p<0.01$) belirlendi (Şekil 191_B). Ek olarak PSA ekspresyonunda doz grubu sırasına bağlı olarak 1.81-kat ($p<0.01$) ve 1.6-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 191_A).



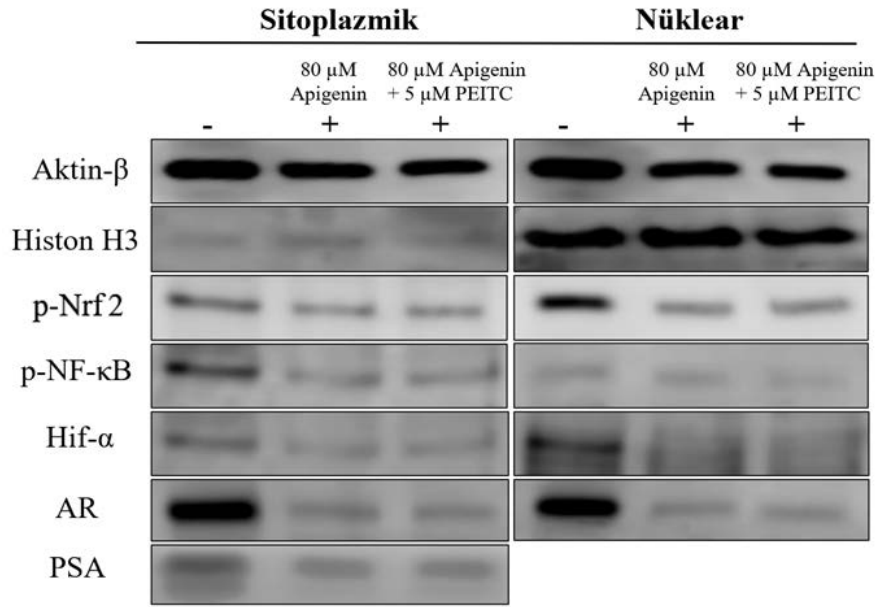
Şekil 190. Apigenin ve PEITC'in LNCaP-HPR hücre hattında 24 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi



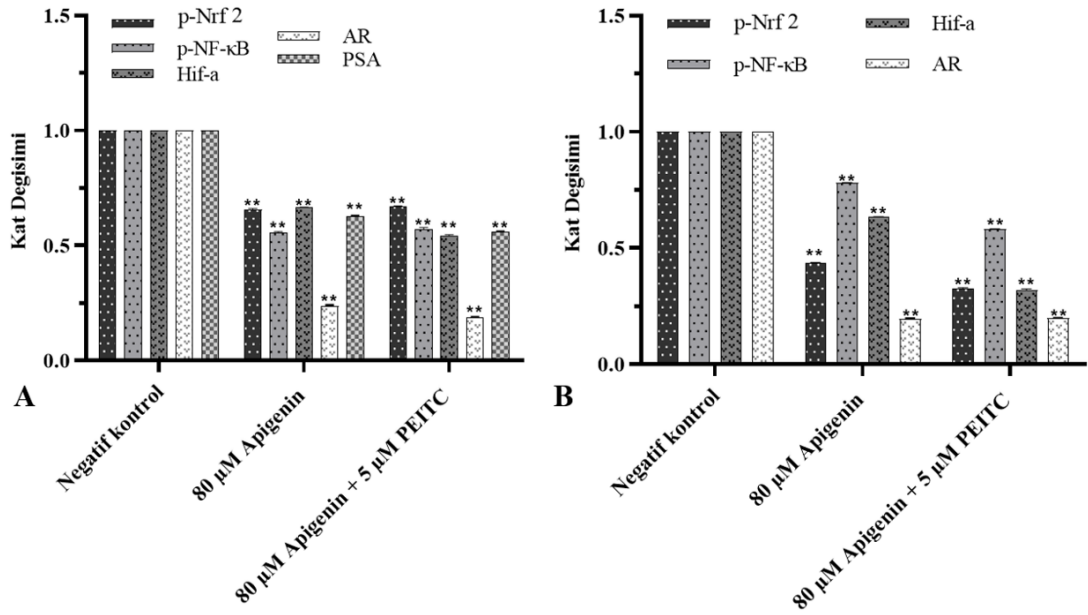
Şekil 191. 24 saatlik Apigenin ve PEITC uygulanan LNCaP-HPR hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.10.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

C4-2 hücre hattında 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde doz uygulamaları sonrasında tüm proteinlerin farklı kat sayılarda azaldığı belirlendi (Şekil 192). Sitoplazmik protein ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirildiğinde 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarında p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 1.52-kat ($p<0.01$) ve 1.49-kat ($p<0.01$), 1.80-kat ($p<0.01$) ve 1.75-kat ($p<0.01$), 1.5-kat ($p<0.01$) ve 1.82-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 193_A). 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının proteinlerin nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri incelendiğinde ise p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki azalma katsayıları doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 2.3-kat ($p<0.01$) ve 3.07-kat ($p<0.01$), 1.28-kat ($p<0.01$) ve 1.72-kat ($p<0.01$), 1.58-kat ($p<0.01$) ve 3.15-kat ($p<0.01$) olarak tespit edildi (Şekil 193_B). Ayrıca sitoplazmik AR seviyesinde doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 4.2-kat ($p<0.01$) ve 5.4-kat ($p<0.01$) azalma olduğu (Şekil 193_A), nükleer AR seviyesinin ise doz grubu sırasına bağlı olarak 5.14-kat ($p<0.01$) ve 5.03-kat ($p<0.01$) düşüş gösterdiği belirlendi (Şekil 193_B). Ek olarak PSA ekspresyonunda doz grubu sırasına bağlı olarak 1.6-kat ($p<0.01$) ve 1.78-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 193_A).



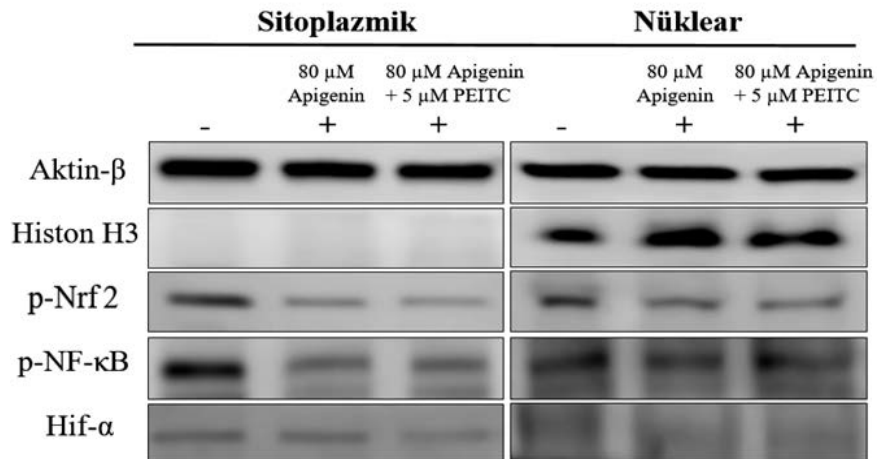
Şekil 192. Apigenin ve PEITC'in C4-2 hücre hattında 24 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi



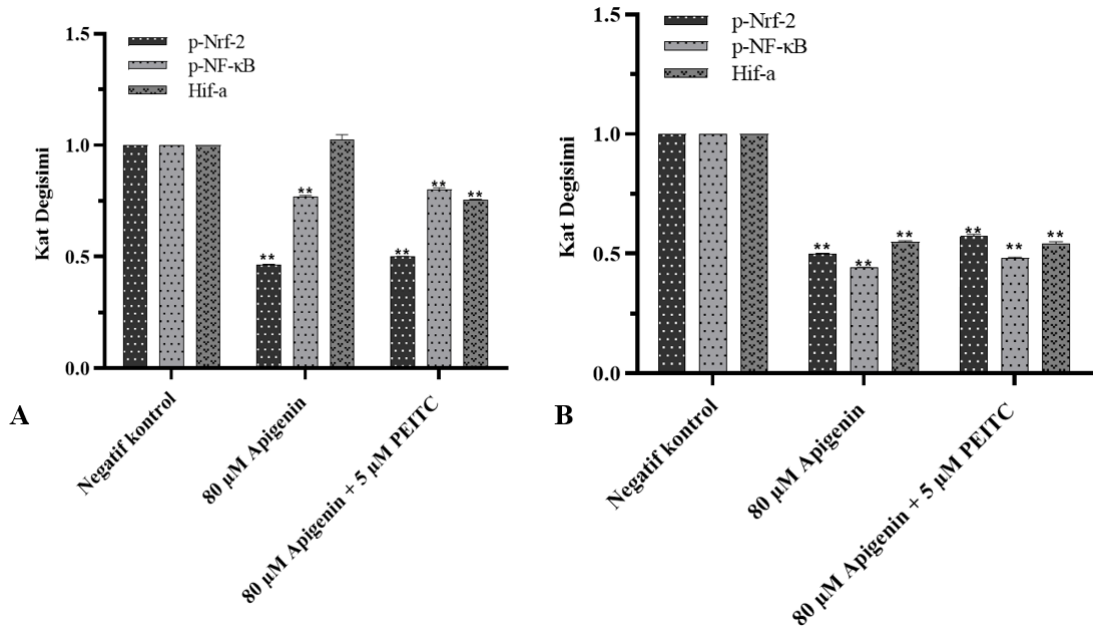
Şekil 193. 24 saatlik Apigenin ve PEITC uygulanan C4-2 hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nüklear protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.10.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında protein ekspresyonu üzerine etkileri

RWPE-1 hücre hattında 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α proteinlerinin sitoplazmik ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine 24 saatlik etkileri analiz edildiğinde doz uygulamaları sonrasında tüm proteinlerin farklı kat sayılarda azaldığı belirlendi (Şekil 194). Sitoplazmik protein ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirildiğinde 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarında p-Nrf2 ile p-NF- κ B proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 2.15-kat ($p<0.01$) ve 1.90-kat ($p<0.01$) ile 1.3-kat ($p<0.01$) ve 1.25-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 195_A). Hif- α proteininin ekspresyon seviyesinde ise 80 μ M Apigenin uygulaması sonucu anlamlı bir değişim saptanmazken kombin doz grubunda proteinin sitoplazmik ekspresyon seviyesinde 1.32-kat ($p<0.01$) anlamlı azalma olduğu belirlendi (Şekil 195_A). RWPE-1 hücre hattında 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının proteinlerin nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri incelendiğinde ise p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki azalma katsayıları doz grubu sırasına bağlı olarak sırasıyla 2.0-kat ($p<0.01$) ve 1.72-kat ($p<0.01$), 2.26-kat ($p<0.01$) ve 2.07-kat ($p<0.01$), 1.81-kat ($p<0.01$) ve 1.85-kat ($p<0.01$) olarak tespit edildi (Şekil 195_B).



Şekil 194. Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 hücre hattında 24 saatlik protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi



Şekil 195. 24 saatlik Apigenin ve PEITC uygulanan RWPE-1 hücre hattında değişen (A) sitoplazmik (B) nükleer protein ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi (** $p < 0.01$)

4.10.3. Apigenin ve PEITC'in protein ekspresyonu üzerine etki açısından Cabazitaxel ile karşılaştırması

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre proteinlerin aktif formları ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri karşılaştırıldı. Cabazitaxel'in LNCaP dışındaki LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında p-NF-κB proteinini, RWPE-1 hücre hattında p-NF-κB'ya ek olarak p-Nrf2 protein ekspresyonunu arttırıcı etkileri olduğu belirlendi. Buna karşılık bulgular, Apigenin ve PEITC kombinasyonunun tüm hücre hatlarında p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α protein seviyelerinin azalması yönünde etkilerinin bulunduğunu, mevcut etkilerin tüm hücre hatlarında Cabazitaxel etkinliğinden fazlaca yüksek olduğunu ortaya koydu. Ek olarak Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hem sitoplazmik hem de nükleer AR seviyesini daha fazla olarak inhibe ettiği ve prostat kanseri hücrelerinde PSA sekresyonundaki azalmanın kombin doz gruplarında daha belirgin olduğu gösterildi. Mevcut bulgular tüm hücre hatlarında immünfloresan analiz bulguları ile desteklendi.

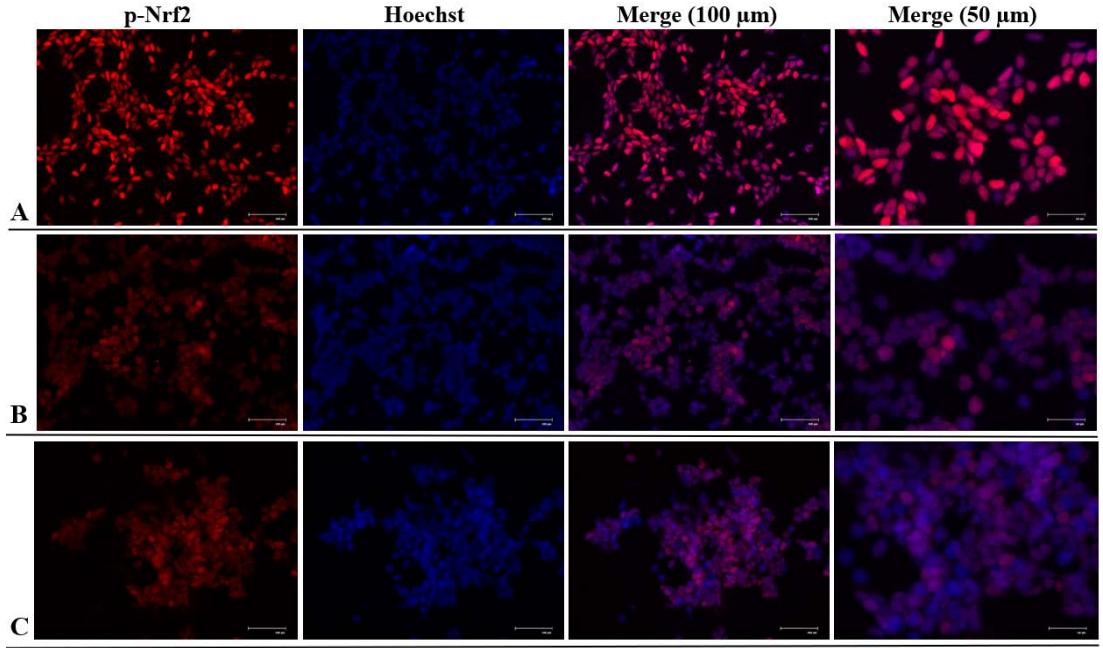
4.11. İmmünfloresan analiz bulguları

4.11.1. Cabazitaxel'in immünfloresan analiz bulguları

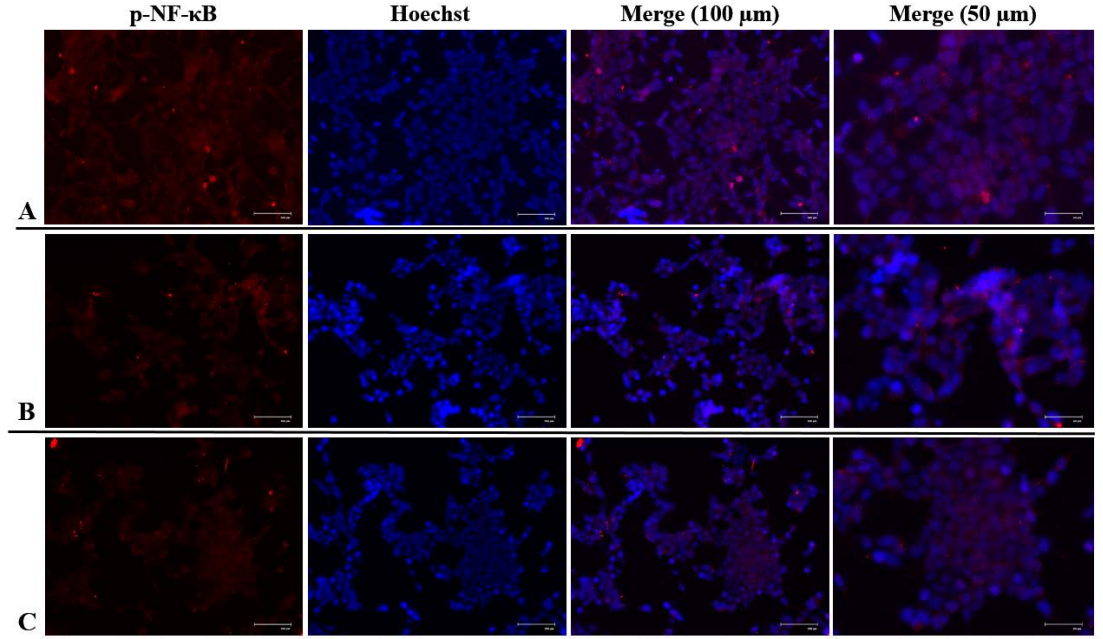
Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarda 48 saatlik uygulaması sonucu LNCaP, LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında p-Nrf2, p-NF- κ B, Hif- α , AR ve PSA; RWPE-1 hücre hattında ise p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α proteinlerinin subsellüler lokalizasyonları ve ekspresyon seviyelerindeki değişimler immünfloresan analiz ile görüntüledi. Her bir hücre hattında bulgular detaylandırıldı.

4.11.1.1. Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

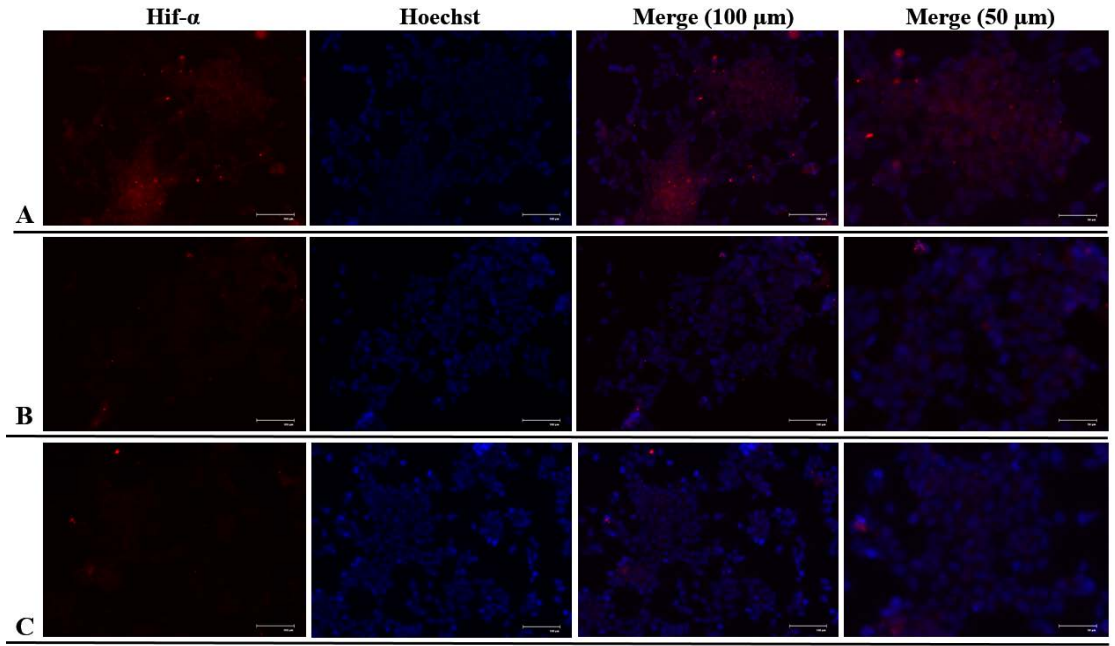
Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattında immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde p-Nrf2 proteininin belirgin olarak nükleusta lokalize olduğu ve nüklear ekspresyonunun Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 196). LNCaP hücre hattında p-NF- κ B proteininin hem sitoplazmada hem de nükleusta lokalize olduğu ve her iki lokalizasyondaki ekspresyon seviyesinin de Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak azaldığı saptandı (Şekil 197). Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında doz gruplarında Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak Hif- α 'nın hem sitoplazmik hem de nüklear ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 198). En belirgin düşüş nüklear lokalizasyondaki ekspresyonu oldukça yüksek olan AR proteininde gözlemlendi. Elde edilen görüntüler, doz grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nüklear AR ekspresyonunda doza bağlı net azalma olduğunu ortaya koydu (Şekil 199). PSA'nın ise LNCaP hücrelerinin sitoplazmik uzantıları boyunca düzenli konumlandığı; ancak Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak sitoplazmik seviyesinde azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 200). Cabazitaxel'in LNCaP hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



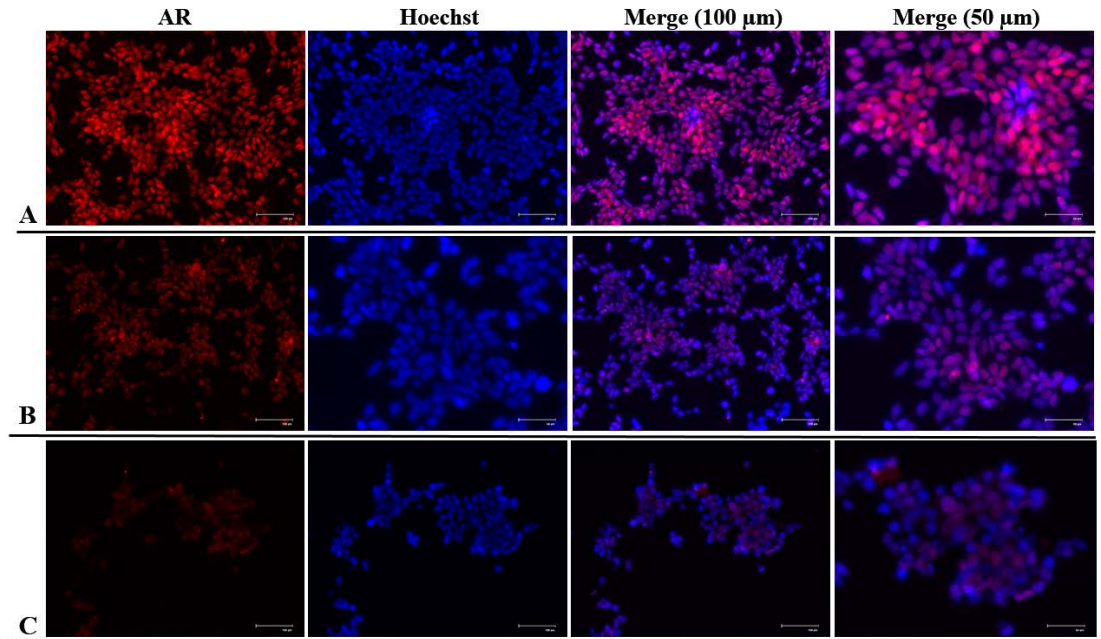
Şekil 196. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



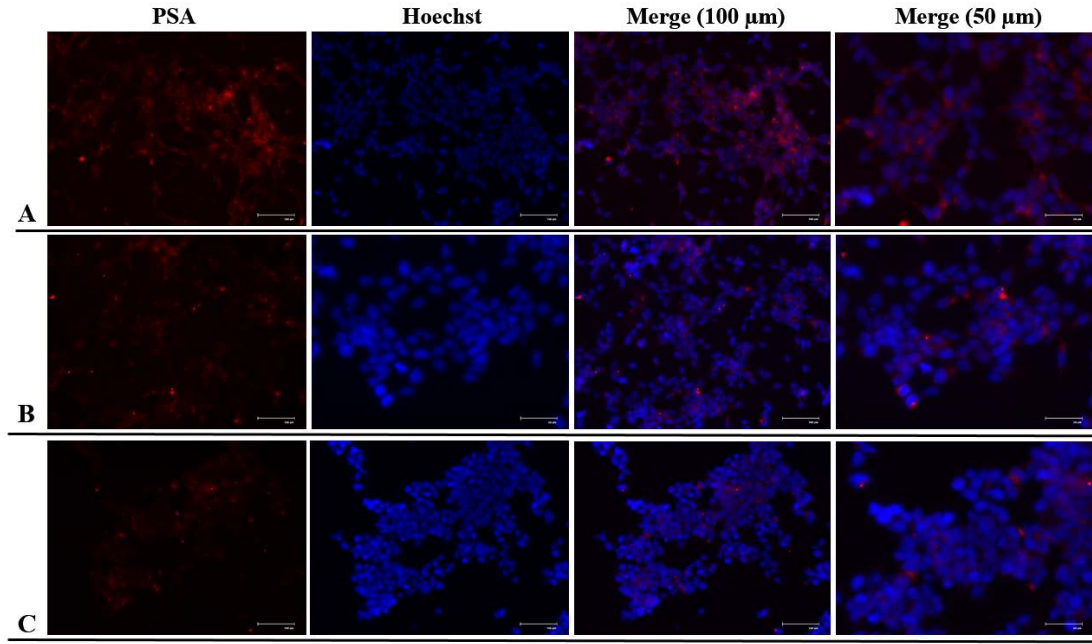
Şekil 197. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP hücre hattında p-NF- κ B proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 198. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP hücre hattında Hif- α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



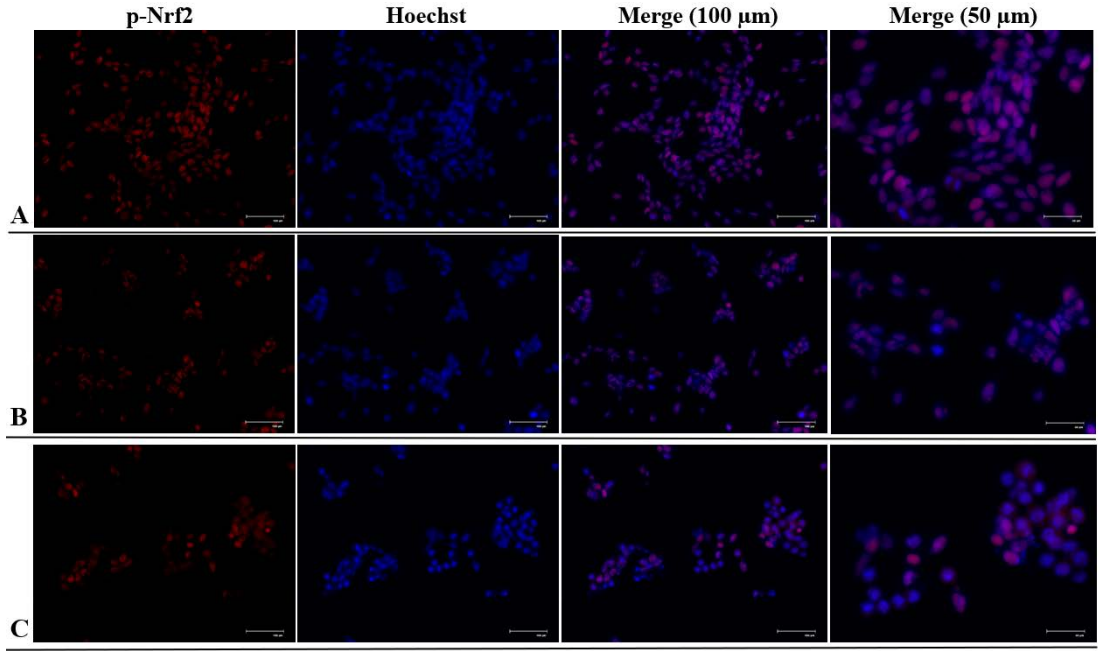
Şekil 199. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP hücre hattında AR proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



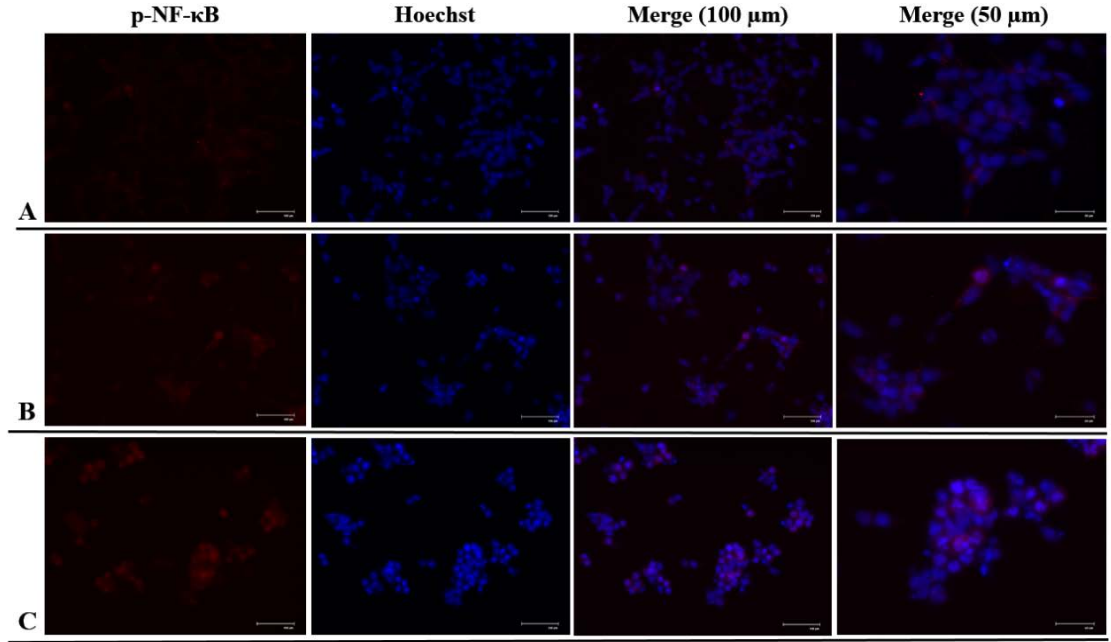
Şekil 200. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP hücre hattında PSA proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.11.1.2. Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

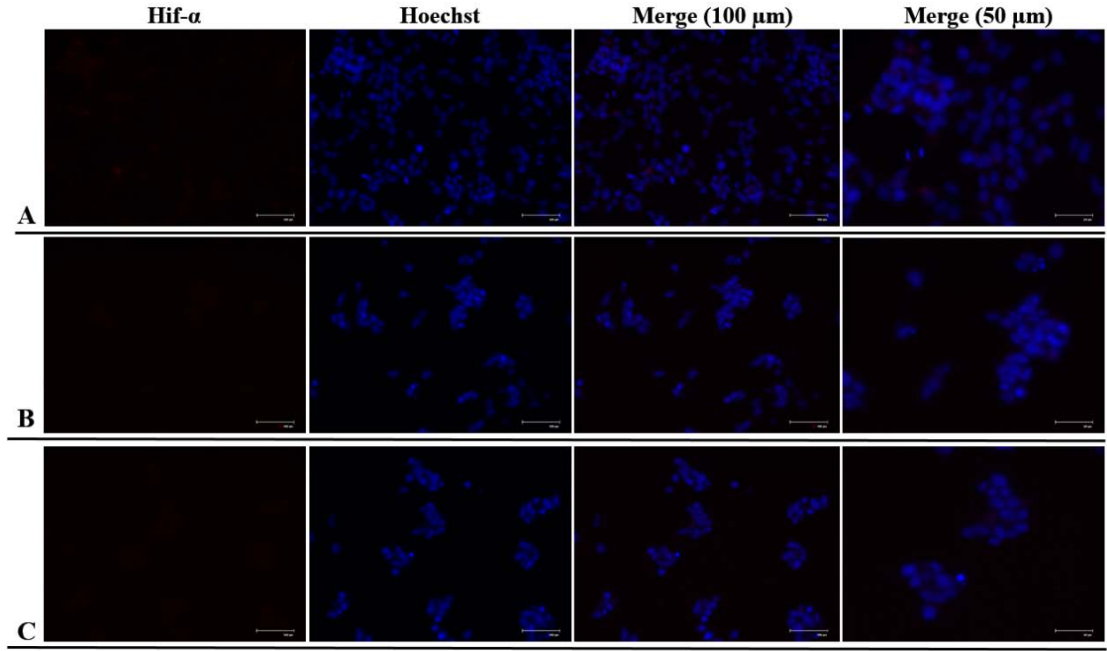
Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattında immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde nüklear lokalizasyonlu p-Nrf2 proteininin Cabazitaxel doz artışına bağlı ve 5 nM'da daha belirgin olmak üzere nüklear ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 201). p-NF- κ B proteininin genel olarak sitoplazmada lokalize olduğu ve Cabazitaxel uygulaması sonrasında 5 nM doz grubunda daha belirgin olmak üzere sitoplazmik lokalizasyondaki seviyesinin arttığı gözlemlendi (Şekil 202). Kontrol grubunda oldukça az seviyede eksprese olan Hif- α proteininin Cabazitaxel doz artışına bağlı sitoplazmik ve nüklear lokalizasyonlarda azaldığı gözlemlendi (Şekil 203). Nükleusta lokalize olan AR'nin ise Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak nüklear lokalizasyondaki seviyesinin net azalma gösterdiği belirlendi (Şekil 204). Son olarak sitoplazmada lokalize PSA proteinin de Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak doz gruplarında azaldığı tespit edildi (Şekil 205). Cabazitaxel'in LNCaP-HPR hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



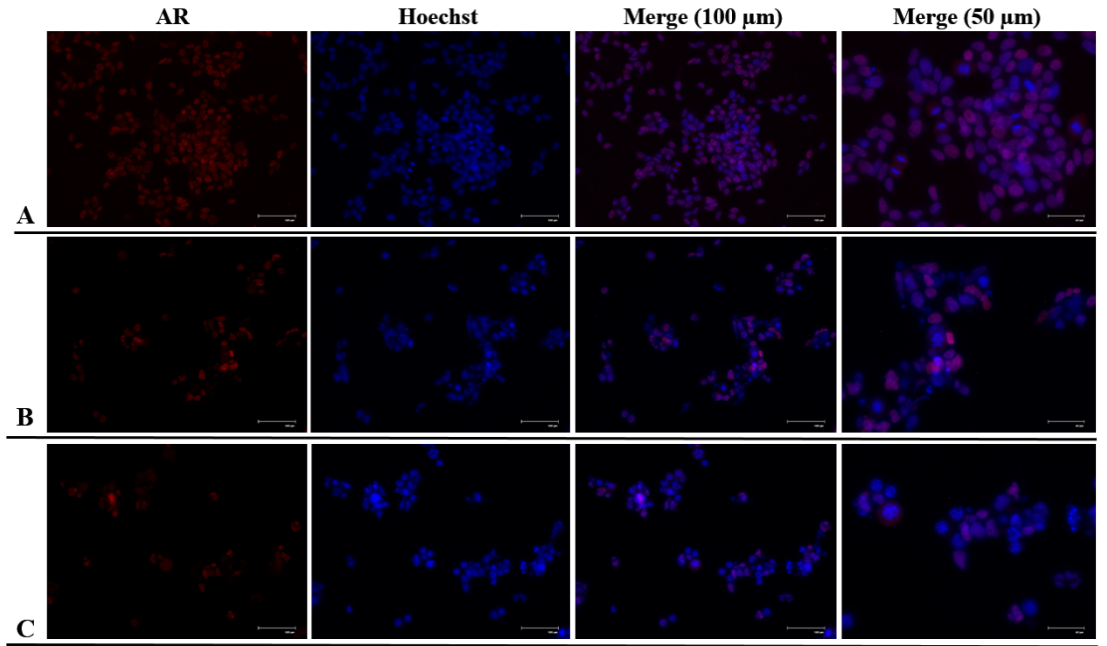
Şekil 201. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



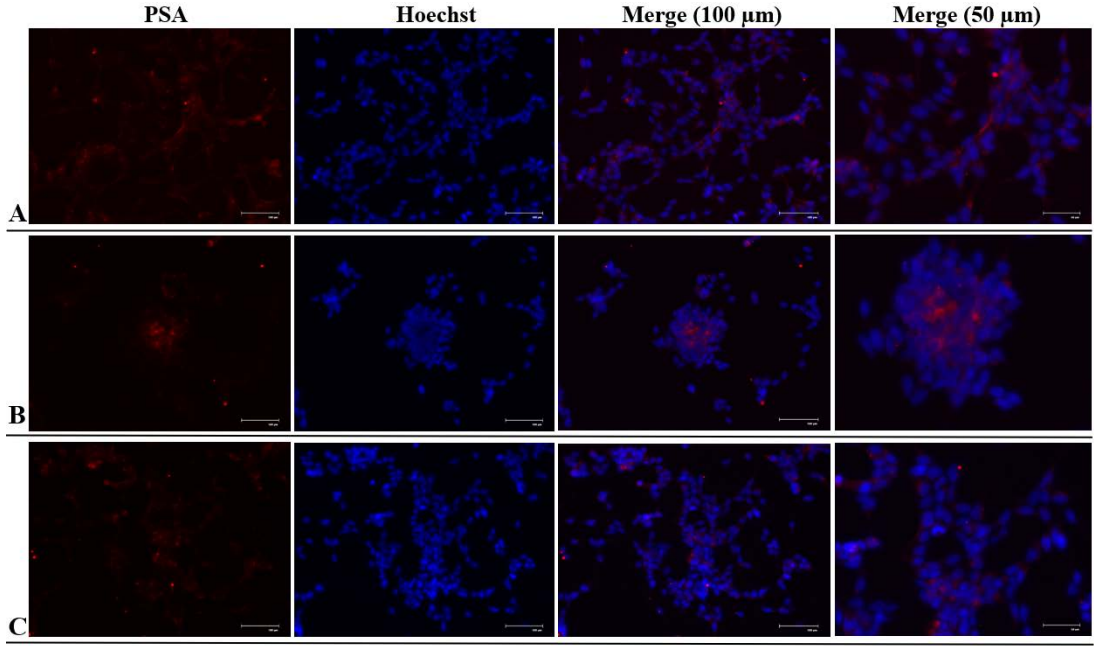
Şekil 202. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında p-NF- κ B proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 203. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında Hif- α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



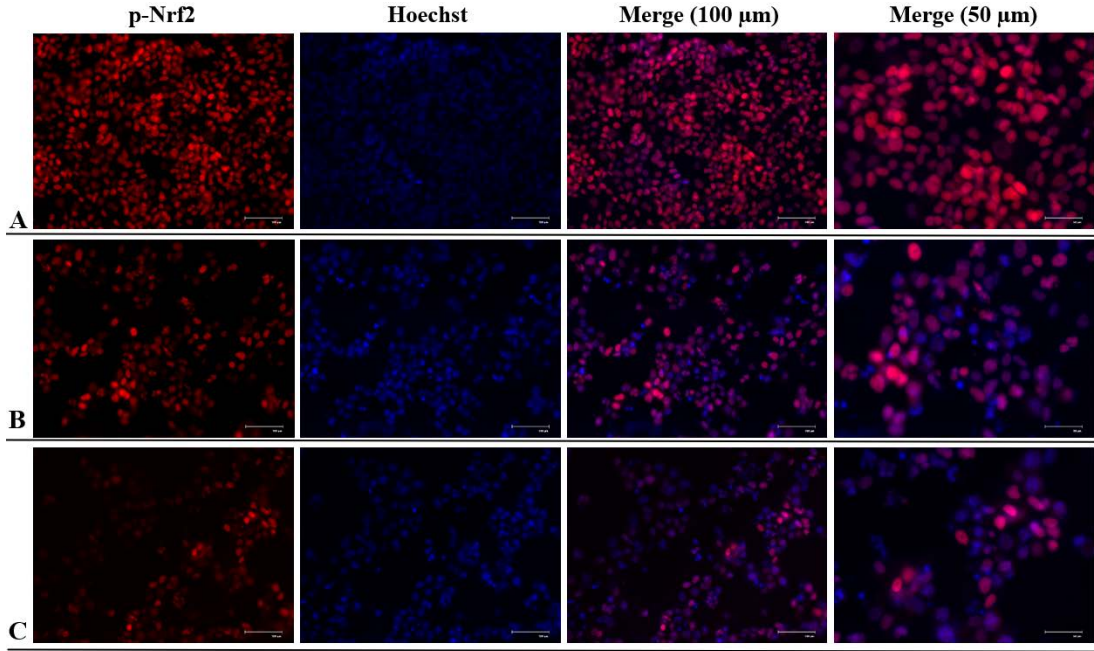
Şekil 204. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında AR proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



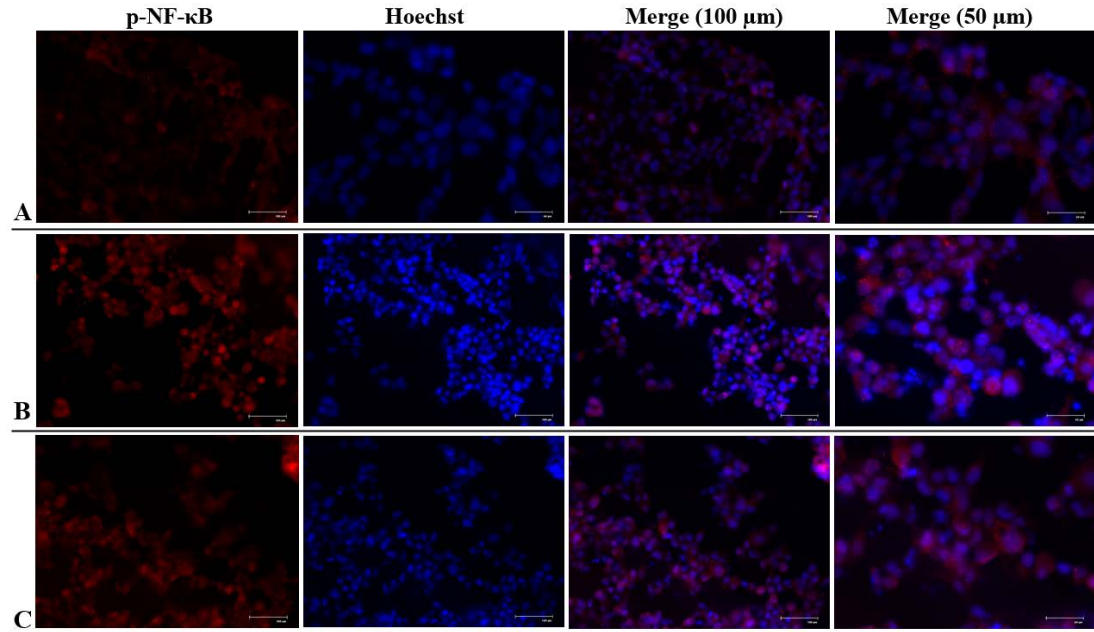
Şekil 205. Cabazitaxel uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında PSA proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.11.1.3. Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

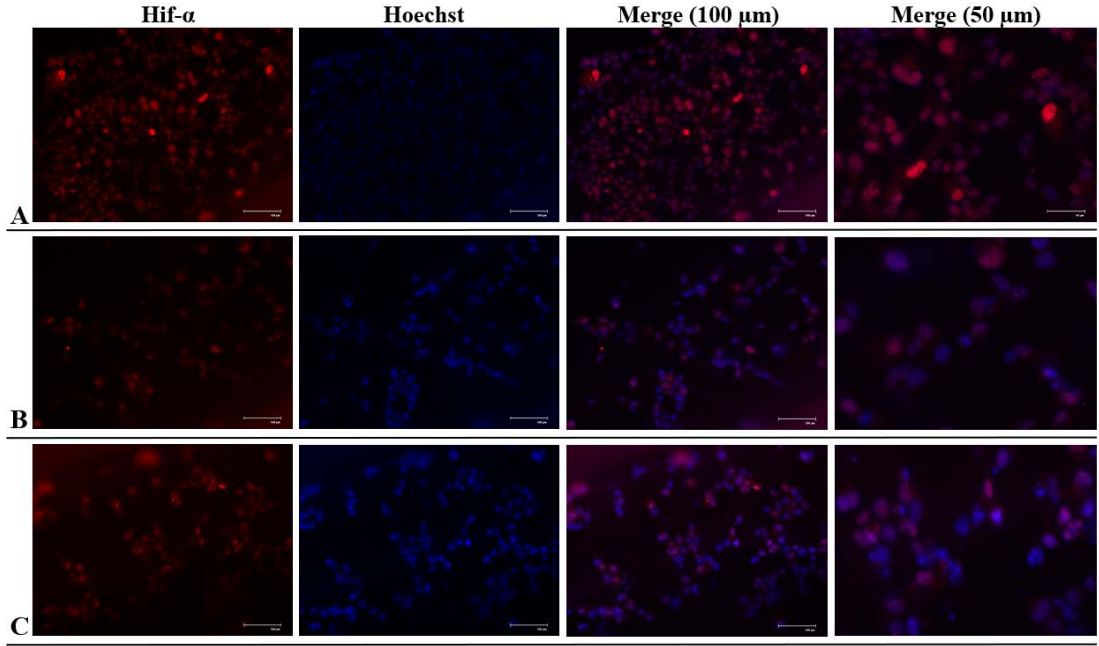
Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde nükleer lokalizasyonlu p-Nrf2 proteininin Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 206). Ancak C4-2 hücre hattında tespit edilen p-Nrf2 seviyesindeki azalmanın, LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde Cabazitaxel uygulaması sonrasında belirlenen azalma ile karşılaştırıldığında daha az düzeyde olduğu gözlemlendi. C4-2 hücre hattında p-NF-κB proteininin kontrol grubunda genel olarak sitoplazmada lokalize olduğu ve Cabazitaxel uygulaması sonrasında 5 nM doz grubunda daha belirgin olmak üzere hem sitoplazmik hem de nükleer lokalizasyonlardaki seviyesinin arttığı belirlendi (Şekil 207). Kontrol grubunda nükleer lokalizasyonda ekspresyonu daha belirgin olan Hif-α proteininin ise hem sitoplazmik ve hem de nükleer lokalizasyonlarda Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak azalma gösterdiği saptandı (Şekil 208). Genel olarak nükleusta lokalize olan AR'nin C4-2 hücre hattında Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak nükleer lokalizasyondaki seviyesinin az miktarda azalma gösterdiği belirlendi (Şekil 209). Son olarak sitoplazmada lokalize PSA seviyesinde de Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak bir azalma olduğu görüntülendi (Şekil 210). Cabazitaxel'in C4-2 hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



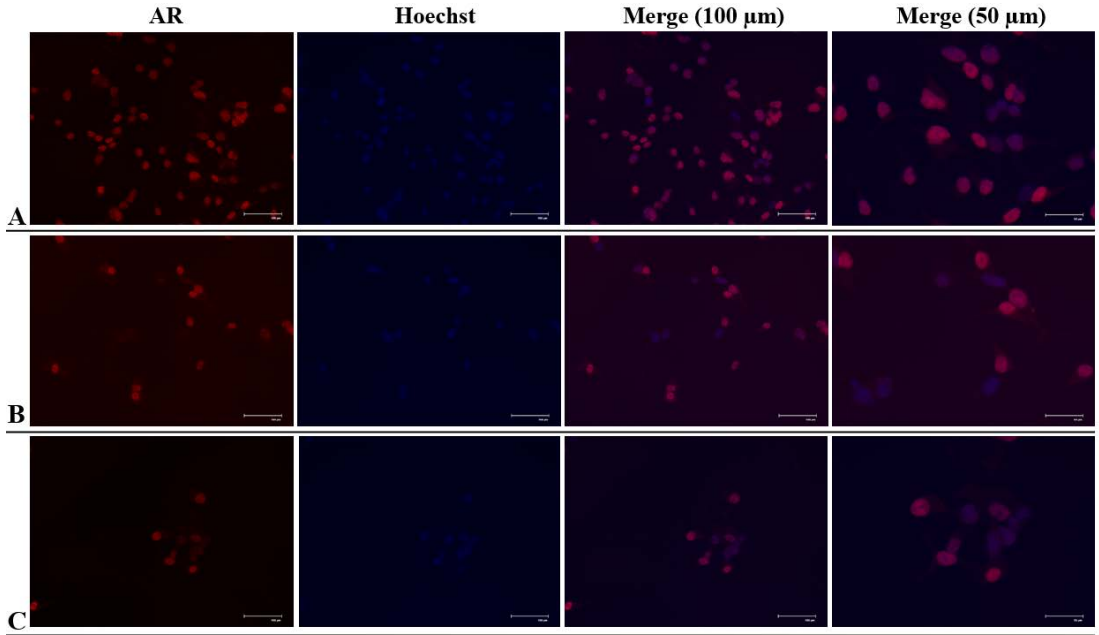
Şekil 206. Cabazitaxel uygulanmış C4-2 hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



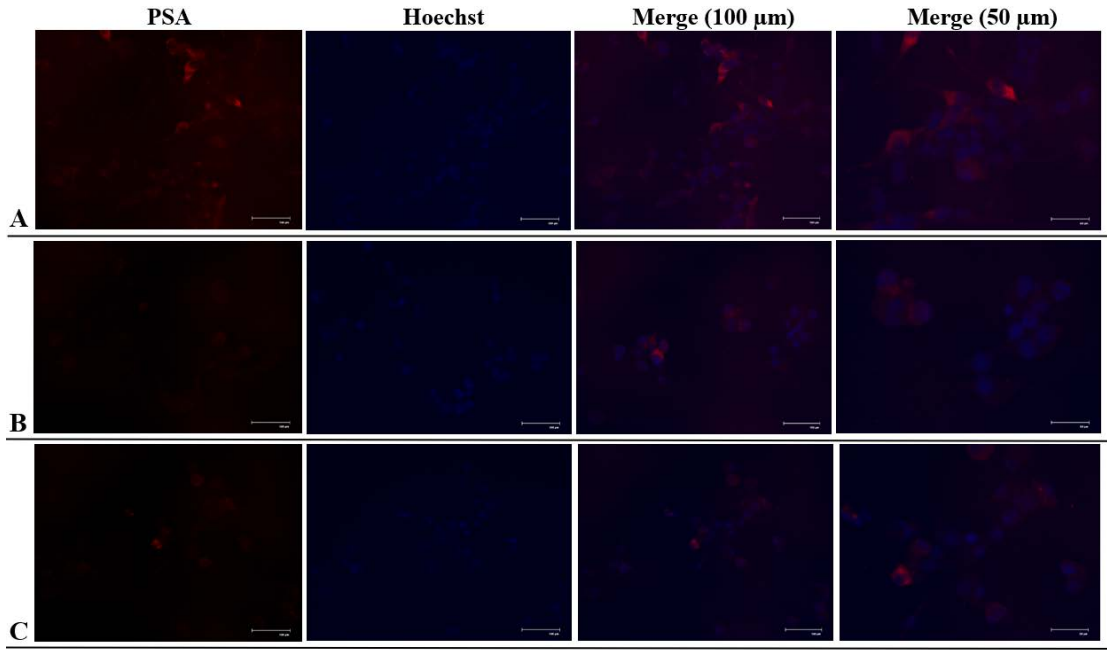
Şekil 207. Cabazitaxel uygulanmış C4-2 hücre hattında p-NF- κ B proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 208. Cabazitaxel uygulanmış C4-2 hücre hattında Hif- α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



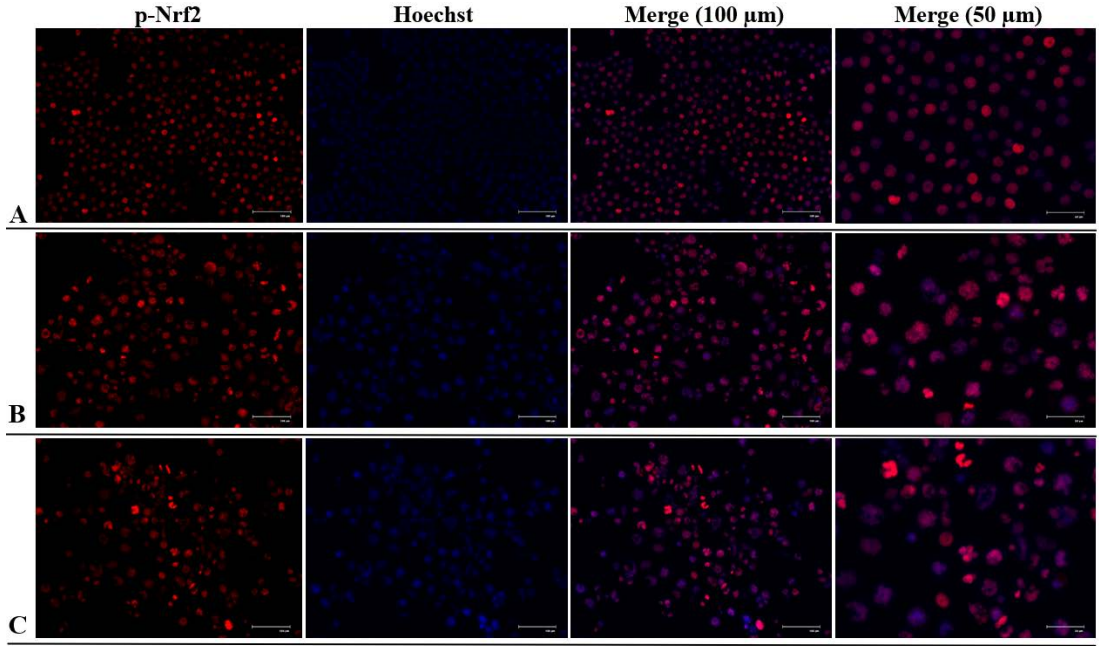
Şekil 209. Cabazitaxel uygulanmış C4-2 hücre hattında AR proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



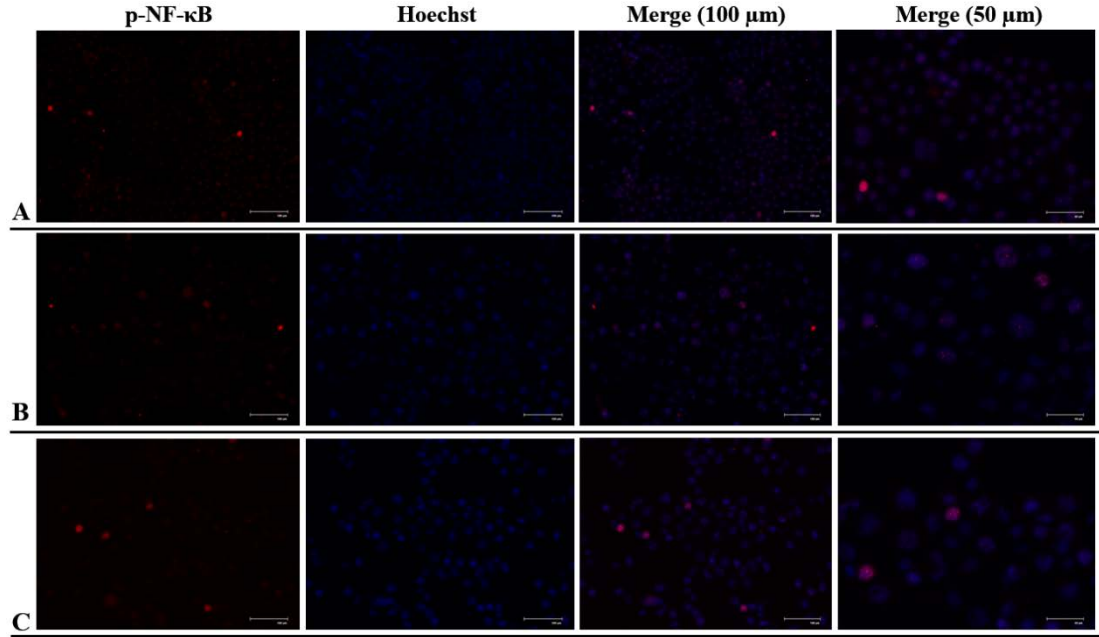
Şekil 210. Cabazitaxel uygulanmış C4-2 hücre hattında PSA proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

4.11.1.4. Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

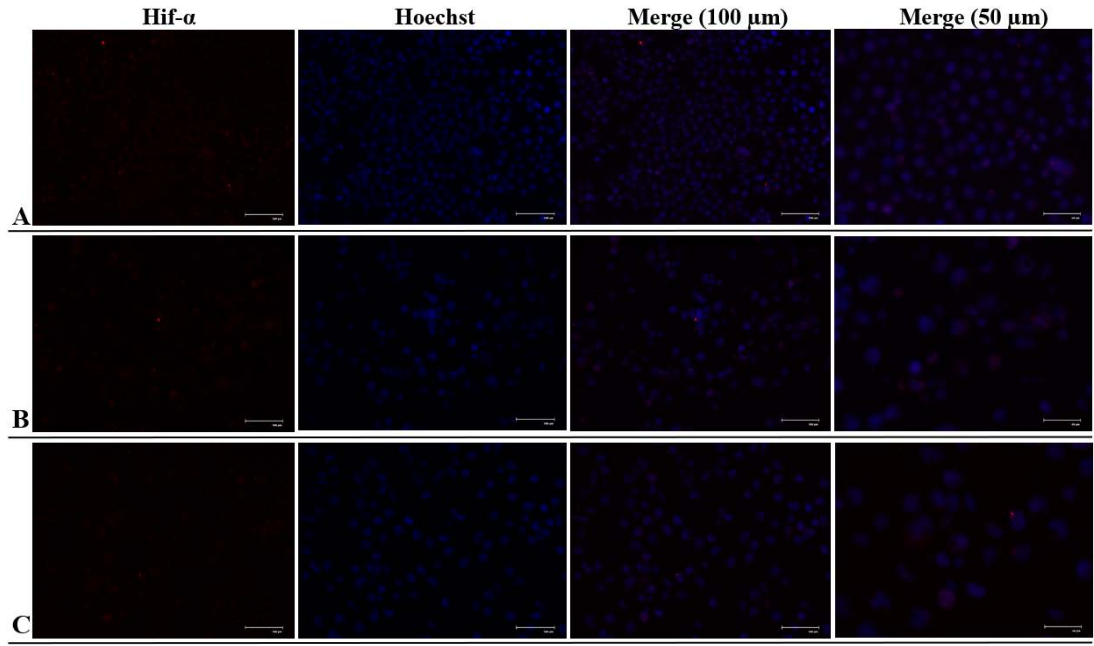
Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde p-Nrf2 proteininin belirgin olarak nükleusta lokalize olduğu ve nükleer ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Cabazitaxel doz gruplarında arttığı tespit edildi (Şekil 211). Hem sitoplazmada hem de nükleusta lokalize olduğu belirlenen p-NF- κ B proteininin sitoplazmik ekspresyon seviyesinde az miktarda da olsa bir azalma olduğu gözlenmesine rağmen p-NF- κ B'nin nükleer seviyesinde belirgin bir değişim saptanmadı (Şekil 212). Son olarak RWPE-1 hücre hattında düşük düzeyde nükleusta eksprese edilen Hif- α proteininin hem sitoplazmik hem de nükleer ekspresyon seviyesinin Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak daha da azaldığı gözlemlendi (Şekil 213). Cabazitaxel'in RWPE-1 hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



Şekil 211. Cabazitaxel uygulanmış RWPE-1 hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 212. Cabazitaxel uygulanmış RWPE-1 hücre hattında p-NF- κ B proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM



Şekil 213. Cabazitaxel uygulanmış RWPE-1 hücre hattında Hif- α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 5 nM (C) 10 nM

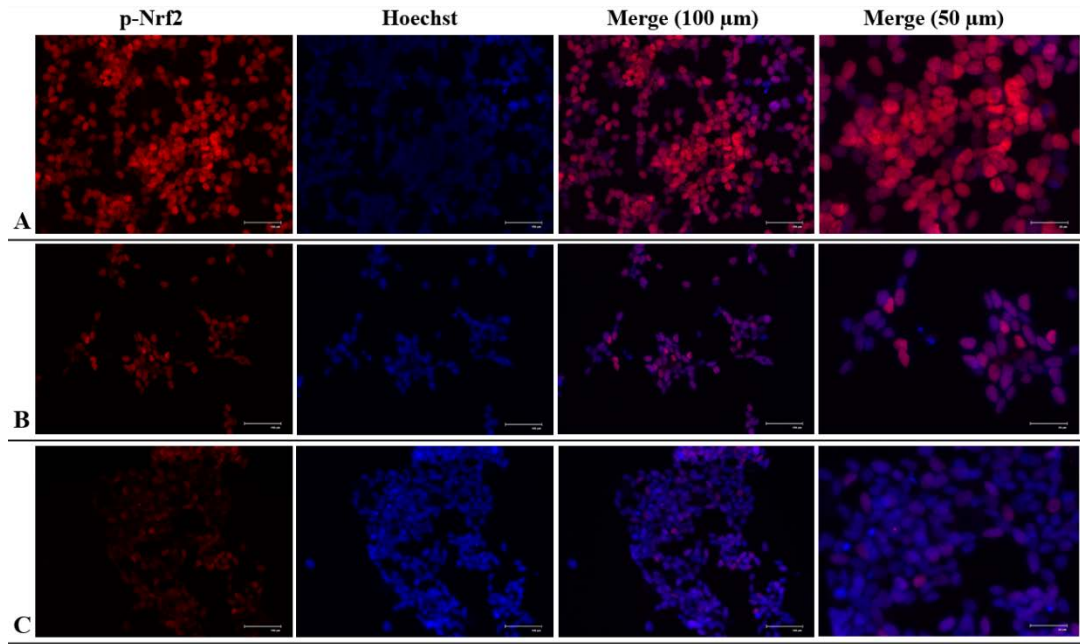
4.11.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun immünfloresan analiz bulguları

LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının 24 saatlik uygulamaları sonrasında LNCaP, LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında p-Nrf2, p-NF- κ B, Hif- α , AR ve PSA; RWPE-1 hücre hattında ise p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α proteinlerinin subsellüler lokalizasyonları ve ekspresyon seviyelerindeki değişimler immünfloresan analiz ile görüntüledi. Her bir hücre hattında bulgular detaylandırıldı.

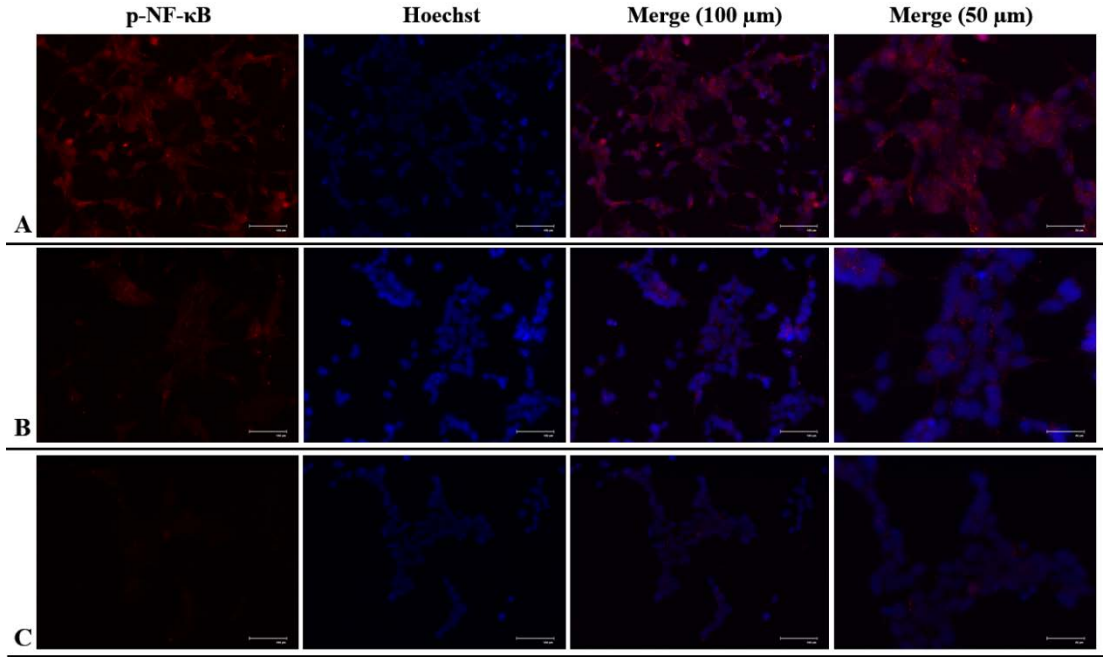
4.11.2.1. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

LNCaP hücre hattında 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde belirgin olarak nükleusta lokalize olan p-Nrf2 proteininin nüklear ekspresyonunun doz grubu sırasına bağlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 214). LNCaP hücre hattında p-NF- κ B proteinin kontrol grubunda hem sitoplazmada hem de nükleusta lokalize olduğu ve her iki lokalizasyondaki ekspresyon seviyesinin doz grubu sırasına bağlı olarak azaldığı ancak proteinin nüklear lokalizasyondaki ekspresyon seviyesinin daha belirgin olarak düşüş gösterdiği saptandı (Şekil 215). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitoplazmik ve nüklear lokalizasyonda eksprese edilen Hif- α proteininin doz

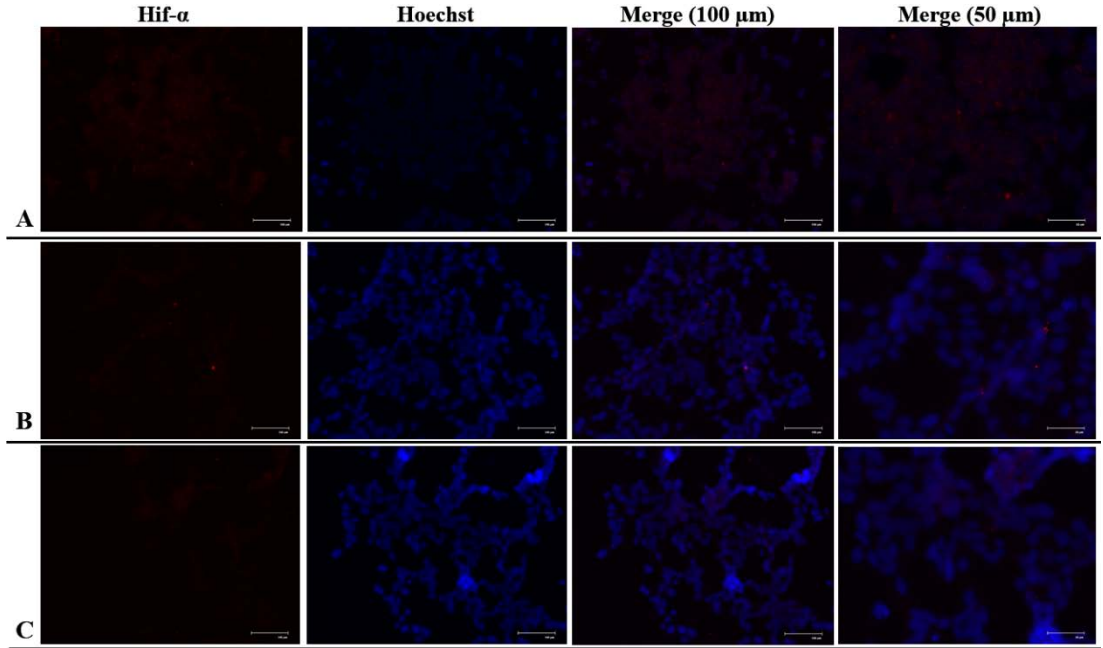
gruplarında özellikle nüklear lokalizasyonda düşüş gösterdiği tespit edildi (Şekil 216). Nüklear lokalizasyondaki ekspresyonu oldukça yüksek olan AR’de ise her iki doz grubunda da nüklear lokalizasyondaki protein seviyesinin belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 217). Son olarak LNCaP hücrelerinin sitoplazmik uzantıları boyunca düzenli lokalize olan PSA’nın doz gruplarında sitoplazmik lokalizasyonda azalma gösterdiği belirlendi (Şekil 218). Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



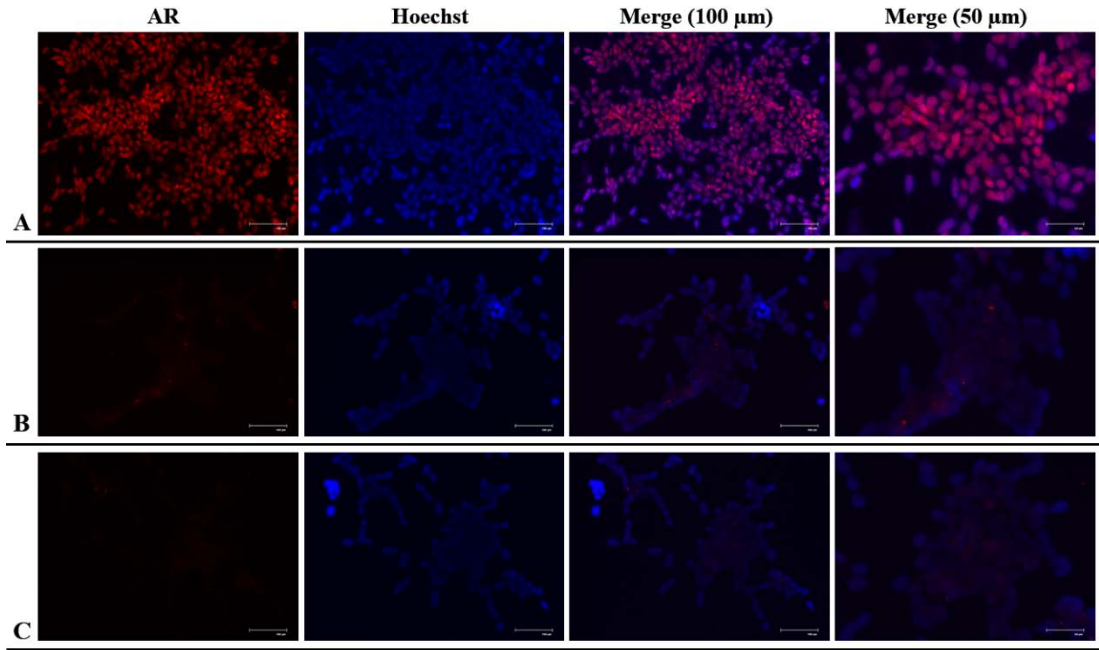
Şekil 214. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 µM Apigenin (C) 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC



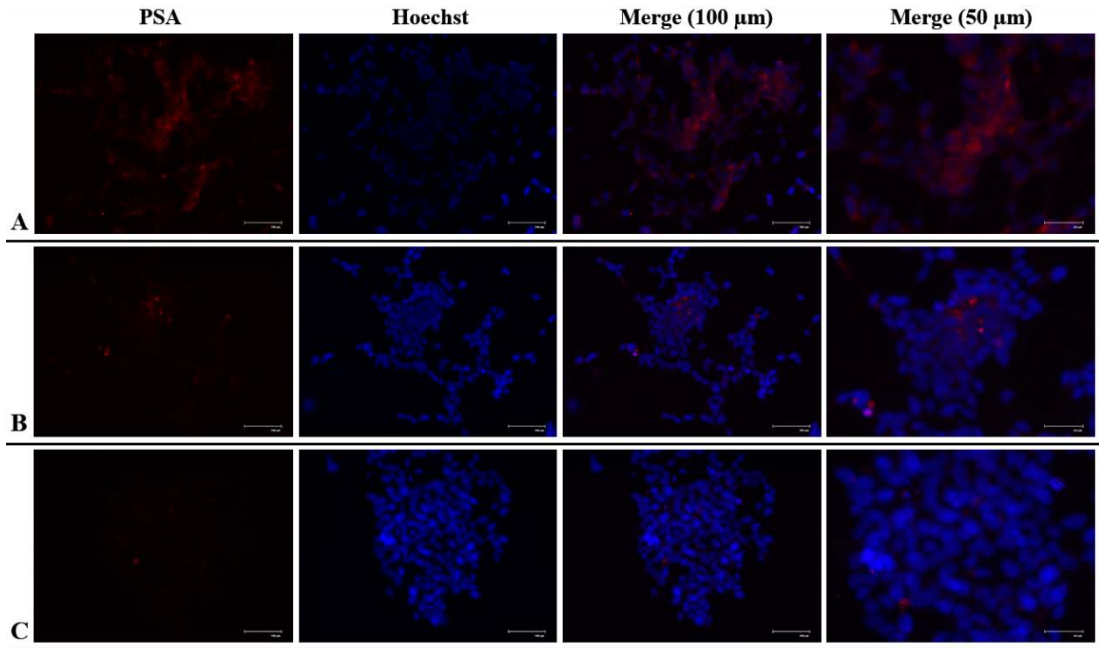
Şekil 215. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP hücre hattında p-NF-κB proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μM Apigenin (C) 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC



Şekil 216. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP hücre hattında Hif-α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μM Apigenin (C) 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC



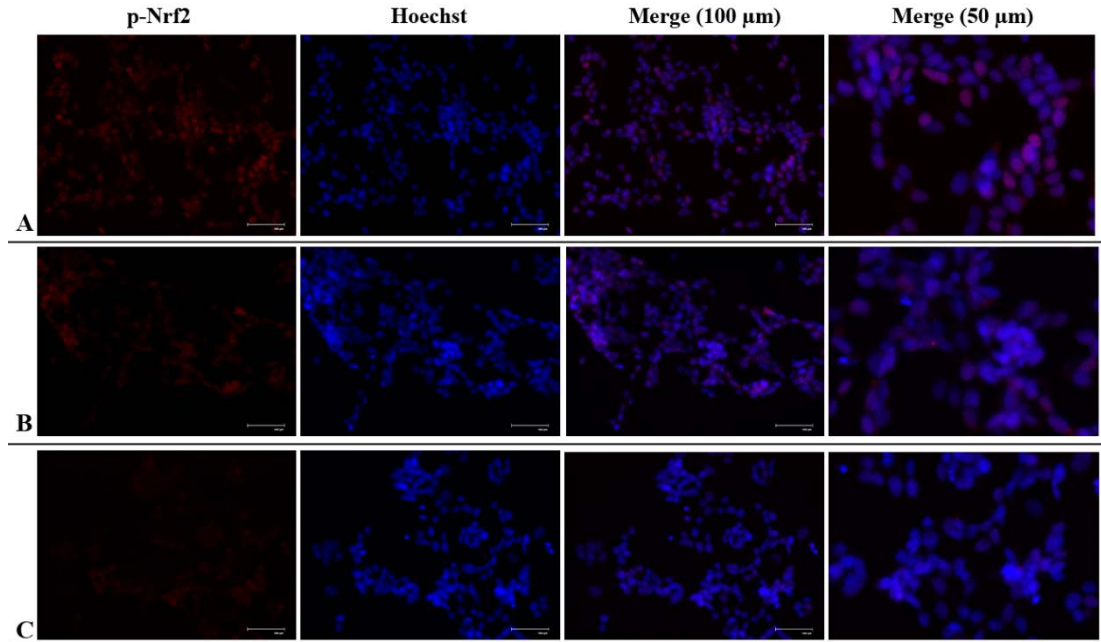
Şekil 217. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP hücre hattında AR proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



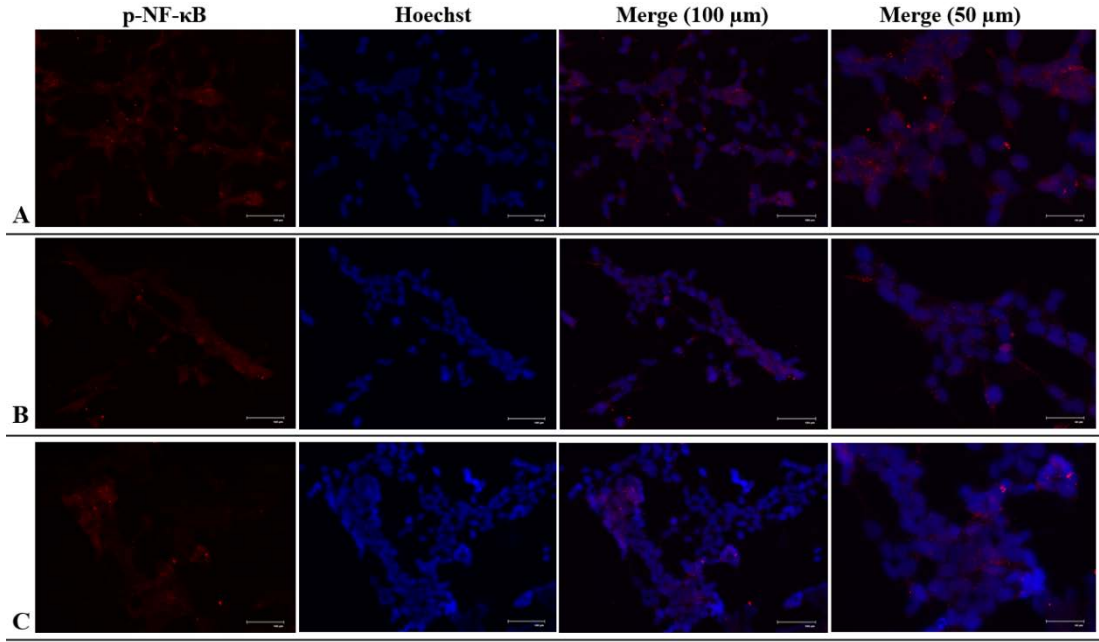
Şekil 218. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP hücre hattında PSA proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.11.2.2. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

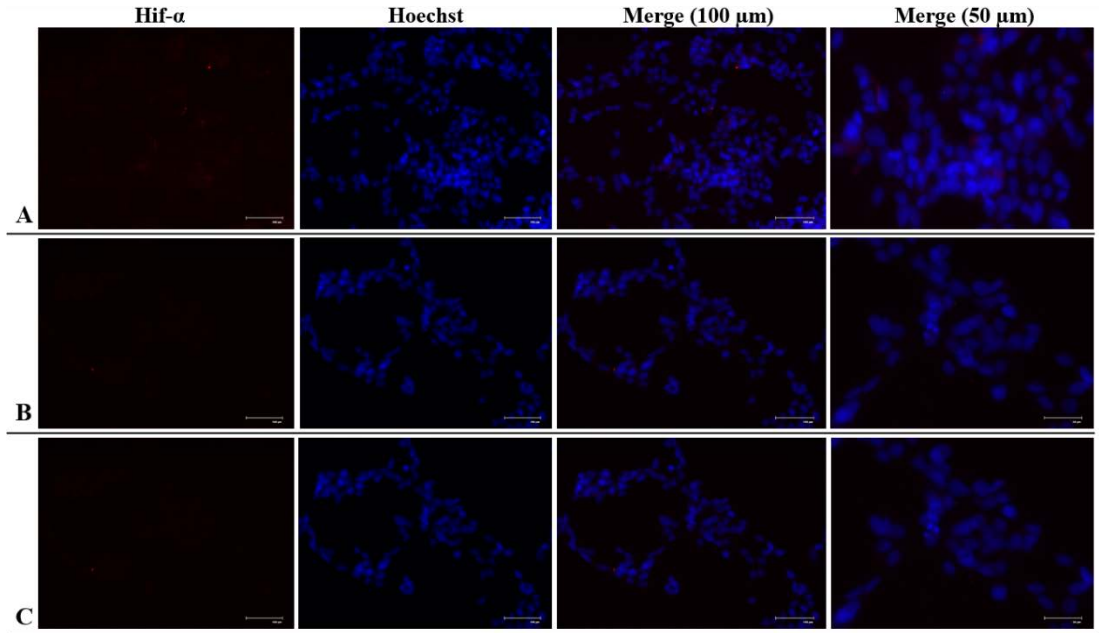
LNCaP-HPR hücre hattında 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde belirgin olarak nükleusta lokalize olan p-Nrf2 proteininin nükleer ekspresyon seviyesinin doz grubu sırasına bağlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 219). p-NF- κ B proteininin sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonlardaki ekspresyon seviyelerinde doz grubu sırasına bağlı olarak azalma olduğu ancak proteinin nükleer lokalizasyondaki ekspresyon seviyesinin daha belirgin olarak düşüş gösterdiği saptandı (Şekil 220). Doz gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonlarda eksprese edilen Hif- α proteininin seviyesinde her iki lokalizasyonda da azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 221). LNCaP-HPR hücre hattında nükleer lokalizasyonda oldukça yüksek bulunan AR proteininin ekspresyonunda ise doz uygulanan gruplarda belirgin olarak azalma olduğu tespit edildi (Şekil 222). Son olarak LNCaP-HPR hücrelerinin sitoplazmik uzantıları boyunca düzenli eksprese edilen PSA'nın doz gruplarında sitoplazmik lokalizasyonda azalma gösterdiği saptandı (Şekil 223). Apigenin ve PEITC kombinasyonunun LNCaP-HPR hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



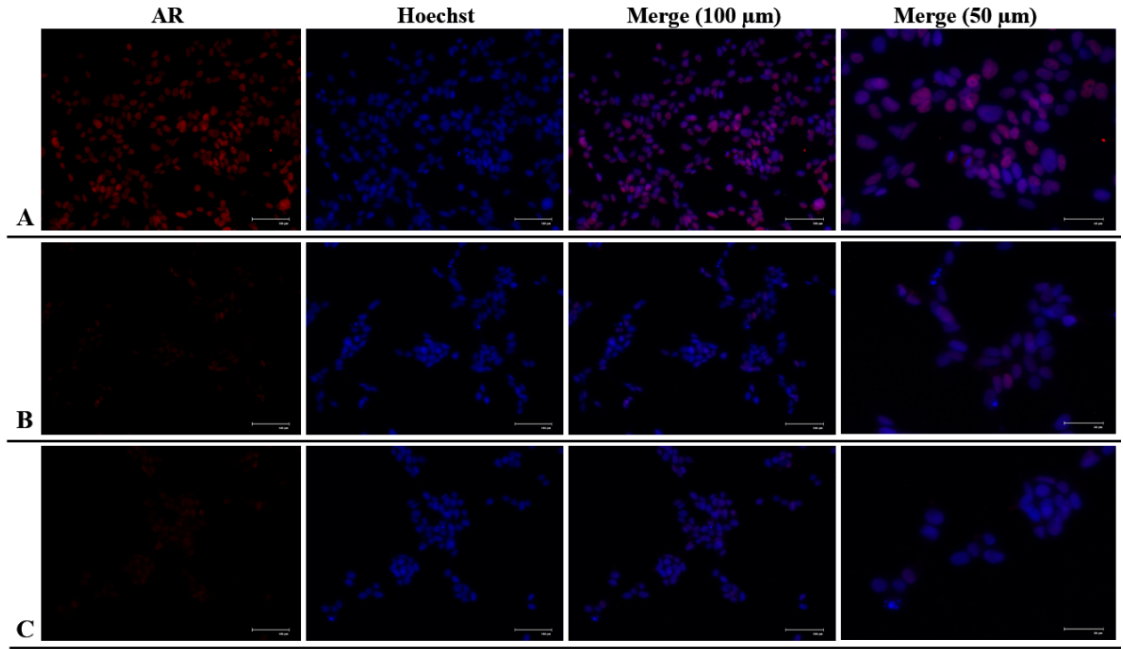
Şekil 219. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



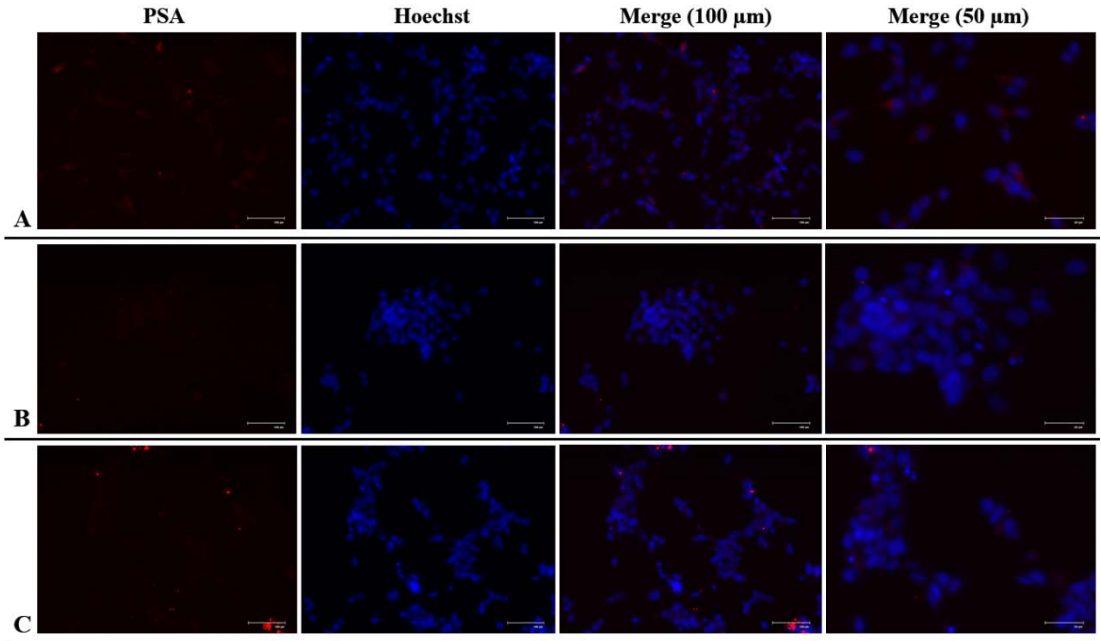
Şekil 220. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında p-NF- κ B proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 221. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında Hif- α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



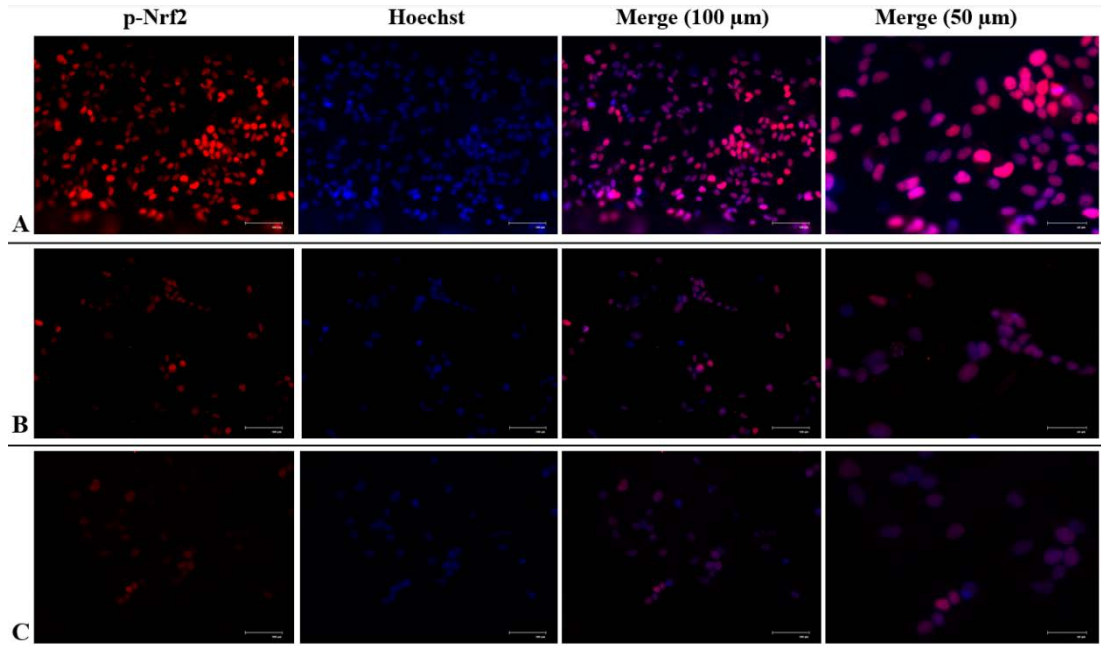
Şekil 222. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında AR proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



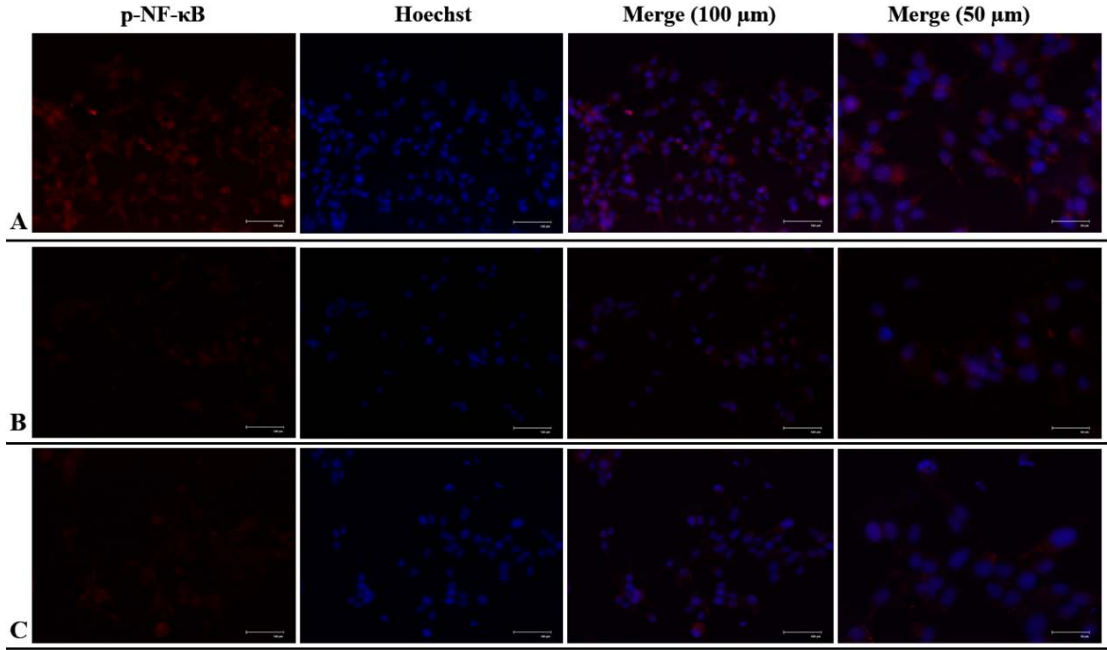
Şekil 223. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında PSA proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.11.2.3. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

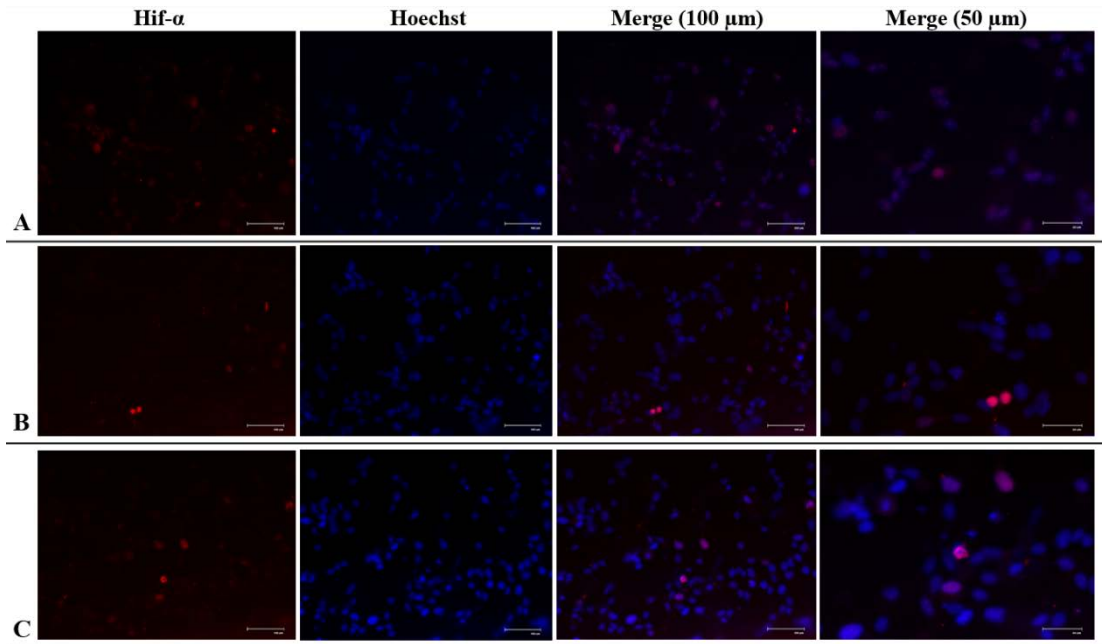
C4-2 hücre hattında 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde nüklear lokalizasyonda belirgin şekilde eksprese olan p-Nrf2 proteininin doz grubu sırasına bağlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 224). C4-2 kontrol grubunda p-NF- κ B proteininin genel olarak sitoplazmada lokalize olduğu ve doz grubu sırasına bağlı olarak proteinin hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyonlardaki seviyesinin azaldığı belirlendi (Şekil 225). C4-2 hücre hattında nüklear lokalizasyonda ekspresyonu daha belirgin olan Hif- α proteininin ise doz grubu sırasına bağlı olarak nüklear lokalizasyonunun azaldığı gözlemlendi (Şekil 226). Belirgin olarak nükleusta lokalize olan AR proteininin ekspresyon seviyesinde doz uygulanan gruplarda belirgin düşüş olduğu saptandı (Şekil 227). Son olarak sitoplazmik lokalizasyonda PSA eksprese eden hücre oranında doz gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma olduğu görüntülendi (Şekil 228). Apigenin ve PEITC kombinasyonunun C4-2 hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



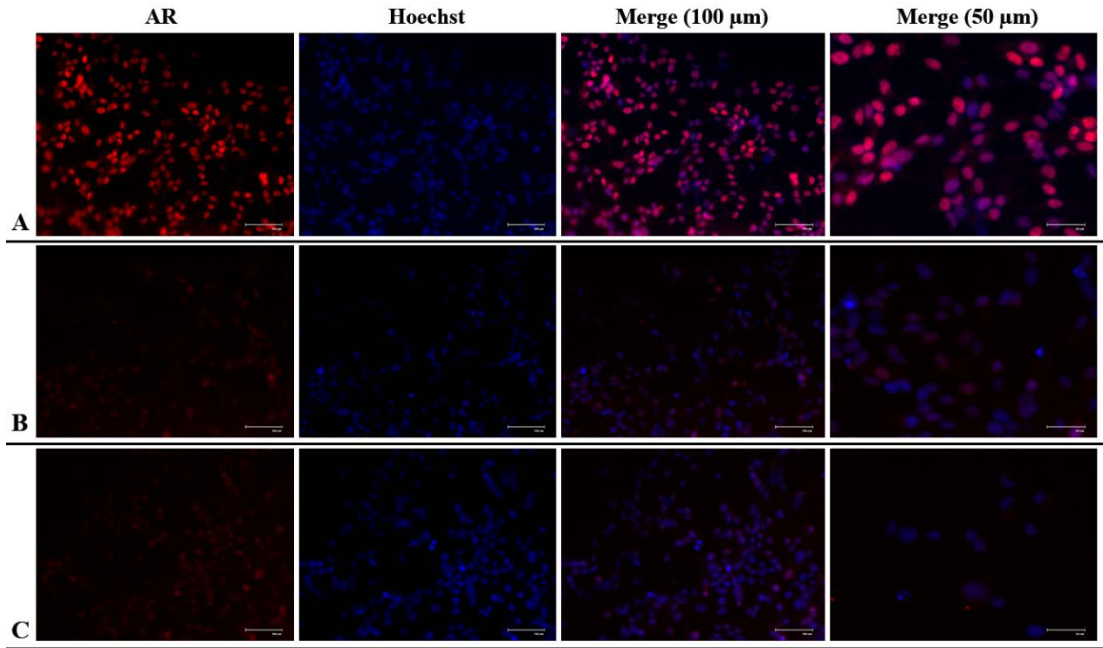
Şekil 224. Apigenin ve PEITC uygulanmış C4-2 hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



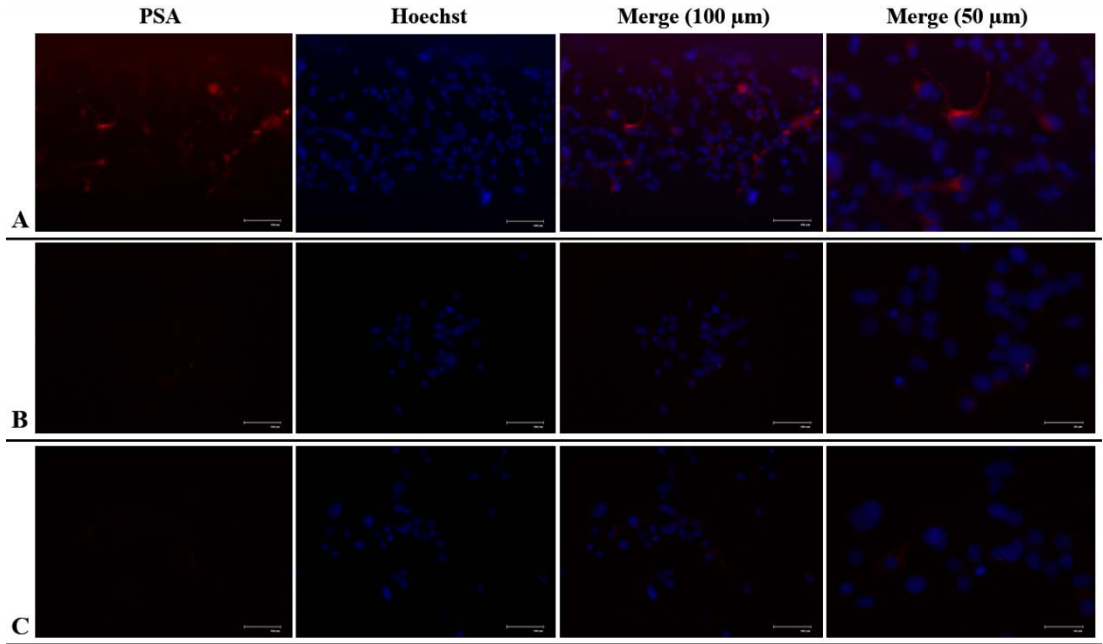
Şekil 225. Apigenin ve PEITC uygulanmış C4-2 hücre hattında p-NF-κB proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μM Apigenin (C) 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC



Şekil 226. Apigenin ve PEITC uygulanmış C4-2 hücre hattında Hif-α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μM Apigenin (C) 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC



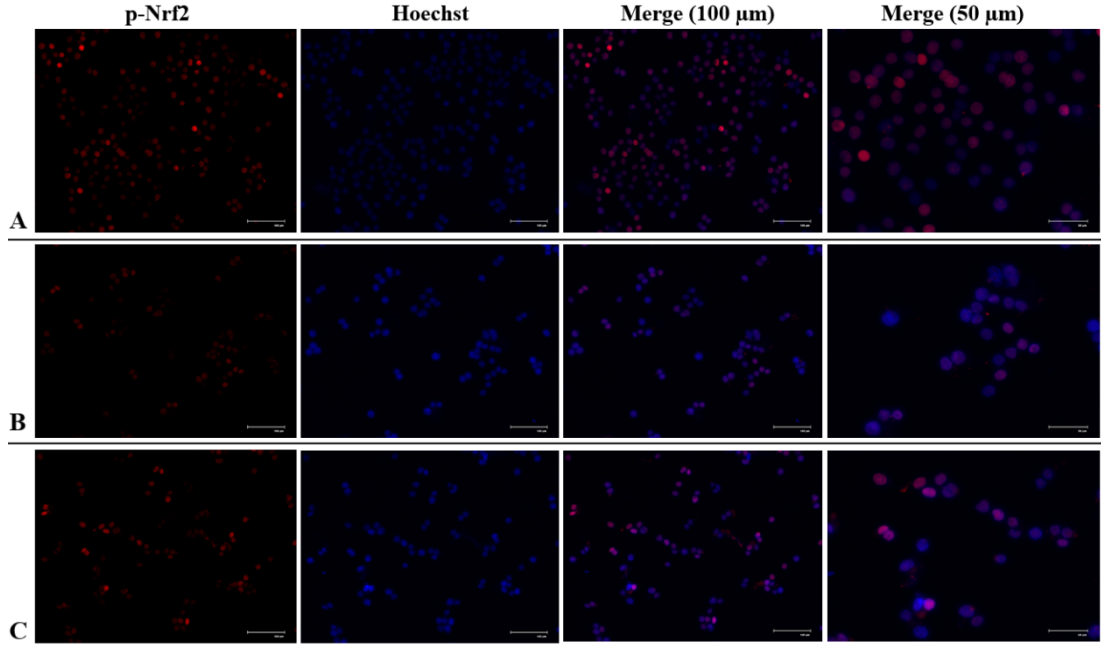
Şekil 227. Apigenin ve PEITC uygulanmış C4-2 hücre hattında AR proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



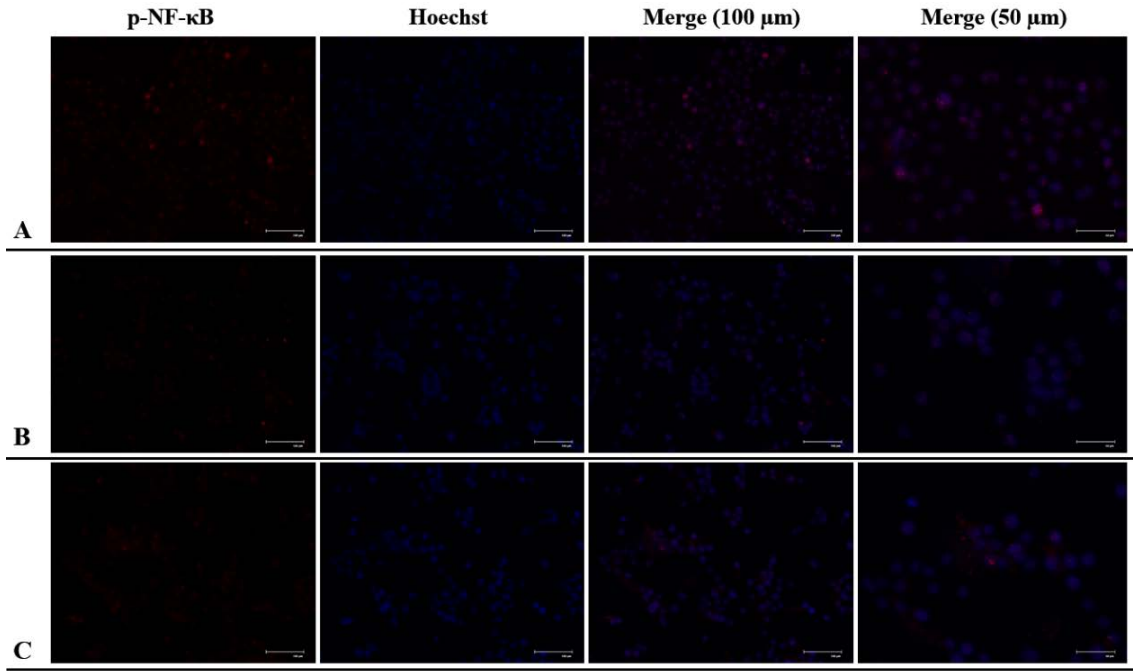
Şekil 228. Apigenin ve PEITC uygulanmış LNCaP-HPR hücre hattında PSA proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

4.11.2.4. Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattında immünfloresan analiz bulguları

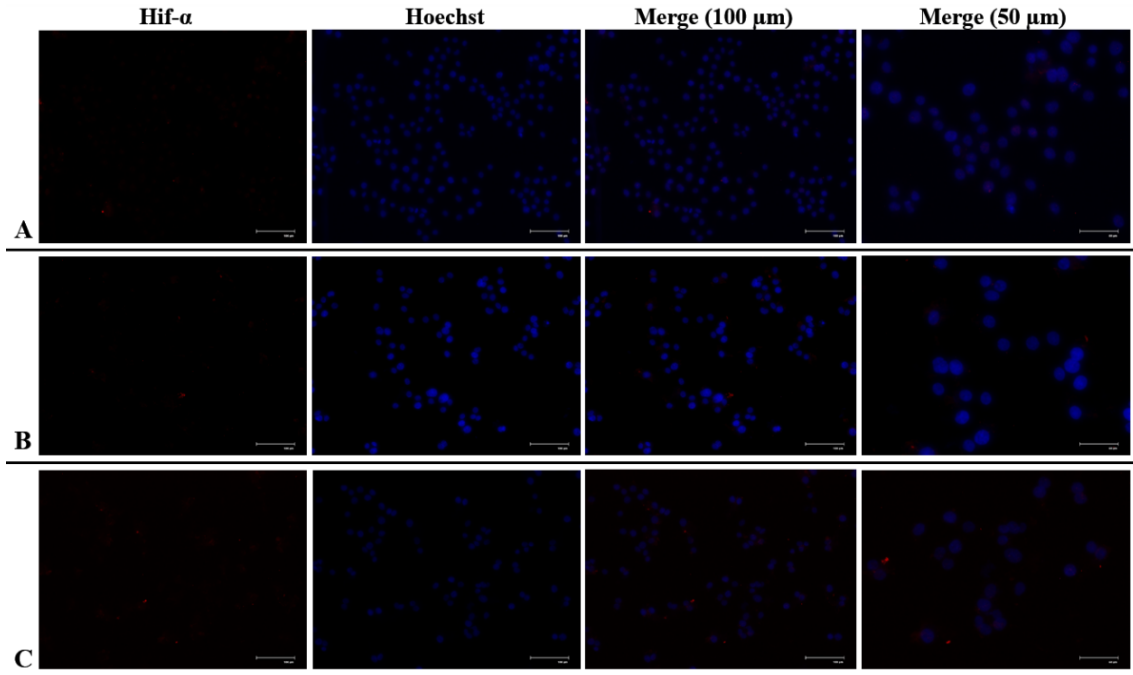
RWPE-1 hücre hattında 80 μ M Apigenin ve 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC doz gruplarının immünfloresan analiz bulguları değerlendirildiğinde belirgin olarak nükleusta lokalize olan p-Nrf2 proteininin nüklear ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma gösterdiği ve saptanan azalmanın Apigenin'in tek başına uygulandığı doz grubunda daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 229). p-NF- κ B proteininin RWPE-1 hücre hattında kontrol grubunda sitoplazmik ve nüklear lokalizasyonlarda eksprese olduğu; ancak doz gruplarında ve daha fazla olarak Apigenin'in tek başına uygulandığı doz grubunda belirgin şekilde nüklear lokalizasyondaki seviyesinin azaldığı belirlendi (Şekil 230). Son olarak RWPE-1 hücre hattında düşük düzeyde nükleusta eksprese edilen Hif- α proteininin nüklear lokalizasyonlarda daha da azalma gösterdiği gözlemlendi (Şekil 231). Apigenin ve PEITC kombinasyonunun RWPE-1 hücre hattındaki immünfloresan analiz verileri Western blot verileri ile uyumlu bulundu.



Şekil 229. Apigenin ve PEITC uygulanmış RWPE-1 hücre hattında p-Nrf2 proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 230. Apigenin ve PEITC uygulanmış RWPE-1 hücre hattında p-NF- κ B proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC



Şekil 231. Apigenin ve PEITC uygulanmış RWPE-1 hücre hattında Hif- α proteininin immünfloresan analizi (A) Kontrol (B) 80 μ M Apigenin (C) 80 μ M Apigenin + 5 μ M PEITC

Sonuç olarak tez bulguları birlikte değerlendirildiğinde seçici sitotoksik, apoptotik ve prooksidan etkileri Cabazitaxel'e göre daha yüksek olan, hücrelerde hem onkogenik redoks adaptasyon mekanizmasına hem de antioksidan savunma sistemi üzerine etki edebilen özellikleri bulunan iki ajan (Apigenin ve PEITC) birleştirilerek etkinliği arttırılmış, anti-androjenik etkileri ile de farklı direnç fenotiplerine sahip prostat kanseri hücrelerinde hedefleri ve kullanılabilirliği gösterilen bir *in vitro* kombin terapi modeli oluşturuldu.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Redoks adaptasyonu, kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden farklı olarak endojen oksidatif stres artışına karşı geliştirdiği, tümörojenik ROS seviyesinde kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan, hücre içi ve hücre dışı onkogenik faktörler ile ilişkisi bulunan ve böylelikle kanser progresyonuna katkı sunan bir kanser hücresi karakteristiğidir. Kanserleşme sürecinde süreklilik gösteren genomik düzensizlikler ve değişen metabolik hız nedeniyle kanser hücrelerinde endojen ROS seviyesi ve oksidatif stres artış göstermektedir. Bu sürece, başlıca kanser hücrelerinin fonksiyonel membran sistemlerindeki (mitokondri membranı, ER membranı ve plazma membranı) fonksiyon bozuklukları eşlik etmekte ve değişen enerji metabolizması nedeniyle artan elektron sızıntıları sonucu sağlıklı bir hücrede sitostatik düzeyde bulunan ROS düzeyi kanser hücrelerinde tümörojenik düzeye ulaşmaktadır (Rohrmann ve ark., 2013). Ancak artan ROS düzeyi ve oksidatif stres koşullarında kanser hücreleri yaşamsal süreçlerini devam ettirebilmek için pek çok iç faktörü yeniden düzenleyerek hem endojen oksidatif strese karşı redoks adaptasyonu geliştirmekte hem de oksidatif stres koşullarında yaşayabileceği dış ortamın düzenlenmesine, hipoksik koşulların devamlılığına ve inflamatuvar tümör uyarıcı çevrenin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Ghoneum ve ark., 2020; Kumari, Badana, Murali Mohan, Shailender & RamaRao, 2018). Birbiri ile yakından ilişkili olan bu süreçlerin tümü, kanser hücrelerinde invaziv ve metastatik potansiyelin artması, ROS-aracılı metabolik değişimlerin antikanser ilaçlara karşı duyarlılığı azaltması gibi kanser tedavilerini zorlaştıran progresif kazanımlara yol açmaktadır.

Artan ROS düzeyine karşılık kanser hücrelerinde redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin (Nrf2, NF- κ B ve Hif- α) aktifleşmesi ile gelişen redoks adaptasyonu, hastalığın progresyonunu ilgilendiren iç ve dış pek çok sürecin başlamasına ve devam etmesine önemli katkılar sağlayan bir mekanizma olmasına rağmen kanser hücrelerinin terapötik hedeflenebilirliği ile ilgili stratejik bir önem taşımaktadır (Kim, Kim & Seo, 2019). Normal hücrelerden farklı olarak kanser hücrelerinde redoks adaptasyonu sayesinde endojen ROS'un yüksek düzeyde korunuyor olması, kanser hücrelerini ROS'un toksik etkilerine karşı daha yakın hedef haline getirmektedir. Prooksidan kanser terapi başlığı altında toplanan bu tedavi stratejilerinde amaç

ROS'un tümör süpressör etkilerinden faydalanarak kanser hücresinde artmış olan tümörojenik ROS düzeyini, hücre yaşamına karşı tehdit oluşturacak toksik eşik düzeye ulaştırmak ve böylece kanser hücrelerinin daha seçici şekilde hedeflenebilmesini sağlamaktır (Ghoneum ve ark., 2020; Glasauer & Chandel, 2014; Kim ve ark., 2019; Trachootham ve ark., 2009).

Prooksidan kanser terapide (i): hücrede oksidasyon yeteneğine sahip moleküller kullanılarak direkt ROS artışı uyarılabilmekte ve/veya (ii) hücrel antioksidan savunma sistemi çeşitli ajanlar (Fenetil izotiyosiyanat, PEITC; buthionin sulfoksimin, BSO; imexon, sulforofan gibi) ile inhibe edilerek tümörojenik ROS düzeyi kanser hücresi için toksik hale getirilebilmektedir. Ancak son yıllarda literatürde iki yaklaşımın eş zamanlı olarak kullanıldığı, arttırılmış prooksidan etkilere sahip antikanser terapilerin daha etkin olduğu yönünde güncel bilgiler yer almaktadır (Firczuk ve ark., 2020). Bitkisel sekonder metabolitler, prooksidan etkilere sahip olan ve çeşitli kanser türlerinde tanımlanmış geniş antikanser etki mekanizmaları bulunan doğal bileşiklerdir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda ise bu bileşiklerin prooksidan etki mekanizmaları aydınlatılmaya başlanmıştır (Jeon ve ark., 2019; Li ve ark., 2021; Wang ve ark., 2021).

Apigenin bitkisel sekonder metabolitlerin flavonoid sınıfına ait sarı renkli bir pigment molekülüdür. Günümüze kadar Apigeninin otonom büyüme sinyallerini, programlı hücre ölümünü, invaziv ve metastatik karakteristikleri hedef alan antikanser etki mekanizmaları çeşitli kanser türlerinde aydınlatılmış olmasına rağmen ajanın prooksidan özelliklerinin redoks manipülasyonu temelli antikanser yaklaşımlarda kullanılabilirliğine ve bileşiğin bu kapsamdaki etkinliğine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır (Imran ve ark., 2020; Javed ve ark., 2021; Lee ve ark., 2019; Salmani ve ark., 2017; Yan ve ark., 2017).

Erkeklerde oldukça sık rastlanan PK'nin tedavisinde son on yılda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. ADT temelli tedavi protokollerine güncel ajanların dahil edilmesi, taksan bazlı kemoterapide Cabazitaxel gibi iyileştirilmiş ve geliştirilmiş taksan türevlerinin kullanımı, PARP inhibisyonu ile hedefe yönelik tedaviler gibi pek çok yeniliğin metastatik PK'li hastaların yaşam süresi üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak tüm bu gelişmelere rağmen hastalığın en ileri formu olan

mKDPK tedavisinde klinik başarı hala sınırlı kalmakta ve yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Gillesen ve ark., 2020; Rebello ve ark., 2021).

Mevcut tez çalışmasında Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile oluşturulan ve arttırılmış prooksidan etkileri öngörülen terapi modelinde, hücrelerde endojen ROS artışının Apigenin ile uyarılması ve eş zamanlı olarak PEITC'in bilinen prooksidan özelliği ile hücrel antioksidan savunma sisteminin azaltılması hedeflenerek redoks adaptasyonu açısından farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücre hatlarında terapi modelinin *in vitro* kullanılabilirliği ve hedefleri Cabazitaxel monoterapi etkinliği ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

PK hücre hatlarının oksidatif stres durumlarının hücrelerin agresivitesi ile ilişkisinin bildirildiği çalışma sonuçları temel alınarak mevcut tez çalışması kapsamında redoks adaptasyonu temelinde 4 farklı fenotipte hücre hattı kullanılmıştır (Kumar ve ark., 2008). Ek olarak araştırılan terapilerin AR sinyalizasyonundaki etkileri de incelendiğinden PK hücreleri AR (+) özellikte seçilmiştir. Hücre hatlarından ilki endojen ROS ve oksidatif stres düzeyi düşük olan benign karakteristikte RWPE-1 prostatik normal epitel hücre hattıdır. PK'nin daha az agresif formu için metastatik PK hücre hattı LNCaP, en agresif formu için ise mKDPK hücre hattı C4-2 kullanılmıştır. Tez çalışmasının kurgusu kapsamında metastatik PK hücre hattı LNCaP hücre hattının hidrojen peroksit dirençli formu geliştirilerek redoks adaptasyonuna sahip fenotipte metastatik PK hücre hattı elde edilmiştir. Böylece terapilerin hem redoks manipülasyonunu hedef alan etkileri hem de anti-androjenik etkileri farklı oksidatif direnç fenotiplerine sahip PK hücrelerinde değerlendirilmiştir.

LNCaP hücre hattında hidrojen peroksit direnci geliştirilmesi için literatürde yer alan iki farklı çalışmada kullanılan protokollere ek LNCaP hücre hattının büyüme ve bölünme özellikleri dikkate alınarak ortak noktaları da kapsayan bir protokol oluşturulmuştur (Onul ve ark., 2012; Thanan ve ark., 2015). Hücre türlerine bağlı değişimle birlikte literatürde hidrojen peroksitin kanser hücrelerinde 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde sitotoksik etki gösterdiği doz aralığının 50-500 μ M olduğu belirlenmiştir (Onul ve ark., 2012; Park, 2018). Tez çalışmasında LNCaP hücre hattında 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde hidrojen peroksit ile gerçekleştirilen sitotoksik analiz verilerinin sonuçları literatür ile uyumlu bulunmuş ve 50 μ M, 100 μ M ve 250 μ M hidrojen peroksitin 24 saatte LNCaP hücrelerinin canlılığını sırası ile

%72'ye, %52'ye ve %43'e azalttığı tespit edilmiştir. Hücrelerde 50 µM sabit hidrojen peroksit dozu ile direnç protokolünün takip edildiği 90 günlük süre sonunda ise 50 µM ve 100 µM hidrojen peroksit karşı LNCaP-HPR hücrelerinde sırası ile 1.74-kat ve 2.03-kat direnç geliştiği belirlenmiştir. Onul ve ark., (2012) A549 akciğer kanseri hücre hattında artan hidrojen peroksit dozları (33 µM- 2400 µM) ile 70 günlük süre sonunda parental hücrelerin %30 oranda canlı kalabildiği son doz olan 300 µM'da elde edilen en yüksek direnç katsayısını yaklaşık 3.0-kat; Thanan ve ark., (2015) ise MMNK1 *in vitro* kolanjiyokarsinogenez modelinde parental hücrelerin %75 oranında canlı olduğu 25 µM sabit hidrojen peroksit dozu ile 72 günlük süre sonunda canlılığın %35'e azaldığı doz olan 100 µM için elde edilen direnç katsayısını yaklaşık 2.1-kat olarak bildirmişlerdir. Hidrojen peroksitin çalışılan doz aralığındaki diğer konsantrasyonları için ise ilgili çalışmalarda belirlenen direnç katsayılarının 2.0-kat'ın altında olduğu görülmektedir. LNCaP hücre hattında 100 µM hidrojen peroksitin üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığı yaklaşık %40'a azaldığından ve 100 µM sabit dozda dahi LNCaP hücrelerinin toparlanma süresi çok uzun sürdüğünden ilgili süre periyotlarında bu dozda direnç elde edilememiş ve bu nedenle protokolün sonlanma noktasında hidrojen peroksit konsantrasyonu LNCaP için 100 µM olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, literatürdeki çalışmalar da dikkate alınarak direnç takip protokolünün sonlanma noktası olarak parental LNCaP hücre hattında 100 µM'a en az 2.0-kat direnç geliştiği süre dikkate alınmış ve parental LNCaP hücrelerinin canlılığını %72'ye azaltan 50 µM sabit hidrojen peroksit ile 90 gün boyunca takip edilen direnç protokolü sonunda, hücrelerin %50 oranda canlı kalabildiği 100 µM doza karşı 2.03-kat direnç geliştiği tespit edildikten sonra validasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

A549 akciğer kanseri hücre hattında geliştirilen hidrojen peroksit direnci sonrasında hücrelerde mtDNA kopya sayısında anlamlı azalmaya ek olarak dirençli hücrelerin daha anaerobik metabolik profile sahip olmasını sağlayan pek çok genin ekspresyon seviyesinde değişim olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda hidrojen peroksit dirençli A549 hücre hattının diğer ROS türlerine ve Doxorubicine karşı yanıtının daha az olduğu saptanmıştır (Onul ve ark., 2012). Hidrojen peroksit dirençli MMNK1 *in vitro* kolanjiyokarsinogenez modelinde ise dirençli hücrelerde *CAT*, *SOD* ve *DNMT1* genlerinin mRNA düzeylerinde ve *SOD* ile *CAT* enzim aktivitelerinde artış olduğu belirlenmiştir (Thanan ve ark., 2015). Mevcut veriler hidrojen peroksit

karşı gelişen hücre sel dirençte epigenetik değişimlerin ve ROS metabolizması ilişkili farklılıkların fazlaca rol oynadığını ortaya koymaktadır. Kanser hücrelerinde gelişen redoks adaptasyonunun ROS metabolizmasını yeniden düzenlediği bilindiğinden ve mevcut çalışmada redoks adaptasyonuna etkisi öngörülen terapiler üzerinde çalışıldığından LNCaP hücrelerinde geliştirilen hidrojen peroksit direncinin validasyonu, ilk kez redoks adaptasyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri ve endojen ROS düzeyi temelinde gerçekleştirilmiştir. Parental LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında 24 saatlik 50 µM ve 100 µM hidrojen peroksit uygulaması sonucu elde edilen sitotoksik ve apoptotik analiz sonuçları dirençli hücre hattında uygulama sonrasında canlılık inhibisyonu gerçekleşmediğini ortaya koymuştur (Şekil 44-45 ve Şekil 46-48). Ayrıca hücrelerin hidrojen peroksit uygulaması sonucu endojen ROS düzeylerinde de farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir. 100 µM hidrojen peroksit uygulanmış parental LNCaP hücre hattında ROS (+) hücre oranı %40 olarak saptanırken LNCaP-HPR hücre hattında bu oranın %17.8 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 49-50). Morfolojik ROS analizleri ile de 50 µM ve 100 µM hidrojen peroksit uygulaması sonucu parental LNCaP hücrelerinde biriken endojen hidrojen peroksit ve süperoksit düzeylerinin LNCaP-HPR hücre hattına göre daha fazla miktarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 52-55). Ek olarak ekzojen hidrojen peroksit uygulaması sonrasında hücre sel total GSH miktarında belirlenen değişimler incelendiğinde hidrojen peroksit uygulamasına rağmen LNCaP-HPR hücre hattında total GSH düzeyinin %88 oranında korunuyor olması hücrelerin gelişen direnç sonrası oksidatif stresten etkilenmediğini ortaya koymaktadır (Şekil 56).

Redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini (*Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α*) ve hedef antioksidan savunma sistemi ana enzimlerini kodlayan genlerin (*SOD*, *CAT* ve *GR*) mRNA düzeyindeki değişimler de LNCaP hücre hattında hidrojen peroksit direncinde rol alan redoks adaptasyon temelindeki gen ekspresyon farklılıklarına işaret etmektedir. 100 µM hidrojen peroksit uygulaması sonucu parental LNCaP hücrelerinde azaldığı saptanan *Nrf2*, *NF-κB* ve *GR* genlerinin mRNA düzeylerinde LNCaP-HPR hücre hattında anlamlı artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 57). Oksidize glutatyon (GSSG)'nin indirgenmiş glutatyon (GSH)'a dönüşümünü katalizleyen ve böylece hücre sel antioksidan havuzunun korunmasını sağlayan *GR* geninin mRNA düzeyinde belirlenen artış, LNCaP-HPR hücre hattında hidrojen peroksit uygulaması

sonrasında bile total GSH miktarının %88 oranında korunuyor olması ile uyumlu bulunmuştur (Ghoneum ve ark., 2020; Trachootham ve ark., 2009). Redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin nükleer ekspresyon seviyelerindeki değişimler karşılaştırıldığında ise özellikle 100 μ M hidrojen peroksit uygulaması sonucu parental LNCaP hücre hattında p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α proteinlerinin seviyelerinde sırası ile 5.26-kat, 4.4-kat ve 4.2-kat azalma; olduğu ancak LNCaP-HPR hücre hattında aynı proteinlerin seviyelerinin sırası ile 1.32-kat, 1.34-kat ve 2.20-kat anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Mevcut veriler ile LNCaP-HPR hücre hattında geliştirilen hidrojen peroksit direncinin, hücrede oksidatif strese karşı gelişen redoks direncini tetiklediği ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin hem mRNA hem de aktif protein düzeyinde artışı ile de kanserde redoks adaptasyonu ilişkili moleküler süreçlere katkı sağladığı görülmektedir. Redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinden Nrf2 ve NF- κ B'nin her iki hücre grubunda hidrojen peroksit uygulaması sonrasında mRNA ve protein düzeyinde aynı yönde (parental LNCaP hücrelerinde azalma; LNCaP-HPR hücrelerinde artma) regüle edildiği görülmektedir. Ancak 100 μ M hidrojen peroksit uygulaması sonrasında LNCaP-HPR hücre hattında Hif- α 'nın mRNA düzeyi ile zıt olarak nükleer protein seviyesinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu durumun Hif- α 'nın transkripsiyonel seviyede regülasyonunu sağlayan mekanizmalar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Kanser hücrelerinde gelişen redoks adaptasyonundan sorumlu bir faktör olarak Hif- α 'nın hücrede hipoksik olmayan koşullarda bile konstitütif eksprese edildiği ve protein stabilitesine ek olarak protein miktarının mRNA düzeyinde de kontrol edildiği belirtilmiştir (Görlach, 2009). Bu nedenle Hif- α mRNA düzeyinde artış olmamasına rağmen LNCaP-HPR hücrelerinde ekzojen ROS uygulaması sonucu protein seviyesinde saptanan 2.20-kat anlamlı artış, hücrelerde direnç kazanımıyla gelişen metabolik değişimlerin tetiklenebildiğine işaret etmektedir. Sonuç olarak, LNCaP-HPR hücre hattında ekzojen hidrojen peroksit uygulaması sonucu 90 gün sonunda gelişen direnç, hücrede redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin artışıyla birlikte oksidatif stres direncini tetikleyerek hücrelerin redoks adapte bir fenotip kazanmasını sağlamıştır. Böylelikle, PK için ilk kez redoks adaptasyonuna sahip bir *in vitro* metastatik kanser hücre hattı modeli (LNCaP-HPR) geliştirilmiştir. Bu hücre modeli, PK'nde redoks adaptasyonunun moleküler mekanizmalarının bir kısmının aydınlatılabildiği bir model olup, ileriki çalışmalarda redoks adaptasyon

mekanizmaları üzerinde daha geniş çalışmaların planlanabileceği potansiyel bir seçenek oluşturmaktadır ve PK için geliştirilecek tüm terapilerde redoks adaptasyonunun terapi yanıtına etkisi bu model üzerinde incelenebilecektir. LNCaP-HPR hücre hattı, mevcut tez çalışmasında ise hedeflenen prooksidan terapi etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla metastatik PK için redoks adaptasyonu kazandırılmış bir hücre fenotipi temsil etmektedir.

Hücrelerde Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile Cabazitaxel'in prooksidan etkilerinin değerlendirilebileceği uygun doz gruplarının ve zaman dilimlerinin seçimi amacıyla öncelikle her bir hücre hattında her bir ajanın tek başına uygulaması için literatürdeki çalışmalara bağlı olarak belirlenen doz aralığında ve sürelerde sitotoksik ve apoptotik analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda ilk olarak literatürdeki ilişkili çalışmalardan Cabazitaxel'in PK hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği doz aralığının 0.5-10 nM olduğu ve sitotoksisite testlerinin ilgili ilaç için 24., 48. ve 72. saat dilimlerinde gerçekleştirilmesi gerektiği belirlenmiştir (Hongo, Kosaka & Oya, 2018; Lange ve ark., 2017; Kosaka ve ark., 2017; Mukhtar, Adhami, Siddiqui, Verma & Mukhtar, 2016). Tez çalışması kapsamındaki hücre hatlarında Cabazitaxel'in sitotoksik ve apoptotik etkileri incelendiğinde ilacın 24 saatteki etkinliğinin LNCaP hücre hattı dışındaki PK hücrelerinde düşük olduğu görülmektedir. LNCaP hücre hattında 24 saatlik 5 ve 10 nM Cabazitaxel uygulaması sonrasında hücre canlılığının %52 ve %46'ya düştüğü ancak mKDPK ve redoks adapte LNCaP-HPR hücre hatlarında aynı dozlarda hücre canlılıklarının %70'in altına düşmediği saptanmıştır (Tablo 7). Literatürde yer alan çalışmalarda da Cabazitaxel'in metastatik PK hücre hattı LNCaP'da 24. saatte etkin olmasına rağmen KDPK hücre hatlarında 48. ve 72. saatlerde daha etkin olduğu bildirilmiştir (Mukhtar ve ark., 2016; Kosaka ve ark., 2017). Cabazitaxel'in 48 saatlik sitotoksik etkileri incelendiğinde ise son doz grupları için (5 nM ve 10 nM) LNCaP-HPR hücre hattı canlılığının sırası ile %63 ve %48'e; C4-2 hücre hattı canlılığının ise %48 ve %51'e azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 7). LNCaP hücre hattında 48 saatte Cabazitaxel dozuna bağlı hücre canlılığı ise sırasıyla %50 ve %30 olarak belirlenmiştir. Bu verilere ek olarak Cabazitaxel'in RWPE-1 prostatik normal epitel hücre hattındaki sitotoksik etkileri, ilacın kanser seçici toksik etkilerinin düşük olduğunu ortaya koymuştur. Cabazitaxel'in mKDPK C4-2 ve LNCaP-HPR hücre

hatlarında etkin olduğu en erken zaman dilimi olan 48. saatte RWPE-1 hücre hattı canlılığının en fazla %60 olduğu görülmektedir. Bu veriler, benzer şekilde ilacın prostatik normal epitel hücre hatları RWPE-1 ve RWPE-2'deki sitotoksik etkilerinin bulunduğunu gösteren çalışma verileri ile uyum göstermektedir (Sennoune, Nelius, Jarvis, Pruitt, Kottapalli & Filleur, 2020). Cabazitaxel'in 24 ve 48 saatlik sitotoksik analiz verileri tüm hücre hatlarında apoptik analiz verileri ile de uyumlu bulunmuştur. İlacın sitotoksik etki gösterdiği doz gruplarında ve zaman dilimlerinde gerçekleştirilen Annexin V analizleri ile, Cabazitaxel'in klasik taksan etki mekanizması gereği kanser hücrelerinde ve prostat normal epitel hücrelerinde sitotoksik etkisi ile uyumlu oranlarda apoptotik hücre ölümünü indüklediği belirlenmiştir (Şekil 74-85).

Cabazitaxel'in sitotoksik ve apoptotik analizlerinden elde edilen verilere bağlı olarak (i) 48 saatlik 10 nM dozda uygulanması sonucu LNCaP hücresinde canlılığın %30'a azaldığı saptandığından, (ii) prooksidan etkilerin değerlendirilebilmesi için canlı hücre oranının belli bir düzeyde kalması gerektiğinden, (iii) Cabazitaxel'in RWPE-1 prostatik epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri dikkate alındığından ve (iv) kanser hücreleri üzerinde seçici toksik etki gösterdiği dozlarda ve zaman diliminde prooksidan etkilerinin değerlendirilmesi gerektiğinden ilacın prooksidan etkilerinin değerlendirildiği en erken ve etkin zaman dilimi 48 saat olarak seçilmiştir.

Cabazitaxel'in sitotoksik ve apoptotik etkileri PK hücreleri arasında karşılaştırıldığında ilacın en yüksek etkinliğinin LNCaP hücre hattında ve en düşük etkinliğinin ise LNCaP-HPR ve C4-2 mKDPK hücre hatlarında bulunduğu belirlenmiştir. Burada parental LNCaP hücre hattından hidrojen peroksit direnci ile redoks adaptasyonu geliştirilen LNCaP-HPR hücre hattında Cabazitaxel'e karşı duyarlılığın azalmış olması dikkat çekici bir noktayı oluşturmaktadır. Redoks adapte LNCaP-HPR hücre hattının Cabazitaxel yanıtı, PK'nin agresif formunu yansıtan C4-2 KDPK hücre hattına benzerlik göstermektedir ve LNCaP-HPR hücre hattında ilaç yanıtının LNCaP hücre hattına göre daha az düzeyde olduğu saptanmıştır. Gerçekleştirilen güncel bir çalışmada Cabazitaxel dirençli 22Rv1 PK hücre hattında Nrf2 protein artışının Cabazitaxel direncine katkıda bulunabileceği ve dirençli hücrelerde Nrf2 inhibisyonu sağlandığında ilaca karşı duyarlılığın arttığı belirlenmiştir (Endo ve ark., 2021). Mevcut tez çalışmasındaki veriler ise ilk kez ilgili çalışmaya

kurğu açısından ters bir yaklaşımla oksidatif stres direnci geliştirilen PK hücre hattında Cabazitaxel yanıtının değiştiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak redoks adaptasyon mekanizmalarının kanser hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkili olduğu ve PK'nde de Cabazitaxel duyarlılığını değiştiren bir faktör olarak rol oynadığı açıktır.

Literatürde Apigeninin PK hücre hatlarında 10-100 μ M dozlarda sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (Pandey ve ark., 2012; Seo, Kim, Chun, Park, Kang & Kwon, 2011; Shukla & Gupta, 2004; Shukla & Gupta, 2008; Shukla ve ark., 2014). Tez çalışmasında elde edilen veriler ise Apigeninin 10 μ M'da belirgin bir toksik etkisinin bulunmadığını ortaya koyarken, bileşiğin 20-80 μ M doz aralığında PK hücreleri üzerinde anlamlı sitotoksik etki gösterdiğine işaret etmektedir. Apigeninin 24 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri incelediğinde son doz 80 μ M'da LNCaP hücre hattında canlılık %46 olarak tespit edilmesine rağmen LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında hücre canlılığının %50'nin altına düşmediği saptanmıştır. 48 saatlik 40 μ M ve 80 μ M doz gruplarında ise LNCaP hücrelerinde canlılık sırası ile %48 ve %36; LNCaP-HPR hücrelerinde %58 ve %49; C4-2 hücrelerinde %63 ve %50 olarak tespit edilmiştir. Ek olarak Apigeninin RWPE-1 prostatik epitel hücreleri üzerinde kanser hücre hatları ile kıyaslandığında daha az toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 8). Gerçekleştirilen apoptotik analiz sonuçları da sitotoksik analiz verileri ile orantılı olarak Apigeninin doza bağlı şekilde LNCaP hücrelerinde 24 saatte erken apoptotik ve 48 saatte geç apoptotik; C4-2 ve LNCaP-HPR hücre hatlarında ise her iki zaman diliminde de erken apoptotik etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 86-97). Apigeninin kanser hücreleri üzerindeki seçici sitotoksik ve apoptotik etkileri literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur (Imran ve ark., 2020; Maggioni, Garavello, Rigolio, Pignataro, Gaini & Nicolini, 2013; Salmani ve ark., 2017; Yan ve ark., 2017).

PEITC çeşitli kanserlerde antikanser etki mekanizmaları tanımlanmış olan, sitotoksik ve apoptotik etkilerine ek olarak GSH inhibe edici özelliği nedeni ile de prooksidan etkilere sahip olduğu bilinen doğal bir ITC türevidir (Chikara ve ark., 2018). Literatürde PEITC'in 5-15 μ M arasında 24 saatte PK hücre hatlarında seçici sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir (Yin, Kawamura, He, Vanaja & Young, 2009; Xiao ve ark., 2006; Xu ve ark., 2006). Tez çalışması kapsamında da PEITC'in tüm hücre hatlarında belirlenen 24 saatteki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin literatür

bulguları ile uyumlu olduğu, RWPE-1 hücre hattında sitotoksik etkisinin daha az bulunduğu ve özellikle 5 ve 10 µM doz gruplarında kanser hücrelerinde seçici sitotoksik ve apoptotik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Tablo 9). 5 ve 10 µM PEITC uygulaması sonucu doz sırasına bağlı olarak LNCaP hücre canlılığı %76 ve %56; LNCaP-HPR hücre canlılığı %77 ve %63; C4-2 hücre canlılığı %73 ve %57 olarak belirlenmiş ve RWPE-1 hücre canlılığı ise %88 ve %81 olarak tespit edilmiştir (Şekil 70-73). PEITC'in 24 saatte 10 µM'dan az dozlarda normal bronşiyal epitel hücreleri ve normal periferik kan mononükleer hücreleri üzerinde de anlamlı toksik etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (Dai ve ark., 2016; Hong ve ark., 2015). PEITC'in 24 saatlik apoptotik verileri ise, sitotoksik analiz sonuçları ile uyumlu olarak ajanın literatürde de belirtildiği üzere bileşiğin kanser hücrelerinde erken apoptoza yol açtığını ortaya koymuştur (Tang ve ark., 2011; Xiao ve ark., 2006; Xu ve ark., 2006; Şekil 98-102).

Cabazitaxel, Apigenin ve PEITC'in tek başlarına doza ve zamana bağlı sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirildikten sonra kombin uygulamanın uygun sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenebileceği doz gruplarının ve zaman diliminin saptanması amacıyla Apigeninin 20, 40 ve 80 µM dozları ve PEITC'in 5 ve 10 µM dozları seçilerek sitotoksik testleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre 20 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 20 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 40 µM Apigenin + 10 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 10 µM PEITC olmak üzere 6 farklı kombin doz grubu oluşturulmuş ve 6 farklı dozun ilk olarak 12 saatlik sitotoksik etkileri analiz edilmiştir. Sonuç olarak (i) 12 saatlik kombin dozların uygulanması sonucu LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında anlamlı sitotoksik etki saptanmadığından, (ii) kombin uygulamanın 48 saatlik sitotoksik etkisi hem LNCaP hem de RWPE-1 hücre hatlarında yüksek düzeyde olduğundan kombin doz gruplarının analizleri tüm hücre hatlarında 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Apigenin doz artışına bağlı olarak kombin uygulamanın sitotoksik etkilerinin arttığını göstermiştir (Şekil 103-106). PEITC'in 5 µM ve 10 µM uygulandığı kombin doz grupları arasında PK hücre hatlarında saptanan sitotoksik etkilerde belirgin bir fark olmadığı ancak RWPE-1 prostatik epitel hücre hattında canlılık oranlarının 5 µM PEITC içeren doz gruplarında daha yüksek düzeyde bulunması nedeni ile ilk üç kombin doz grubu (20 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 40

μM Apigenin + 5 μM PEITC, 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC) daha etkin bulunmuştur (Şekil 103-106). Kombin uygulamanın 24 saatlik sitotoksik analiz verilerine göre Apigenin doz artışına bağlı olarak uygulanan dozlar, LNCaP hücre canlılığını sırası ile %51, %45, %36'ya; LNCaP-HPR hücre canlılığını sırası ile %71, %65, %49'a; C4-2 hücre canlılığını sırası ile %68, %65, %50'ye düşürmüştür.

Kombin uygulamanın sitotoksik analiz verilerine göre Apigenin ve PEITC'in tek başlarına aynı zaman dilimindeki (24 saat) sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında kombin doz gruplarının özellikle PK hücre hatlarında daha fazla sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 12). Sitotoksik analiz verileri baz alınarak Apigenin ve PEITC'in farmakolojik etkileşimleri ile ilişkili CompuSyn programından elde edilen sonuçlar da iki ajan arasındaki etkileşimin sinerji yönünde olduğunu göstermektedir. Özellikle Apigeninin 3 farklı dozu (20 μM , 40 μM ve 80 μM) ile 5 μM PEITC'in kombin olarak uygulandığı doz grupları için CompuSyn programından elde edilen 1'den küçük CI değerleri, PK hücrelerinde Apigenin ve PEITC'in 3 farklı dozdaki kombin uygulamasının (20 μM Apigenin + 5 μM PEITC, 40 μM Apigenin + 5 μM PEITC, 80 μM Apigenin + 5 μM PEITC) sinerjistik sitotoksik etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir (Tablo 10, Tablo 11). DRI değerleri ile de desteklenen mevcut bulgular, 24 saatte ajanların PK hücre hatlarında tek başına neden oldukları sitotoksik etkilerinin, ajanlar ilgili dozlarda birlikte kullanıldıklarında artış gösterdiğine dikkat çekmektedir. Ek olarak RWPE-1 hücre hattı için CompuSyn programından elde edilen veriler, ilk üç kombin doz grubunun RWPE-1 hücre hattında antagonistik etkiye sahip olduğunu gösterdiğinden PK hücreleri üzerinde seçici etkileri sitotoksik, apoptotik analizler ve CI değerleri ile belirlenen bu doz gruplarının, antikanser bir strateji olarak prooksidan etkilerin değerlendirilmesi için uygun dozlar olduğu düşünülmüştür. İlgili doz gruplarının apoptotik etkileri analiz edildiğinde ise kombin doz gruplarının uygulanması sonucu Apigenin doz artışına bağlı total apoptotik hücre oranları LNCaP hücre hattında sırasıyla %46.5, %53.4 ve %52.3; LNCaP-HPR hücre hattında sırasıyla %28.1, %31.8 ve %48.2; C4-2 hücre hattında sırasıyla %30.2, %32.6 ve %47.4 ve RWPE-1 hücre hattında sırasıyla %7.6, %12.5 ve %13.3 olarak belirlenmiştir (Şekil 107-111). Böylelikle ajanların tek başlarına 24 saatlik etkileri ile karşılaştırıldığında kombin uygulamanın apoptotik etkinliği daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak doza ve zamana bağlı gerçekleştirilen tüm

sitotoksik ve apoptotik analizler ile, literatürde ilk kez Apigenin ve PEITC birlikte kullanılarak PK hücrelerinde ajanların seçici sitotoksik ve apoptotik etkilerinin arttırıldığı gösterilmiştir.

Redoks adapte fenotipi yansıtan LNCaP-HPR hücre hattında değişen Cabazitaxel yanıtına ek olarak Apigenin ve PEITC yanıtının da değiştiği belirlenmiştir. Bu kapsamda Apigenin ve PEITC yanıtının değişmesine neden olan moleküler mekanizmaların ayrıca araştırılması gerekmesine rağmen, LNCaP-HPR hücre hattında ekzojen oksidatif stres artışına karşı redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktif formlarında artış belirlenmesi hücrenin endojen oksidatif stres artışına neden olan ajanlara karşı da dirençli bir fenotip kazandığını düşündürmektedir. LNCaP hücre hattı ile karşılaştırıldığında 100 µM hidrojen peroksit uygulaması sonrasında LNCaP-HPR hücre hattında endojen oksidatif stres artışının daha az düzeyde olması, total GSH miktarında belirgin bir azalma tespit edilmemesi ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri Nrf2, NF-κB ve Hif-α'nın mRNA ve protein düzeylerinde artış saptanması LNCaP-HPR hücrelerinin ekzojen oksidatif stresten LNCaP hücreleri kadar etkilenmediğini göstermektedir. Bu nedenle oksidatif stres artışına yol açarak hücre ölümüne neden olduğu çeşitli kanserlerde belirlenmiş olan Apigenin ve PEITC'in tek başlarına ya da kombin olarak uygulandıkları tüm doz ve zaman dilimlerinde LNCaP-HPR hücreleri üzerindeki etkinliklerinin LNCaP hücresindeki etkinliklerinden daha düşük bulunduğu tespit edildiğinden mevcut durumun redoks adaptasyon mekanizmaları ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Bai ve ark., 2014; Choi ve ark., 2007; Gao ve ark., 2017; Gilardini Montani ve ark., 2019; Hong ve ark., 2015; Ju ve ark., 2016; Lv ve ark., 2020a, 2020b; Shendge ve ark., 2021; Shi ve ark., 2015; Sun ve ark., 2018; Suraweera ve ark., 2020; Tavsan & Kayali, 2019; Zhang ve ark., 2015).

Gerçekleştirilen sitotoksik ve apoptotik analizlerin sonuçlarına göre kanser hücrelerinde % hücre canlılıkları esas alınarak prooksidan etkileri karşılaştırılabilecek en uygun dozların Cabazitaxel için 5 ve 10 nM; kombin uygulama için ise 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC olduğu belirlenmiştir (Tablo 12). Böylece, Tablo 13'de gösterildiği üzere, tez çalışması kapsamında devam eden bütün analizler Cabazitaxel'in 48 saatlik 5 ve 10 nM dozlardaki etkinliği; PEITC'in 24 saatlik 5 µM etkinliği; Apigenin'in 24 saatlik 40 ve 80 µM etkinliği;

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun 24 saatlik 2 farklı kombinasyon doz grubundaki etkinliği (40 µM Apigenin + 5 µM PEITC, 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC) temel alınarak iletirilmiş ve Apigenin & PEITC kombinasyonunun 24 saatteki etkinliği aynı süre ve aynı dozlarda ajanların tek başlarına olan etkileriyle birlikte analiz edilebilmiştir. Ajanların uygulama süreleri içerisindeki prooksidan etkileri her bir hücre hattında belirlenen tüm doz gruplarında incelenirken Cabazitaxel ve Apigenin & PEITC uygulamalarının etkinlik açısından karşılaştırmaları her bir hücre hattı içerisinde benzer oranda hücre canlılığı inhibisyonuna yol açtığı belirlenen dozlar esas alınarak yapılmıştır (Tablo 13).

Bu kapsamda ilk olarak Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkileri her bir hücre hattında uygun olarak seçilen dozlar için (Tablo 13) Cabazitaxel etkinliği ile karşılaştırıldığında, LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında canlılık inhibisyonu ve apoptotik etki verilerine bağlı olarak Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre daha etkin olduğu belirlenmiştir. C4-2 hücre hattında ise Cabazitaxel'in apoptotik etkinliğinin daha yüksek olduğu saptanmasına rağmen ilacın seçici toksik etkisinin düşük olması ve RWPE-1 normal prostat epitel hücre hattında Apigenin ve PEITC kombinasyonuna göre daha fazla sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olması nedeni ile Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hem ajanların tek başlarına kullanımlarına göre hem de Cabazitaxel'e göre PK hücrelerinde apoptotik etki açısından avantajları olduğu düşünülmüştür.

Yarı sentetik bir mikrotübül inhibitörü olan Cabazitaxel hücre döngüsü sırasında mikrotübül stabilizasyonu sağlayarak döngünün G2/M evresinde durmasını tetiklemekte ve böylece kanser hücrelerinde iç apoptotik yolağı aktive etmektedir. Bu anlamda Cabazitaxel'in mikrotübül ilişkili etki mekanizması diğer taksan türevleri olan Paclitaxel ve Docetaxel'e benzerlik göstermektedir (Fitzpatrick & de Wit, 2014). Klasik taksan fonksiyonu gereği Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarında 48 saatlik uygulama sonrasında PK ve RWPE-1 prostatik epitel hücrelerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında doz artışına bağlı olarak G2/M fazındaki total hücre oranında anlamlı artışa neden olduğu belirlenmiştir. Apoptoz verileri ile uyumlu olarak Cabazitaxel uygulaması sonrası G2/M fazında biriken hücre oranı en fazla LNCaP hücre hattında saptanmıştır. LNCaP-HPR ve C4-2 hücrelerinde ise G2/M fazındaki hücre oranları, hücrelerin Cabazitaxel uygulanması sonucu elde edilen apoptotik

verileri ile uyumlu olarak 10 nM dozda yakın değerde bulunmuştur. RWPE-1 hücre hattında ise G2/M fazındaki hücre oranının %27.5'den 5 ve 10 nM Cabazitaxel doz artışına bağlı olarak sırasıyla %50.6'ya ve %54.6'ya artış göstermiş olması hücre döngüsü analizinde de ilacın seçici toksik etkisinin düşük olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 112-116).

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hücre döngüsü üzerine etkileri incelendiğinde ise 24 saatte 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının uygulanması sonrasında G2/M evresinde bulunan hücre oranının LNCaP hücre hattında %28.0'dan doz grubu sırasıyla %36.2'ye, %37.8'e, %44.9'a, %41.4'e ve %51.2'ye; LNCaP-HPR hücre hattında %28.4'den 5 µM PEITC hariç doz grubu sırasıyla %38.3'e, %42.1'e, %42.3'e ve %48.2'ye; C4-2 hücre hattında %32.1'den doz grubu sırasıyla %40.3'e, %42.6'ya, %46.7'ye, %44.6'ya ve %55.7 ve son olarak RWPE-1 hücre hattında %27.9'dan artan doz grubu sırasıyla %27.3'e, %26.0'a, %29.3'e, %32.1'e ve %32.8'e artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 117-124). Apigeninin PK'nde Rb defosforilasyonu, p53 stabilizasyonu, WAF1/p21 ve KIP1/p27 siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinde ekspresyon artışı gibi G0/G1 kontrol noktasında rol oynayan hedefler üzerine etkileri olduğu belirlenmiştir (Gupta ve ark., 2002; Shukla & Gupta, 2007). Ancak çalışılan hücre hatlarının özelliklerine ve doza bağımlı olarak Apigeninin hücre döngüsü üzerinde hem G0/G1 hem de G2/M kontrol noktalarında etkin olabildiği bildirilmiştir (Yan ve ark., 2017). DU145 mKDPK hücrelerinde (Zhu ve ark., 2015), T24 mesane kanseri hücre hattında (Zhu ve ark., 2013); çeşitli pankreatik kanser hücre hatlarında (Ujiki ve ark., 2006); SCC-25 oral hücreli sküamöz karsinoma hücrelerinde (Maggioni ve ark., 2013); A375 ve C8161 malign melanoma hücre hatlarında (Zhao ve ark., 2017) Apigeninin hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu gösterilmiştir. Mevcut tez çalışmasında da LNCaP, LNCaP-HPR ve C4-2 mKDPK hücre hatlarında Apigeninin tek başına 40 µM ve 80 µM dozlarda uygulanması sonrasında hücre döngüsünün G2/M evresinde anlamlı olarak inhibe edildiği belirlenmiştir. Mevcut etkiler, Apigeninin aynı dozlarda tek başına 24 saatlik apoptotik etkileri ile de uyumlu bulunmuştur.

PEITC'in ise DU145 mKDPK hücre hattında (Tang ve ark., 2011), Hep-2 laringeal sküamöz karsinoma hücrelerinde (Dai ve ark., 2016) ve K7M2 osteosarkoma

hücrelerinde (Lv ve ark., 2020b) hücre döngüsü üzerine etkilerinin G2/M evresinde bulunduğu rapor edilmiştir. Buna rağmen multiple myeloma ve glioblastoma hücrelerinde PEITC'in G0/G1 evresinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Chou ve ark., 2017; Jakubikova ve ark., 2011). Bu durum kanser hücrelerinin genomik farklılıklarından ve hücre döngüsü regülasyonu üzerinde etkili olan epigenetik değişimlerden kaynaklanabilmektedir. Uygulanan ilk doz grubu olan 5 µM PEITC, LNCaP ve C4-2 hücre hatlarında 24 saatte hücre döngüsünü anlamlı olarak G2/M fazında durdurmaktadır. Ancak LNCaP-HPR hücre hattında aynı sürede ve aynı dozda hücre döngüsünün G0/G1 evresinde durduğu belirlenmiştir. Redoks regülasyonunun hücre döngüsü üzerine etkileri araştırıldığında hücrede oksidatif stres artışı gerçekleştiğinde hücre döngüsünün farklı evrelerini regüle eden proteinlerde bulunan ve redoks değişimlerinden etkilenebilen özellikle sistein bakiyelerinin daha fazla sayıda G2/M fazını regüle eden proteinlerde bulunduğu görülmektedir (Foyer, Wilson & Wright, 2018). Bu nedenle, LNCaP-HPR hücrelerinde gelişen redoks adaptasyonunun hücre döngüsünün G2/M kontrolünde görev alan protein yapılarında gerçekleşen olası redoks bağlantılı modifikasyonlar sonucu fonksiyonlarında değişimler olabileceği ve böylece PEITC uygulaması sonrasında hücrenin apoptotik aktivasyonunu kontrol eden hücre döngüsü evresinin G0/G1 evresine kayabileceği ihtimalinin bu duruma yol açan olası nedenler arasında yer alabileceği düşünülmektedir. Buna rağmen LNCaP-HPR hücrelerinde değişen hücre döngüsü kontrolünün altında yatan moleküler farklılıkların detaylı şekilde araştırılması gerekmektedir.

Apigenin ve PEITC'in tek başına uygulandığı doz gruplarında (5 µM PEITC, 40 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin) RWPE-1 prostatik normal epitel hücre hattında sitotoksik ve apoptotik veriler ile de desteklendiği şekilde hücre döngüsü üzerindeki etkilerin de minimal düzeyde olması ajanların normal hücreler üzerinde toksik etkilerinin düşük düzeyde olduğunu göstermektedir.

Ajanların tek başlarına uygulandıkları doz grupları ile karşılaştırıldığında 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC kombin doz gruplarının PK hücre hatlarında hücre döngüsü üzerine etkilerinin daha fazla oranda olduğu belirlenmiştir. Belirgin olarak PK hücre hatlarında saptanan ve RWPE-1 prostatik epitel hücre hattında daha az düzeyde tespit edilen bu durum, ajanların

sinerjistik olduğu belirlenen sitotoksik ve apoptotik etkileri ve farmakolojik etkileşimleri ile uyumlu bulunmuştur. Sonuç olarak, Apigenin ve PEITC kombinasyonunda PK hücrelerinde hücre döngüsünün G2/M evresi üzerindeki inhibe edici etkileri daha fazla düzeye ulaşmaktadır.

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hücre döngüsü üzerine etkileri her bir hücre hattında uygun olarak seçilen dozlar için (Tablo 13) Cabazitaxel etkinliği ile karşılaştırıldığında LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında Cabazitaxel'in hücre döngüsünü G2/M evresinde az bir oran farkı ile daha etkin olarak durdurduğu, C4-2 hücre hattında ise her iki uygulama grubunun benzer etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Apoptotik etkisi ile uyumlu olarak Cabazitaxel'in RWPE-1 prostatik epitel hücre hattında Apigenin ve PEITC kombinasyonu ile karşılaştırıldığında daha fazla oranda hücre döngüsünün G2/M evresinde durmasına yol açtığı saptandığından ilacın seçici toksik etkisinin düşük düzeyde olduğu doğrulanmıştır. Bu nedenle, Apigenin ve PEITC kombinasyonu, hücre döngüsü üzerinde apoptotik etkileri ile uyumlu şekilde kanser hücrelerinde daha fazla etkin olmasından dolayı avantajlı bulunmuştur.

Apigenin & PEITC ve Cabazitaxel uygulanan PK hücrelerinde apoptotik etki öncesinde gerçekleşen oksidatif değişimlerin belirlenmesi için hücrelerde endojen oksidatif stres düzeyi, mitokondri membran potansiyeli değişimleri ve total GSH miktarındaki değişimler araştırılmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen optimizasyon deneyleri ile Cabazitaxel'in oksidatif etkinliğinin 24 saatte; Apigenin ve PEITC'in oksidatif etkinliğinin ise 12 saatte belirlenmesi gerektiği tespit edilmiştir. İlk olarak endojen oksidatif stres düzeyinin belirlenmesi için akış sitometrik ve floresan mikroskopik analizler kullanılarak muameleli hücrelerin hem endojen hidrojen peroksit düzeyleri hem de süperoksit düzeyleri analiz edildikten sonra tedavi süresi içerisinde mitokondriyal membran potansiyellerinde gerçekleşen değişimler akış sitometrik analiz ile ve total GSH miktarındaki değişimler ise ELISA bazlı yöntem ile incelenmiştir.

Cabazitaxel'in 5 ve 10 nM dozlarda oksidatif stres üzerine etkileri değerlendirildiğinde ROS-pozitif hücre oranının LNCaP hücre hattında %9.83'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %33.5'e ve %37.06'ya; LNCaP-HPR hücre hattında %13.05'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %23.06'ya ve %35.14'e; C4-2 hücre hattında %16.34'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %25.80'e ve %30.73'e ve

RWPE-1 hücre hattında %6.34'den doz artışına bağlı olarak sırası ile %21.70'e ve %25.15'e artış gösterdiği belirlenmiştir. Cabazitaxel'in tüm hücre hatlarında doz artışına bağlı olarak endojen oksidatif stres düzeyini arttırdığı görülmektedir. Literatürde Cabazitaxel'in PK hücrelerinde endojen ROS artışına etkilerini ve mekanizmalarını araştıran tek çalışmada Docetaxel dirençli mKDPK C4-2AT6 hücre hatlarında ilacın doz artışına bağlı olarak Docetaxel'e göre daha fazla oranda endojen ROS artışına neden olduğu belirlenmiştir (Kosaka ve ark., 2017). Mevcut tez çalışmasında elde edilen akış sitometrik ve floresan mikroskopik analiz verileri ile ise Cabazitaxel'in redoks adaptasyonu açısından farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücre hatlarında prooksidan etkileri ilk kez incelenmiştir. Akış sitometrik oksidatif stres verileri ile uyumlu olarak Şekil 130-133 ile Şekil 134-137'de de görüntülediği üzere LNCaP, LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında 24 saatlik 5 ve 10 nM dozlarda Cabazitaxel uygulamasının doz artışına bağlı şekilde sırası ile intrasellüler hidrojen peroksit ve süperoksit birikimlerine en belirgin olarak LNCaP hücre hattında neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 130 ve Şekil 134). LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında da doz artışına bağlı olarak endojen hidrojen peroksit ve süperoksit birikimlerinin tetiklendiği tespit edilmesine rağmen artışın LNCaP hücrelerindeki kadar belirgin olmadığı ancak LNCaP-HPR hücre hattında tetiklenen ROS artışının C4-2 hücre hattında saptanan düzeyden daha fazla olduğu saptanmıştır. Böylece Cabazitaxel'in prooksidan etkinliği PK hücreleri arasında en fazla LNCaP hücre hattında ve sonra sırası ile LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında belirlenmiştir. RWPE-1 hücre hattında ise özellikle 10 nM dozda hidrojen peroksit miktarında artış ve hücre morfolojisindeki belirgin bozulmalar Cabazitaxel'in normal hücreler üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkilerine ek olarak prooksidan etkilere de sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 133 ve Şekil 137). Ayrıca, hücrelerin doz uygulanmadan endojen hidrojen peroksit düzeyleri karşılaştırıldığında RWPE-1 ve LNCaP hücrelerinin en az düzeyde; LNCaP-HPR ve C4-2 hücrelerinin daha fazla düzeyde endojen hidrojen peroksitine sahip olduklarının gözlenmesi ve bu durumun akış sitometrik oksidatif stres analizi ile de uyum göstermesi tez çalışması kapsamında kullanılan hücrelerin malignite ilişkili agresif özelliklerine göre endojen oksidatif stres düzeylerinin farklı olduğunu ortaya koyan destekleyici bir bulgu niteliği taşımaktadır. Farklı agresif özelliklere sahip PK hücre hatları ve sağlıklı prostatik epitel hücreleri

endojen oksidatif stres düzeyleri açısından karşılaştırıldığında hücrelerin malignite ilişkili progresif özelliklerinin endojen ROS ve oksidatif stres artışı ile uyum gösterdiği tespit edilmiştir (Freitas ve ark., 2012; Kumar ve ark., 2008). Böylelikle endojen oksidatif stres düzeyinin LNCaP hücrelerine göre daha fazla olduğu belirlenen LNCaP-HPR hücre hattının, redoks adaptasyonunun gelişmesi sonrasında azalan Cabazitaxel, Apigenin ve PEITC yanıtlarına dayanarak malign agresivitesinin arttığı ve LNCaP-HPR hücre hattının hem endojen oksidatif stres düzeyine hem de değişen ilaç yanıtına dayanarak KDPK fenotipine yakın agresiflikte bir fenotipi temsil ettiği görülmüş ve tez çalışması ile Cabazitaxel'in farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücrelerinde endojen ROS artışını hücrelerin malignite ilişkili agresif özellikleri ile orantılı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle Cabazitaxel'in 48 saatte her bir hücre hattı için farklı oranlarda neden olduğu apoptotik etkiler, ilacın 24 saatteki prooksidan etkileri ile uyumlu bulunmuştur.

Cabazitaxel'in 24 saatlik oksidatif stres üzerine etkilerine ek olarak Cabazitaxel uygulanan hücrelerde belirlenen mitokondri membran potansiyeli değişimleri incelendiğinde depolarize mitokondriye sahip hücre oranının LNCaP hücre hattında %16.29'dan doz artışına bağlı sırası ile %57.7'ye ve %61.42'ye; LNCaP-HPR hücre hattında %18.14'den doz artışına bağlı sırası ile %39.9'a ve %45.39'a; C4-2 hücre hattında %34.06'dan doz artışına bağlı sırası ile %45'e ve %48.8'e ve RWPE-1 hücre hattında %6.28'den doz artışına bağlı sırası ile %17.27'ye ve %22.9'a yükseldiği saptanmıştır (Şekil 154-158). Stres koşullarında mitokondriyal dış membranda lokalize VDAC proteinlerinin yapısı bozulmakta ve mitokondriyal membran potansiyeli azalmaktadır. Bunun sonucunda ise mitokondri membran depolarizasyonu artış göstermektedir. Mitokondriyal membran depolarizasyonundaki artış mitokondri membranındaki iyon kanallarından mitokondri içerisinde fazla miktarda Ca^{+2} sızıntısına neden olmakta ve böylece dış mitokondriyal zardan sitokrom c, AIF ve SMAC/DIABLO gibi pro-apoptotik faktörlerin salınımı gerçekleşmektedir. Gelişen süreç mitokondriyal disfonksiyon sonucu hücre ölümü ile sonlanmaktadır (Galadari ve ark., 2017; Marchi ve ark., 2012; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). Dolayısıyla ROS aracılı gerçekleşen mitokondri membran potansiyelindeki değişimler, apoptotik aktivasyon gerçekleşmeden önce hücre sağlığının önemli bir beliteci olarak kabul edilmektedir. Cabazitaxel'in her bir hücre hattında neden olduğu

oksidatif stres artışı oranları ile uyumlu olarak PK hücre hatlarında ve RWPE-1 prostatik normal hücre hattında depolarize mitokondriye sahip hücre oranında artışa yol açtığı belirlenmiştir (Şekil 154-157). Mevcut veriler, 12 saatlik Cabazitaxel uygulaması sonrasında artan oksidatif stres düzeyinin eş zamanlı olarak mitokondri membran depolarizasyonunu arttırdığını ve ilacın doz artışına bağlı şekilde mitokondriyal disfonksiyon bağımlı olarak 48 saatte apoptotik ölümü uyardığını göstermektedir (Şekil 158). Cabazitaxel'in mitokondri sağlığı üzerine etkileri, hücrelerin endojen oksidatif stres düzeyleri ve malignite ilişkili agresif özellikleri ile uyumlu bulunarak, ilacın mitokondriyal etkinliğine bağlı olarak PK hücreleri LNCaP>LNCaP-HPR>C4-2 olarak sıralanmıştır. RWPE-1 hücre hattında ise ilacın neden olduğu oksidatif stres artışı mitokondri üzerindeki etkinliği ile orantılı olarak artış göstermektedir. Dolayısıyla tüm hücre hatlarında ilacın prooksidan etkinliği aynı zaman diliminde belirlenen mitokondriyal etkileri ile paralellik göstermektedir. LNCaP-HPR hücrelerinde LNCaP hücrelerinden farklı olarak Cabazitaxel uygulaması sonrasında mitokondriyal depolarizasyonun daha az oranda etkilenmiş olması da gelişen redoks adaptasyonunun hücrelerin prooksidan etkili ajanlara karşı duyarlılığını etkilediğine işaret etmektedir. Sonuç olarak, Cabazitaxel'in daha az agresif özelliğe sahip PK hücrelerinde daha yüksek; daha agresif PK hücrelerinde ise daha az düzeyde prooksidan etki ile ROS artışına neden olduğu ve mitokondriyal disfonksiyon aracılı apoptotik ölümü tetiklediği belirlenmiş; benzer etkilerin Cabazitaxel uygulanmış RWPE-1 prostatik normal epitel hücre hattında da görüldüğü ve ilacın mitokondri fonksiyonunu bozan prooksidan etkilerinin apoptotik etkinlik düzeyi ile orantılı olduğu tespit edilmiştir.

Cabazitaxel'in prooksidan etki gösterdiği zaman diliminde total GSH düzeylerindeki değişimler üzerine etkileri incelendiğinde ise kontrol grupları ile kıyaslandığında doz artışına bağlı olarak sırasıyla total GSH miktarının LNCaP hücre hattında %85.05'e ve %65.76'ya; LNCaP-HPR hücre hattında %89.67'ye ve %85.84'e; C4-2 hücre hattında %95.46'ya ve %90.12'ye; RWPE-1 hücre hattında %97.52'ye ve %95.89'a düşüş gösterdiği saptanmıştır (Şekil 167). Cabazitaxel'in Docetaxel dirençli C4-2AT6 hücrelerinde endojen ROS artışını uyardığı biliniyor olmasına rağmen ilacın hücresel antioksidan savunma sistemi ana molekülü olan GSH düzeyi üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Ancak gerçekleştirilen bir çalışmada

Docetaxel dirençli ve duyarlı hücre hatları arasında total GSH düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiş olması, taksan etkinliğinin GSH metabolizmasını ve düzeyini etkileyen faktörler üzerinden ilerlemediği yönünde bir öngörü oluşturmaktadır (Vrignaud ve ark., 2013). Bu kapsamda tez çalışmasından elde edilen veriler de, Cabazitaxel'in LNCaP hücreleri hariç diğer hücre hatlarında total GSH düzeyi üzerindeki etkilerinin düşük olduğunu ve Cabazitaxel uygulamasına rağmen hücrelerde en az %85 oranında total GSH seviyesinin korunduğunu göstermektedir. LNCaP hücrelerinde ise 10 nM Cabazitaxel uygulaması sonucu total GSH düzeyinin %65.7 olarak belirlenmesi, diğer hücrelerden farklı olarak aynı dozda LNCaP hücrelerinde total GSH düzeyinin taksan türevinin direkt etkilerinden bağımsız ve oksidatif stresin bu hücre hattında daha fazla düzeyde tetiklenmesine yanıt olarak düşüş gösterebileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla Cabazitaxel'in total GSH düzeyindeki etkileri özellikle daha agresif fenotipe sahip PK hücrelerinde düşük bulunduğundan ilacın prooksidan etkilerini antioksidan inhibisyonu yolu ile göstermediği, endojen ROS artışına yol açarak sergilediği sonucuna varılmıştır.

Apigenin, son yıllarda çeşitli kanser türlerinde ROS artışı aracılı apoptotik etkileri olduğu belirlenmiş bir flavonoid türü olmasına rağmen prostat kanserindeki prooksidan etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar oldukça sınırlıdır (Bai ve ark., 2014; Gilardini Montani ve ark., 2019; Lee ve ark., 2020; Masuelli ve ark., 2017; Shendge ve ark., 2021; Shi ve ark., 2015; Sun ve ark., 2018; Tavsan & Kayali, 2019; Zhang ve ark., 2015). İlişkili olabilecek kapsamda gerçekleştirilen tek çalışmada 22Rv1 PK hücre hattında ve *in vivo* 22Rv1 tümör modelinde Apigeninin neden olduğu ROS aracılı mitokondriyal hasarın p53 bağımlı apoptotik aktivasyon ile ilişkisi incelenmiştir (Shukla & Gupta, 2008). Potansiyel bir kemoterapötik ajan olarak PEITC'in ise kanser hücrelerindeki selektif sitotoksik etkilerinin ajanın prooksidan özellikleri ile ilişkisini doğrulayan araştırmalar bulunmaktadır (Hong ve ark., 2015; Hsia ve ark., 2018; Lv ve ark., 2020a). Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalar PEITC'in, GSH düzeyinde azalmaya neden olarak antioksidan savunma sistemini baskılama özelliğine sahip, seçici olarak kanser hücrelerinde etkin bir ajan olduğunu doğrulamaktadır (Zhang ve ark., 2008; Wang ve ark., 2017). Mevcut tez çalışması kapsamında oluşturulan kombin terapi modelinde PEITC'in GSH depleksiyonunu sağlayıcı etkileri bilindiğinden potansiyel olarak Apigeninin prooksidan etkilerini

arttırabileceği ve kanser spesifitesi yüksek olan bu doğal ITC türevinin kurgu kapsamında oluşturulan kombin model için ideal bir aday olabileceği öngörülmüştür.

Bu kapsamda ajanların tek başlarına ve kombin olarak PK ve RWPE-1 prostatik epitel hücrelerinde oksidatif stres düzeyi üzerine etkileri incelendiğinde 12 saatte 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının uygulanması sonrasında LNCaP hücre hattında ROS-pozitif hücre oranının %9.50'den doz sırasına bağlı olarak %17.58'e, %23.38'e, %39.17'ye, %34.34'e ve %41.71'e; LNCaP-HPR hücre hattında %11.84'den doz sırasına bağlı olarak %16.41'e, %15.91'e, %18.12'ye, %19.50'ye ve %24.28'e; C4-2 hücre hattında %21.77'den doz sırasına bağlı olarak %22.81'e, %25.74'e, %31.70'e, %29.45'e ve %36.42'ye; RWPE-1 hücre hattında ise %0.34'den doz sırasına bağlı olarak %0.74'e, %7.08'e, %10.15'e, %6.63'e ve %12.10'a artış göstermiştir. Analiz verileri, oksidatif stres artışının PK hücrelerinde ajanların kombin uygulandıkları doz gruplarında tek başlarına uygulandıkları doz gruplarına göre daha fazla oranda tetiklendiğini göstermiştir (Şekil 138-144 ve Şekil 139-145). Hücrelerde biriken hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerinin floresan mikroskopik analiz görüntüleri de akış sitometrik oksidatif stres analizi verileri ile uyumlu olarak özellikle kombin doz gruplarında hücrelerdeki endojen oksidatif stres düzeyinin daha fazla artış gösterdiğini doğrulamaktadır (Şekil 146-149 ve Şekil 150-153). Mevcut veriler Apigenin ve PEITC'in sinerjistik sitotoksik ve apoptotik etkilerine ek olarak endojen ROS artışı aracılı sinerjistik prooksidan etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca akış sitometrik oksidatif stres verileri ve özellikle endojen hidrojen peroksit düzeylerinin değerlendirildiği morfolojik analiz verilerinde belirgin olarak görüldüğü üzere PK hücrelerinin muamelesiz endojen oksidatif stres düzeyleri C4-2>LNCaP-HPR>LNCaP olarak sıralanmakta ve Apigenin & PEITC kombinasyonunun prooksidan etki düzeyinin hücrelerin başlangıç endojen oksidatif stres düzeyleri ile orantılı olarak artış gösterdiği, etkinin belirgin olarak endojen oksidatif stres düzeyi en az olan hücre hattı LNCaP'da ortaya çıktığı görülmektedir. Cabazitaxel'in prooksidan etkilerine benzerlik gösteren bu bulgu hücrelerde ROS-artışı aracılı sitotoksik etkili ajanlara karşı duyarlılığın hücrelerin direkt olarak endojen oksidatif stres düzeyleri ile ilişkili olduğunu göstermektedir. PK hücrelerinde Apigenin & PEITC ile Cabazitaxel'in ROS artışını tetikleyen prooksidan etkileri karşılaştırıldığında LNCaP

hücre hattında Apigenin ve PEITC kombinasyonunun daha etkin olduğu ancak özellikle son doz gruplarında (10 nM Cabazitaxel ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC) LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında Cabazitaxel'in ROS artışını çok az oranda fazla tetiklediği tespit edilmiştir. RWPE-1 hücre hattında akış sitometrik oksidatif stres verileri ve daha belirgin olarak hidrojen peroksit düzeyinin floresan mikroskopik analizleri ise, kanser hücreleri üzerinde Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre daha fazla seçici prooksidan etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Böylelikle, Apigenin ve PEITC birlikte kullanıldıklarında metastatik LNCaP hücre hattında Cabazitaxel'e göre etkinliği çok daha yüksek olan, redoks adaptasyonu geliştirilen LNCaP-HPR ve mKDPK C4-2 hücre hatlarında ise Cabazitaxel'e yakın etkinlikte olduğu tespit edilen, seçici prooksidan etkilere sahip olan ve PK'nde sinerjik etkileri bulunan bir kombin terapi modeli oluşturulduğu tespit edilmiştir.

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun mitokondri membran potansiyeli üzerine etkileri incelendiğinde ise 5 µM PEITC, 40 µM Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz gruplarının 12 saatlik uygulaması sonrasında LNCaP hücre hattında, depolarize mitokondriye sahip hücre oranının %13.02'den doz sırasına bağlı olarak %24.49'a, %46.93'e, %54.44'e, %56.8'e ve %63.2'ye; LNCaP-HPR hücre hattında %16.65'den doz sırasına bağlı olarak %27.65'e, %35.52'ye, %51.96'ya, %38.54'e ve %56.65'e; C4-2 hücre hattında %18.84'den doz sırasına bağlı olarak %33.6'ya, %58.02'ye, %58.85'e, %59.52'ye ve %60.61'e ve son olarak RWPE-1 hücre hattında %6.59'dan doz sırasına bağlı olarak %8.09'a, %10.11'e, %9.13'e, %10.83'e ve %7.28'e artış göstermiştir (Şekil 159-166). Mevcut veriler, ROS artışı verileri ile uyumlu olarak Apigenin ve PEITC'in birlikte kullanıldıkları doz gruplarında PK hücrelerinde mitokondri sağlığı üzerine daha etkili olduklarını ortaya koymaktadır. Apigeninin tek başına A375 ve A549 insan melanoma ve akciğer kanseri hücre hatlarında *in vitro* selektif sitotoksik etkilerini kanser hücrelerinde oksidatif fosforilasyon mekanizmasını ve mitokondriyal membran fonksiyonlarını bozarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Das ve ark., 2012). Benzer olarak, kanserli hepatositlerde Apigeninin sadece kanser hücrelerinde mitokondriyal hasara bağlı olarak selektif sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir (Seydi ve ark., 2016). Bir GSH inhibitörü olarak PEITC'in ise PK'ndeki prooksidan

etkilerinin mitokondriyal membran hasarı, oksidatif fosforilasyonun baskılanması ve ROS artışı aracılı gerçekleştiği bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2010). Mevcut tez çalışmasında ise direkt olarak oksidatif fosforilasyon mekanizması üzerinde etkileri bulunan iki ajanın kombin olarak uygulanması ile ajanların mitokondri disfonksiyonuna yol açan etkilerinin arttırıldığı görülmektedir (Şekil 159-164). Böylelikle antikanser bir ajan olarak Apigeninin PK'nde mitokondri sağlığı üzerine etkileri ilk kez belirlenmiş ve saptanan etkilerin PEITC ile kombin halde uygulanması durumunda farklı fenotiplere sahip PK hücrelerinde arttırılabildiği gösterilmiştir. Ayrıca redoks adaptasyonu ve malignite ilişkili agresif özellikler açısından farklı fenotipleri temsil eden PK hücre hatlarında hem Apigeninin hem de Apigenin & PEITC kombinasyonunun mitokondri membran potansiyelini prooksidan etkileri ile uyumlu olarak değiştirdiği saptanmıştır. Apigenin ve/veya Apigenin & PEITC uygulanmış hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimlerin hücrelerin endojen oksidatif stres düzeyleri ile orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu durum Apigenin ve/veya Apigenin & PEITC uygulanması sonucu PK hücrelerinde tetiklenebilen endojen ROS artışıyla eş zamanlı olarak mitokondri sağlığının da bozulduğunu göstermektedir. RWPE-1 prostatik epitel hücre hattında ise Apigeninin ve/veya Apigenin ve PEITC kombinasyonunun mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerinin PK hücrelerine göre çok daha düşük düzeyde olduğu ve doz gruplarında birbirine yakın oranlarda bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 165 ve Şekil 166). Bu durum, Apigenin ve PEITC uygulaması sonrasında RWPE-1 hücrelerinde PK hücrelerine göre daha düşük düzeyde tetiklenen endojen ROS artışıyla uyum göstermekte olup Apigenin ve Apigenin & PEITC kombinasyonunun sitotoksik ve apoptotik etkilerinin RWPE-1 hücre hattında minimal düzeyde olmasının altında yatan mekanizmalara ışık tutmakta ve böylelikle de hem Apigeninin hem de kombin terapi modelinin PK hücreleri hedefinde ROS aracılı seçici apoptotik etkilerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca, Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri karşılaştırıldığında kombin uygulamanın tüm PK hücre hatlarında seçici olarak daha fazla etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Apigenin ve PEITC'in prooksidan etkilerinin saptandığı zaman dilimi olan 12 saatte total GSH düzeylerindeki değişimler üzerine etkileri incelendiğinde 40 μ M

Apigenin, 80 µM Apigenin, 40 µM Apigenin + 5 µM PEITC ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubu sırası ile total GSH düzeyinin LNCaP hücre hattında %55.6'ya, %38.03'e, %43.25'e ve %35.08'e; LNCaP-HPR hücre hattında %58.74'e, %43.93'e, %53.25'e ve %41.41'e; C4-2 hücre hattında %62.85'e, %47.17'ye, %55.13'e ve %42.82'ye ve RWPE-1 hücre hattında %66.21, %62.17, %70.89 ve %76.42'ye düştüğü belirlenmiştir (Şekil 168-171). Literatürde Apigeninin prooksidan etkileri ile ilişkili olarak total GSH seviyeleri üzerindeki etkisi meme ve prostat kanserlerinde belirlenmiş ve bileşiğin sitotoksik etki gösterdiği 24 saatte 25 µM ve 50 µM dozlarda kanser hücre hatlarında %50'den fazla oranda total GSH seviyesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Kachadourian & Day, 2006; Korga-Plewko ve ark., 2020). Tez verileri ise, PK hücrelerinde hücrelerin endojen oksidatif stres düzeyleri ile ilişkili olarak (C4-2 ≥ LNCaP-HPR > LNCaP) Apigenin ve PEITC kombinasyonunun total GSH miktarını inhibe edici etkilerini, Apigeninin tek başına uygulandığı dozlara göre daha etkin olarak gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu durum, Apigeninin PK hücrelerinde GSH inhibisyonu üzerine olan etkilerini PEITC'in sinerjistik etki göstererek arttırdığına işaret etmektedir. Tek başına 5 µM PEITC'in ise PK hücrelerinde total GSH miktarı üzerine anlamlı bir etkisi saptanmazken aynı dozda RWPE-1 hücre hattında total GSH miktarının %118.57'ye arttığı tespit edilmiştir. PEITC, GST ve GPX4 enzimlerinin inhibisyonuna yol açarak hücrel GSH miktarında azalmaya neden olduğu bilinen bir antioksidan inhibitörüdür (Kumari, Dyba, Holland, Liang, Singh & Ji, 2016). PEITC'in K7M2 osteosarkoma hücrelerinde anlamlı sitotoksik etki gösterdiği 15 µM ve 30 µM dozlarda 24 saatlik uygulaması sonucu GPX4 protein düzeyini doza bağlı inhibe ettiği ve hücrel total GSH miktarında doza bağlı olarak sırasıyla %50 ve %80 oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Lv ve ark., 2020b). Ancak gerçekleştirilen başka bir çalışmada PA-1 ve SKOV-3 over kanseri hücrelerinde PEITC'in GSH inhibe edici etkisinin iki hücre hattında değişkenlik gösterdiği, PA-1 hücre hattında PEITC'in GSH düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi saptanmazken, SKOV-3 hücre hattında GSH düzeyini yaklaşık %45 oranında azalttığı, bu durumun iki hücre hattının p53 ilişkili genomik farklılıklarından ve p53'ün antioksidan mekanizmalar üzerine olan etkilerinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Hong ve ark., 2015). Mevcut tez çalışmasında ise PEITC'in tek başına 12 saatte PK hücrelerinde total GSH miktarı üzerine etki etmediği belirlenmesine rağmen RWPE-1

hücre hattında aynı zaman diliminde total GSH miktarında az oranda anlamlı bir artışa neden olduğu saptanmıştır. PEITC, PK hücrelerinde anlamlı sitotoksik etki gösterdiği 24 saatte RWPE-1 hücrelerinde minimal toksik etki gösterdiğinden ve kombin uygulamada Apigenin ile birlikte kullanılan PEITC dozunun (5 µM) 24 saatte PK hücreleri için neredeyse subsitotoksik etki gösteren bir konsantrasyon (Tablo 9) olmasından dolayı mevcut veriler, Apigenin ve PEITC kombinasyonunun prooksidan etkilerinin belirlendiği optimum zaman dilimi olan 12 saatte tek başına uygulandığında PEITC'in PK hücrelerinde GSH inhibisyonu sağlayamadığına işaret etmektedir. RWPE-1 hücrelerinde ise PEITC'in 12 saat gibi erken bir zaman diliminde öngörülen toksik etkilerinin çok daha düşük düzeyde olacağı tahmin edildiğinden ve ajanın doz ve süre bağımlı prooksidan etkilerinin düşük dozlarda ve kısa süreli uygulandığında özellikle sağlıklı hücrelerde antioksidan yöne kaydığı bildirildiğinden 5 µM PEITC'in 12 saatte prostatik epitel hücrelerinde total GSH miktarında artışa neden olduğu görülmektedir (Dayalan Naidu ve ark., 2018). Apigenin ve PEITC'in kombin uygulandığı doz gruplarında belirlenen total GSH miktarlarının (40 µM Apigenin + 5 µM PEITC'de %70.89 ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC'de %76.42), Apigeninin tek başına uygulandığı doz gruplarında belirlenen GSH miktarlarından daha yüksek düzeyde bulunması (40 µM'da %66.21 ve 80 µM'da %62.17) PEITC'in RWPE-1 hücre hattında Apigenin ile birlikte GSH inhibisyonu üzerine sinerjistik etkisinin bulunmadığını ortaya koymakta olup ajanın tek başına uygulandığında RWPE-1 hücre hattında öngörülen olası antioksidan etkilerini kombin doz gruplarında da sergilediğini düşündürmektedir. Ek olarak RWPE-1 hücre hattında Apigenin ve PEITC'in kombin uygulandığı doz gruplarından elde edilen oksidatif stres ve mitokondriyal membran potansiyeli verileri ajanların tek başlarına uygulandıkları doz gruplarındaki veriler ile karşılaştırıldığında da bulguların benzer yönde olduğu ve PEITC'in öngörülen doğrultudaki etkinliğini destekler nitelikte verilerin elde edildiği görülmektedir. Ajanın literatürde de belirtilen kanser spesifik etkilerine yol açan moleküler mekanizmaların daha detaylı araştırılması gerekmesine rağmen oksidatif stres, mitokondriyal membran potansiyeli ve total GSH düzeyi ile ilişkili olarak RWPE-1 hücre hattında elde edilen mevcut veriler, PEITC'in kanser seçici etkilerinin daha iyi anlaşılması için önem taşımaktadır.

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre total GSH miktarı üzerine etkileri karşılaştırıldığında kombin uygulamanın belirgin olarak daha fazla düzeyde total GSH miktarını inhibe edici etkilere sahip olduğu ve bu anlamda yüksek kanser seçiciliğinin bulunduğu belirlenmiştir.

Cabazitaxel ile Apigenin ve PEITC kombinasyonunun prooksidan etkilerinin ve PK spesifik etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için hücrelerde (i) kanserde redoks adaptasyonundan sorumlu redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini kodlayan *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* genlerinin, PK'nde etkili *AR* ve *PSA* genlerinin ve antioksidan savunma sistemi majör enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin mRNA düzeylerindeki değişimler; (ii) protein düzeyinde redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktif formları (p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α) ile *AR* ve *PSA*'nın ekspresyon seviyelerindeki ve subsellüler lokalizasyonlarındaki değişimler analiz edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında Cabazitaxel'in PK hücrelerinde ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri incelendiğinde, ilacın farklı fenotiplere sahip PK hücrelerinde gen ekspresyon düzeyini farklı katsayılarla aşağı ya da yukarı yönde regüle edebildiği görülmesine rağmen Cabazitaxel uygulanmış hücrelerde belirlenen gen ekspresyonlarındaki farklılıkların genel olarak düşük kat değişimlerinde olduğu ve anlamlı olduğu belirlenmesine rağmen kat değişimlerinin neredeyse tamamına yakınının 2.0'ın altında bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 172 ve 175). Cabazitaxel'in PK hücrelerinde ROS artışı ile karakterize prooksidan etkileri olduğu belirlenmiş olmasına rağmen redoks adaptasyonu üzerine etkileri henüz bilinmemektedir. Literatürde PK hücrelerinde ilacın oksidatif strese yol açan etki mekanizmalarının araştırıldığı tek çalışmada ise Cabazitaxel'in prooksidan etkilerinin mKDPK hücrelerinde stres ile indüklenen sestrin protein ailesine üye Sestrin-3 (*SESN3*) inhibisyonu aracılı gerçekleştiği rapor edilmiştir (Kosaka ve ark., 2017). Bu çalışmada PK hücrelerinde Cabazitaxel ile tetiklenen ROS artışına yol açan moleküler mekanizmaların araştırılması için Cabazitaxel'in KDPK hücrelerinde ROS detoksifikasyonundan sorumlu antioksidan enzimleri kodlayan *SOD2*, *CAT* ve *SESN3* genlerinin mRNA düzeyleri üzerine etkileri değerlendirilmiş ve Cabazitaxel uygulaması sonrasında *SOD2* ve *CAT* mRNA düzeylerinde anlamlı bir değişim saptanmazken, *SESN3* transkripsiyon seviyesinin Cabazitaxel dozuna bağlı ve anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Literatür bulguları ile uyumlu olarak mevcut veriler de

Cabazitaxel'in PK hücrelerinde ve RWPE-1 hücre hattında antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin transkripsiyon seviyeleri üzerine etkilerinin belirgin kat değişimlerinde olmadığını göstermiştir (Şekil 172 ve 175). Benzer olarak *Nrf2* ve *Hif- α* genlerinin mRNA düzeylerindeki değişimlerin de Cabazitaxel doz artışından bağımsız olarak ve hücre hatları arasında tutarsız şekilde çok düşük katlarda değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak özellikle 5 nM Cabazitaxel uygulaması sonrasında tüm hücre hatlarında *NF- κ B* seviyesinin farklı kat değişimlerinde ve LNCaP-HPR hücrelerinde ise 2.15-kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Cabazitaxel'in diğer redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin mRNA düzeyleri üzerinde saptanamayan bu etkisi ilacın *NF- κ B* aracılı etkilerinin prooksidan özelliklerinden bağımsız olarak proapoptotik özellikleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, Cabazitaxel'in LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında *AR* ve *PSA* genlerinin ekspresyon seviyelerinde düşük düzeyde de olsa anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 172 ve Şekil 173). Dolayısıyla PK hücrelerinde Cabazitaxel'in transkripsiyon düzeyinde düşük anti-androjenik etkilerinin bulunduğu; ancak ilacın redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri ve antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan genler üzerinde transkripsiyonel düzeyde inhibe edici etkilerinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Cabazitaxel'in protein seviyesinde etkileri incelendiğinde LNCaP ve LNCaP-HPR hücre hatlarında daha fazla kat değişimlerinde olmak üzere PK hücre hatlarının tümünde 5 nM ve 10 nM Cabazitaxel uygulanması sonucu p-Nrf2 proteininin nükleer ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalmalar olduğu belirlenmiştir (Şekil 180-187). İmmünfloresan analiz bulguları ile de desteklenen mevcut veriler Cabazitaxel uygulaması sonrasında *Nrf-2* geninin transkripsiyonel aktivasyonunda anlamlı bir değişim saptanmamasına rağmen proteinin aktif formu p-Nrf2'nin nükleer lokalizasyonlardaki ekspresyon seviyesinin PK hücre hatlarında düşüş gösterdiğine işaret etmektedir. Nükleer Nrf2 aktivitesini post-translasyonel düzeyde kontrol eden önemli mekanizmalardan biri Nrf2'nin Keap1 aracılı regülasyonunu bozan ve aktivasyonunu arttıran PKC aracılı fosforilasyonudur. Oksidatif stres koşullarında PKC tarafından Nrf2'nin Ser40 bakiyesinden fosforillenmesi proteininin sitoplazmada transaktivasyonuna yol açarak nükleusa geçini uyaran ve böylece protein aktivasyonunun post-translasyonel seviyede kontrolünü sağlayan önemli bir

mekanizmadır (Tonelli, Chio & Tuveson, 2018). Güncel bir çalışmada mKDPK hücrelerinde hem Cabazitaxel yanıtında ve hem de uzun dönemde gelişen Cabazitaxel direncinde rol oynayan mekanizmalar arasında PKC'yi de kapsayan çeşitli protein kinazların seviyelerindeki değişimlerin yer aldığı rapor edilmiştir. Direkt olarak ROS ile regüle edilebilen bu protein kinazlar da Cabazitaxel'e yanıt olarak KDPK hücrelerinde pek çok faktörün kontrolünü sağlayabilmektedir (Sennoune ve ark., 2020). Dolayısıyla Cabazitaxel uygulanması sonucu PK hücrelerinde p-Nrf2 nükleer ekspresyon seviyelerinde belirlenen düşüşün, Cabazitaxel'in prooksidan etkileri sonucu değişen PKC aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Benign özellikte RWPE-1 prostatik epitel hücrelerinde ise PK hücrelerinin aksine Cabazitaxel uygulanması sonrasında p-Nrf2 düzeyinde saptanan az düzeydeki artış ve redoks adaptasyon farkına rağmen Cabazitaxel uygulaması sonrasında LNCaP ve LNCaP-HPR hücreleri arasında p-Nrf2 inhibisyonu açısından bir farklılık belirlenmemiş olması Cabazitaxel'in malign hücrelerde p-Nrf2 düzeyi üzerine olan etkilerini PKC aracılı gerçekleştirdiği öngörüsüne destek oluşturmaktadır. Ek olarak Cabazitaxel'in mKDPK hücrelerinde ROS artışını SESN3 inhibisyonu aracılı uyardığı bilinmektedir (Kosaka ve ark., 2017). Sestrinler (SESN) oksidatif strese dirençten sorumlu bir protein ailesidir ve bu proteinlerin hücrel stres koşullarına yanıt olarak Nrf2-Keap1 ilişkisini bozarak Nrf2'yi aktive ettikleri bilinmektedir (Bae ve ark., 2013). Cabazitaxel'in PK hücrelerinde SESN3 üzerindeki ROS aracılı direkt etkisi, SESN-Nrf2 ilişkisi nedeniyle Nrf2 aktivasyonu üzerinde de dolaylı yoldan inhibe edici etkilerinin bulunabileceğini düşündürmektedir. Buna rağmen Cabazitaxel'in PK hücrelerinde total Nrf2 düzeyine etkisi, PKC aracılı etkileri ve Cabazitaxel'e yanıt olarak Nrf2-Keap1 ve SESN3 etkileşimindeki olası değişimlerin daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Cabazitaxel'in p-NF-κB ekspresyon seviyesi üzerine olan etkileri incelendiğinde ise ilacın LNCaP hücre hattında hem sitoplazmik hem de nükleer lokalizasyonlarda protein seviyesinde anlamlı azalmaya neden olduğu ancak daha agresif LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında p-NF-κB'nın özellikle nükleer lokalizasyondaki seviyesini arttırdığı ve RWPE-1 hücrelerinde ise p-NF-κB seviyesinde minimal değişime neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 180-187). Literatürde yer alan ve biri çalışma ekibimiz tarafından gerçekleştirilmiş olan iki çalışmada pankreatik kanser ve mKDPK hücrelerinde Cabazitaxel'e yanıt olarak NF-

κ B p65 aktivasyonunun arttığı ve aktivasyonun ilacın pro-apoptotik etkinliği ile paralellik gösterdiğini ortaya koyulmuştur (Guney Eskiler, Ozkan Deveci, Eryilmaz, Egeli & Cecener, 2021; Li ve ark., 2020). Tez çalışmasından elde edilen veriler de hem C4-2 mKDPK hücrelerinde hem de gelişen oksidatif stres direnci sonrasında kastrasyon direncine yakın bir fenotipi temsil eden LNCaP-HPR hücrelerinde Cabazitaxel uygulanması sonucu p-NF- κ B p65 düzeyinin arttığını ortaya koymaktadır. Bu hücre hatlarında p-NF- κ B p65 protein ekspresyon düzeyindeki değişimler Cabazitaxel'in *NF- κ B* mRNA düzeyinde artışa neden olduğunun belirlendiği gen ekspresyon verileri ile uyumlu bulunmuş, protein ekspresyon verileri her iki hücre hattında immünfloresan analiz bulguları ile de desteklenmiştir (Şekil 202 ve Şekil 207). Ancak Western Blot ve immünfloresan analiz verileri, daha az agresif olan LNCaP hücre hattında Cabazitaxel'in p-NF- κ B p65 üzerinde anlamlı baskılayıcı etkilerinin bulunduğunu göstermektedir (Şekil 180, Şekil 181, Şekil 197). Bu durum ileri evre kanserlerde Cabazitaxel etkinliğinin artırılması için NF- κ B inhibisyonunun bir terapötik hedef olabileceğine işaret etmektedir. İleri evre pankreas kanseri hücrelerinde de NF- κ B inhibitörü ile birlikte kullanıldığında Cabazitaxel'in apoptotik etkinliğinin arttığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2020). Cabazitaxel'in sitotoksik ve pro-apoptotik etkinliğinin LNCaP hücre hattında LNCaP-HPR ve C4-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında çok daha fazla düzeyde olması ilacın düşük agresif özelliklere sahip PK hücrelerinde p-NF- κ B p65'i inhibe edici etkilerinin bulunması nedeniyle bu hücrelerde daha yüksek oranda apoptotik etkinliğinin olabileceğine işaret etmektedir. Dolayısıyla elde edilen veriler ve literatür bulguları birlikte değerlendirildiğinde Cabazitaxel'in NF- κ B üzerindeki etkilerinin ilacın prooksidan aktivitesi dışında pro-apoptotik etkinliği ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

PK hücrelerinde redoks adaptasyonundan sorumlu Hif- α proteininin Cabazitaxel uygulaması sonucu ekspresyon değişimleri incelendiğinde ise tüm hücre hatlarında özellikle proteinin nüklear lokalizasyonlardaki ekspresyon seviyesinin yüksek kat değişimlerinde ve anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Şekil 180-187). İmmünfloresan analiz verileri de Cabazitaxel uygulanmış PK hücre hatlarında Hif- α 'nın her iki lokalizasyonda düşüş gösterdiğini doğrulamaktadır (Şekil 198, Şekil 203 ve Şekil 208). Literatürde Cabazitaxel'in prooksidan aktivitesinin olası bir hedefi olarak redoks duyarlı transkripsiyon faktörü Hif- α düzeyi üzerindeki etkileri henüz

araştırılmamıştır. Mevcut tez çalışmasından elde edilen veriler, Cabazitaxel'in transkripsiyonel düzeyde Hif- α üzerinde bir etkisi bulunmadığını ancak protein düzeyinde Hif- α miktarını özellikle LNCaP ve LNCaP-HPR hücrelerinde azalttığını göstermektedir. Hif- α protein düzeyi ve stabilitesinin post-transkripsiyonel düzeyde kontrol edildiği bilinmektedir (Görlach, 2009). Bu nedenle transkripsiyonel düzeyde olmasa da Cabazitaxel uygulaması sonucu protein seviyesinde tüm hücre hatlarında saptanan Hif- α düzeyindeki azalma, hücrelerin endojen oksidatif stres düzeyleri ile orantılı olarak değiştiğinden ve en az etki RWPE-1 prostatik epitel hücre hattında saptandığından Cabazitaxel'in Hif- α üzerindeki inhibe edici etkilerinin ilacın PK hücrelerindeki prooksidan etkileri ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak protein düzeyindeki analizler ile Cabazitaxel'in PK hücrelerinde ortak olarak prooksidan etkilerinin p-Nrf2 ve Hif- α inhibisyonu aracılı olabileceği belirlenmiştir. Ancak ilacın prooksidan etkilerinin tespit edildiği zaman diliminde yalnızca LNCaP hücrelerinin total GSH düzeyinde inhibisyona yol açması, LNCaP hücrelerinde oksidatif stres artışını daha fazla uyarması ve daha az agresif özelliğe sahip bu hücre hattında redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin tümünde (p-Nrf2, p-NF- κ B ve Hif- α) anlamlı düşüşe neden olması düşük endojen ROS düzeyine sahip LNCaP hücre hattında Cabazitaxel'in prooksidan etkilerini daha belirgin olarak sergilediğine işaret etmektedir.

İlacın PK hücrelerinde AR ve PSA aksisindeki etkileri değerlendirildiğinde ise tez çalışması kapsamında AR ve PSA'da belirlenen mRNA düzeyindeki aşağı yönde regülasyona ek olarak literatür verileri ile de uyumlu şekilde Cabazitaxel'in AR ve PSA düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ancak literatürde Cabazitaxel'in AR sinyalizasyonu üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların sonuçları diğer taksan türevlerinden farklı olarak ilacın AR aksisindeki etkinliğinin düşük olduğunu ve taksanlar içerisindeki üstün etkinliğinin AR-bağımsız mekanizmalar ile sağlandığını ortaya koymaktadır (van Soest ve ark., 2015). Cabazitaxel'in metastatik hormona duyarlı AR pozitif PK hücre hattı LNCaP'da AR ve AR-ilişkili ısı şok faktörleri HSP90 α , HSP40 ve HSP70/HSP90'nın ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, mevcut anti-androjenik etki ileri evre tümörlerde Docetaxel ile karşılaştırıldığında daha düşük düzeyde bulunmuştur (Rottach ve ark., 2019; van Soest ve ark., 2015). Tez çalışması

kapsamında da Cabazitaxel'in özellikle düşük agresiflikteki LNCaP PK hücre hattında nükleer AR ekspresyonunu ve sitoplazmik PSA protein düzeyini belirgin olarak azalttığı ancak mevcut anti-androjenik etkisinin LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 199-200; Şekil 204-205 ve Şekil 209-210). C4-2 hücre hattının immünfloresan analiz bulguları Cabazitaxel uygulaması sonucu AR'nin nükleer lokalizasyondaki ekspresyon seviyesinin belirgin olarak azalmadığını ortaya koymaktadır (Şekil 209). İmmünfloresan bulguları ile de desteklenen mevcut veriler, Cabazitaxel'in PK'nde AR ve PSA aksisinde baskılayıcı etkilerinin bulunduğunu ancak özellikle mKDPK hücrelerinde ilacın bu yönde düşük etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini kodlayan *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* genlerinin ekspresyon seviyesi üzerine etkileri değerlendirildiğinde ise PEITC'in tek başına gen ekspresyonu regülasyonu üzerine etkilerinin bulunmadığı ancak PK hücrelerinde Apigeninin mevcut etkilerini aynı yönde arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 176-179). Gen ekspresyon seviyelerinde en yüksek kat değişimlerinin belirlendiği 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grupları karşılaştırıldığında PK hücrelerinde *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* genlerinin mRNA düzeylerinin kombin doz grubunda anlamlı olarak daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Apigeninin tek başına uygulandığı 80 µM doz grubu için *Nrf2* geninin transkripsiyon seviyesinde LNCaP hücre hattında 10.95-kat; LNCaP-HPR hücre hattında 8.63-kat ve C4-2 hücre hattında 2.22-kat anlamlı düşüş olduğu belirlenmiştir. 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubunda ise *Nrf2* mRNA düzeyinin aynı hücre hattı sırasıyla 18.94-kat, 13.45-kat ve 2.40-kat anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 176-178). Benzer şekilde *NF-κB* geninin ekspresyon düzeyinde 80 µM doz grubu için LNCaP hücre hattında 3.47-kat; LNCaP-HPR hücre hattında 2.69-kat ve C4-2 hücre hattında 1.34-kat azalma saptanmış; kombin doz grubu için ise azalma yönündeki kat değişimlerinin aynı hücre hattı sırasıyla 5.84-kat, 3.52-kat ve 1.61-kat olduğu belirlenmiştir (Şekil 176-178). Apigenin ve PEITC uygulanması sonucu *Hif-α* transkripsiyonunun da PK hücre hatlarında daha düşük kat değişimlerine rağmen azalma yönünde regüle edildiği tespit edilmiştir (Şekil 176-178). Gen ekspresyon verilerine göre tüm hücre hatlarında *SOD*, *CAT* ve *GR* genlerinin ekspresyon seviyelerinde belirlenen azalma yönündeki değişimlerin de en fazla ve en

anlamli olarak 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC kombin doz grubunda olduğu görülmektedir (ekil 176-179). Apigenin ve PEITC uygulanan RWPE-1 hücrelerindeki gen ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde ise 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC uygulanan doz gruplarında sağlıklı prostatik epitel hücrelerde de *Nrf2*, *NF-κB* ve *Hif-α* gen ekspresyonlarının anlamli olarak ve yüksek kat değişimlerinde (sirası ile 21.76-kat, 5.15-kat ve 8.26-kat) aşağı yönde regüle edildiği belirlenmesine rağmen gen ekspresyonlarında saptanan azalmanın Apigeninin 80 µM'da tek başına uygulandığı doz grubunda kombin doz grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Mevcut sonuçlar Apigeninin tek başına ve/veya PEITC ile kombin olarak uygulanması sonucu PK hücrelerine ek olarak benign özellikteki RWPE-1 hücrelerinde de redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri ile antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan genlerin mRNA düzeyinde anlamli düşüşe neden olduğunu ortaya koymaktadır.

Gen ekspresyon verilerine ek olarak Apigenin & PEITC kombinasyonunun redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri üzerindeki protein düzeyinde etkileri de mevcut durumu doğrular niteliktedir. Apigenin ve PEITC'in PK hücrelerinde nüklear p-Nrf2 düzeyini anlamli olarak baskıladığı belirlenmiştir (ekil 188-193). Nüklear p-Nrf2 düzeyinde 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubu sırasına bağlı olarak LNCaP hücre hattında sırasıyla 4.2-kat ve 6.4-kat; LNCaP-HPR hücre hattında 4.9-kat ve 5.7-kat; C4-2 hücre hattında ise 2.3-kat ve 3.07-kat anlamli azalmalar olduğu saptanmıştır. İmmün floresan analiz bulguları ile de desteklenen nüklear p-Nrf2 seviyesindeki değişimler, Apigeninin Nrf2 üzerinde belirgin olarak inhibe edici etkilerinin olduğunu ve PK hücrelerinde PEITC ile birlikte uygulandığında bileşiğin Nrf2 inhibisyonu üzerindeki etkilerinin arttığını göstermektedir (ekil 214, ekil 219, ekil 224). Benzer Şekilde veriler, p-NF-κB düzeyinde de 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubu sırasına bağlı olarak LNCaP hücre hattında sırasıyla 6.3-kat ve 7.7-kat; LNCaP-HPR hücre hattında 3.4-kat ve 5.5-kat; C4-2 hücre hattında ise 1.28-kat ve 1.72-kat azalma olduğunu göstermiştir (ekil 188-193). NF-κB proteininin PK hücrelerindeki immün floresan analiz bulguları da doz grubu sırasına bağlı olarak protein seviyesinin hem sitoplazmik hem de nüklear lokalizasyonlarda azaldığını göstermektedir (ekil 215, ekil 220, ekil 225). Apigenin ve PEITC'in Hif-α düzeyi üzerine etkileri

incelendiğinde ise 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubu sırasına bağlı olarak Hif-α ekspresyon düzeyinin LNCaP hücre hattında sırasıyla 3.5-kat ve 3.2-kat; LNCaP-HPR hücre hattında 3.5-kat ve 3.6-kat; C4-2 hücre hattında ise 1.58-kat ve 3.15-kat anlamlı düşüş gösterdiği görülmektedir (Şekil 188-193). PK hücrelerinde immünfloresan analiz bulgularında da Hif-α düzeyinin doz gruplarında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 216, Şekil 221, Şekil 226). PK hücrelerindeki etkilerine ek olarak Apigenin ve PEITC'in RWPE-1 prostatik epitel hücrelerinde de p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α ekspresyon düzeylerini azalttığı tespit edilmiş ve RWPE-1 hücrelerinde 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubu sırasına bağlı olarak p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α düzeylerinde sırasıyla 2.0-kat ve 1.72-kat; 2.26-kat ve 2.07-kat; 1.81-kat ve 1.85-kat azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 194 ve Şekil 195). RWPE-1 hücrelerinde redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin tümünde belirlenen ve immünfloresan analiz bulguları ile de desteklenen inhibisyonların PK hücrelerine göre daha düşük kat değişimlerinde ve 80 µM Apigeninin tek başına uygulandığı doz grubunda daha yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (Şekil 229-231).

Apigeninin yüksek konsantrasyonlarda (50 µM ve 100 µM) uygulandığında prooksidan etkileri uyumlu olarak HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hattında Nrf2'yi inhibe ettiği, CAT ve GPX aktivitesini baskıladığı ve hücrel GSH düzeyini azalttığı bildirilmiştir (Suraweera ve ark., 2020; Valdameri ve ark., 2011). Ek olarak Doxorubicin-dirençli BEL-7402/ADM ve HepG2 hepatoma hücre hatlarında Apigeninin Nrf2'yi mRNA düzeyinde inhibe ettiği, Nrf2 hedefli faz II detoksifikasyon proteinlerini de hem mRNA hem de protein düzeyinde baskıladığı ve Doxorubicin etkinliğini arttırdığı belirlenmiş olup intraperitoneal Apigenin uygulanan *in vivo* hepatosellüler karsinoma tümör modelinde de Apigeninin BEL-7402 tümör boyutunu azaltıcı etkileri Nrf2 inhibe edici etkileri ile uyumlu bulunmuştur (Gao ve ark., 2017). Diğer taraftan Apigeninin PK hücrelerinde anjiyogenezi baskılama özelliğine sahip bir bileşik olduğu, bu kapsamdaki etkilerini Hif-α ve VEGF proteinlerini baskılayarak gösterdiği bildirilmiş ve bileşiğin bu proteinlerin inhibisyonu aracılı anti-anjiyogenez mekanizmaları iyi tanımlanmıştır (Fang, Xia, Cao, Zheng, Reed & Jiang, 2005; Fang ve ark., 2007; Mirzoeva, Kim, Chiu, Franzen, Bergan & Pelling, 2008). Ek olarak Apigeninin çeşitli kanser hücrelerinde NF-κB p65 sinyalizasyonunu da içeren çeşitli

onkogenik yollar üzerinde inhibe edici etkileri bulunan bir flavonoid türü olduğu bildirilmiştir (Yan ve ark., 2017).

PEITC ise pek çok kanser türünde antikanser etki mekanizmaları aydınlatılmış bulunan bir ITC türüdür (Wang & Bao, 2021). Gerçekleştirilen çalışmalarda PEITC'in Hif- α , MMP ve VEGF üzerindeki inhibe edici etkileri ile anjiyogenezi baskıladı; NF- κ B, STAT3 ve STAT1 inhibisyonu aracılı inflamasyonu düzenlediği gösterilmiştir (Aras ve ark., 2013; Gupta ve ark., 2014; Khor ve ark., 2008; Lai ve ark., 2010; Malavolta ve ark., 2018; Mastuo ve ark., 2020; NavaneethaKrishnan ve ark., 2019; Shao ve ark., 2017; Tang ve ark., 2013; Wang ve ark., 2011). PEITC'in Hif- α ve NF- κ B inhibisyonuna yol açan etkilerinden farklı olarak meme, prostat, servikal ve pankreas kanseri hücrelerinde Nrf2 transkripsiyonel aktivasyonunu arttırdığı ve böylece detoksifikasyondan sorumlu enzimlerin miktarında artışa yol açtığı belirlenmiştir. Buna rağmen, ilgili çalışmalarda ajanın bu etkilerinin kemo-koruyucu amaç doğrultusunda vurgulandığı görülmektedir. Prooksidan etkilerine ek olarak daha düşük konsantrasyonlarda PEITC'in hücre düzeyinde koruyucu etkileri de bulunduğundan ajanın bu etkileri antioksidan ve kanserde kemo-koruyucu nitelikleri ile ilişkilendirilmiştir (Chikara ve ark., 2018; Keum ve ark., 2003; Ramirez ve ark., 2017; Soundararajan & Kim, 2018).

Mevcut tez çalışmasında Apigeninin hem tek başına ve hem de PEITC ile birlikte kanser hücrelerinde redoks adaptasyonu üzerine etkileri ilk kez incelenmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen analizlerde bileşiğin PK hücrelerinde seçici sitotoksik, apoptotik ve prooksidan dozları belirlendikten sonra Apigenin, redoks adaptasyonu açısından farklı fenotipleri temsil eden PK hücrelerine prooksidan etkilerini arttırması öngörülen ajan olan PEITC ile birlikte uygulanmıştır. Apigenin ve PEITC'in oksidatif stres artışı, mitokondriyal membran potansiyeli ve total GSH düzeyi üzerine belirlenmiş olan kanser spesifik etkilerine ek olarak PK hücrelerindeki gen ve protein ekspresyon verileri de iki ajanın ilgili dozlarda birlikte kullanıldıklarında sinerjistik prooksidan etkileri ile uyumlu şekilde tüm PK hücrelerinde redoks adaptasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörleri üzerinde daha fazla baskılayıcı etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle 80 μ M Apigenin ve 5 μ M PEITC'in kombin olarak uygulandığı doz gruplarında gen ve protein seviyesinde gerçekleştirilen analizler sonucu redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin hem RNA hem de protein

düzeyinde daha fazla inhibe edildiği belirlenmiştir. Mevcut veriler literatürdeki bulgulara ek olarak Apigenin ve PEITC'in Hif- α ve p-NF- κ B proteinleri üzerinde baskılayıcı etkilerinin PK hücrelerine birlikte uygulandıklarında artış gösterdiğini ortaya koymakta olup literatürde karaciğer kanserinde belirlenmiş olan Apigeninin Nrf2 inhibisyonuna yol açan etkinliğinin de PEITC ile birlikte artış gösterdiğine işaret etmektedir. PEITC'in kanser hücrelerinde Nrf2 aktivasyonuna neden olduğunu bildiren çalışmalar incelendiğinde PC-3 mKDPK ve HeLa hücre hatlarında toksik etki gösterdiği konsantrasyonların altındaki dozlarda (10 μ M'dan az dozda) ve ajanın toksik etki gösterdiği zaman dilimi olan 24 saatten düşük uygulama süresinde (genellikle 2-6 saat arasında) Nrf2 düzeyinde birikime yol açarak, Nrf2 transaktivasyonunu uyardığı ve Nrf2'nin aracılık ettiği ARE-bağımlı raportör gen ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Buna rağmen mevcut çalışmalarda PEITC'in toksik etki gösterdiği zaman diliminde ve toksik etkili konsantrasyonlarında kanser hücrelerinde Nrf2 transaktivasyonuna yol açan etkinliğini devam ettiremediği ve hem Nrf2 protein düzeyinde hem de Nrf2 aracılı aktifleşen ARE-bağımlı gen ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (Keum ve ark., 2003; Xu ve ark., 2006). Tez çalışmasında elde edilen sitotoksik analiz verileri 24 saatte Apigenin ve PEITC'in sinerjistik etki göstererek tüm PK hücrelerinde daha etkin olarak (i) hücre canlılığını inhibe ettiğini, (ii) total apoptotik hücre oranlarını arttırdığını, (iii) hücre döngüsünü daha fazla oranda G2/M fazında durdurduğunu; apoptotik etki öncesi prooksidan etkilerin belirlendiği zaman dilimi olan 12 saatte Apigenin ve PEITC'in sinerjistik etki göstererek tüm PK hücrelerinde daha etkin olarak (i) oksidatif stres artışına yol açtığını, (ii) mitokondriyal membran potansiyelinde daha fazla düzeyde değişime neden olarak depolarize mitokondriye sahip total hücre oranını daha fazla arttırdığını, (iii) total GSH miktarını daha fazla oranda azalttığını ortaya koyduğundan her iki ajan için prooksidan antitümöral etkilerin belirlenmiş olduğu konsantrasyonlarda kombin terapisinin toksik etkileri artış gösterdiğinden p-Nrf2 düzeyinin de sinerjistik etki ile 24 saatte kombin doz grubunda daha fazla azaldığı sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla elde edilen verilerin tümü PK hücrelerinde Apigenin ve PEITC'in kombin olarak artan antikanser etkilere sahip olduğunu ortaya koymakta ve hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde elde edilen ekspresyon verileri için güçlü ve destekleyici bulgular sunmaktadır. Ek olarak Apigeninin Nrf2, NF- κ B ve Hif- α üzerindeki baskılayıcı

etkileri farklı kanserlerde belirlenmiş ve bileşimin efektif olarak ilgili proteinlerin seviyesini azalttığı gösterilmiş olmasına rağmen mevcut tez çalışmasından elde edilen veriler ilk kez Apigeninin PEITC ile birlikte kullanıldığında artan prooksidan etkilerinin PK hücrelerinde redoks adaptasyonunu bozabileceğini ortaya koyarken mevcut etkinin endojen oksidatif stresi ilgilendiren kanser hücresi fenotipine bağlı değişebileceğini göstermektedir. Apigenin ve Apigenin & PEITC kombinasyonunun prooksidan etkilerinin belirlendiği zaman diliminde gerçekleştirilen tüm deneylerde oksidatif etkilerin, LNCaP hücre hattında daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde LNCaP hücre hattında redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin hem Apigeninin tek başına uygulandığı doz gruplarında hem de PEITC ile kombin olarak uygulandığı doz gruplarında daha etkin olarak regüle edildiği görülmektedir. Redoks adaptasyonu geliştirilen LNCaP-HPR hücre hattında elde edilen veriler ise hem Apigenine ve hem de Apigenin & PEITC kombinasyonuna karşı değişen duyarlılığın, ajanların hücre hattı üzerindeki prooksidan etkilerinin de değişmesine katkı sağladığını ortaya koymakla birlikte bu durum redoks adaptasyonunu ilgilendiren gen ve protein düzeyinde Apigenin ve PEITC ile uyarılan regülasyonun LNCaP hücrelerine göre daha düşük düzeyde sağlanabilmesine yol açan bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Apigenin ve PEITC uygulanan RWPE-1 prostatik epitel hücre hattında gen ve protein ekspresyon verileri değerlendirildiğinde ise 80 µM Apigeninin tek başına uygulandığı doz grubunda 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC kombin doz grubuna göre redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin hem RNA hem de protein düzeyinde daha fazla baskılandığı görülmektedir. Sitotoksik analizler ile Apigenin ve PEITC'in 24 saatte uygulanan kombin dozlar için RWPE-1 hücre hattında antagonistik etkiye sahip oldukları belirlenmiş olduğundan ajanların birlikte mRNA ve protein düzeyinde uyardığı regülasyonların da sinerjistik olarak tetiklenemediği düşünülmektedir. Ek olarak PEITC'in RWPE-1 hücre hattında total GSH düzeyi üzerinde artışa neden olan etkileri bulunmaktadır ve RWPE-1 hücre hattında kombin doz gruplarında belirlenen total GSH düzeyinin, Apigeninin tek başına uygulandığı doz gruplarına göre daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Apigenin ve PEITC'in kombin uygulandığı doz gruplarından elde edilen oksidatif stres ve mitokondriyal membran potansiyeli verileri ajanların tek başlarına uygulandıkları doz gruplarındaki veriler ile

karşılaştırıldığında da RWPE-1 hücre hattında bulguların benzer yönde olduğunu göstermektedir. Apigenin ve PEITC RWPE-1 hücrelerinde sinerjistik etkiye sahip olmamasına rağmen RWPE-1 hücre hattının gen ve protein ekspresyon verileri hem tek başına Apigeninin hem de Apigenin ve PEITC kombinasyonunun redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin mRNA ve protein düzeylerinde de farklı kat değişimlerinde inhibe edici etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Sağlıklı hücrelerde oksidatif strese yanıt olarak aktifleşen bu transkripsiyon faktörlerinin malign hücrelerdeki onkogenik aktivitelerinden farklı olarak hücrelerin oksidatif hasardan korunması için koruyucu görevleri olduğu bilinmektedir. Tez çalışması kapsamında kanser hücrelerinde *in vitro* kullanılabilirliği gösterilen Apigenin ve PEITC kombin terapi modelinin RWPE-1 hücre hattında minimal sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğunu, düşük prooksidan etki gösterdiğinin, mitokondriyal hasarı minimal düzeyde tetiklediğinin ve son kombin dozun uygulanması sonrasında bile hücrelerde total GSH'nin %75 oranında korunuyor olduğunu tespit edilmiş olması, gen ve protein düzeyinde redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin baskılanmasına rağmen tedavi süresi içerisinde RWPE-1 hücre sağlığının bozulmadığına işaret etmektedir. Bu durum RWPE-1 hücrelerinde Apigenin ve PEITC ile ROS artışının daha az tetikleniyor olmasından dolayı %75 oranında korunan total GSH düzeyinin mevcut endojen oksidatif stresi tolere etmeye yetebildiği ve hücre sağlığının redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin baskılanmasından etkilenmediği ile *in vitro* koşullarda açıklanabilir bir durumdur. Ancak bu kapsamda Apigenin ve PEITC'in *in vivo* etkinliklerinin de değerlendirilmesi gerekmektedir. Böylece, daha uzun süreli uygulamalar Apigenin ve PEITC'in sağlıklı hücrelerdeki etkilerinin daha net anlaşılmasını sağlayacaktır.

Son olarak Apigenin ve PEITC uygulanmış PK hücrelerinde AR ve PSA'nın mRNA ve protein düzeyindeki değişimler değerlendirildiğinde Apigenin ve PEITC'in tek başlarına uygulandıklarında LNCaP-HPR ve C4-2 hücrelerinde AR ve PSA'nın mRNA seviyeleri üzerinde anlamlı etkilerinin bulunmadığı; ancak 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC kombin doz grubunda tüm PK hücre hatlarında AR ve PSA'nın mRNA düzeyinde anlamlı olarak baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 176-178). Kombin doz grubunda AR'nin LNCaP hücre hattında 3.29-kat, LNCaP-HPR hücre hattında 6.67-kat ve C4-2 hücre hattında 4.96-kat azaldığı saptanmış, aynı doz grubunda PSA'nın

ise LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında sırasıyla 5.51- ve 3.43-kat azaldığı belirlenmiştir (Şekil 176-178). Western blot ve immünfloresan analiz bulguları da hem Apigeninin hem de Apigenin ve PEITC kombinasyonunun anti-androjenik etkilerinin bulunduğunu ortaya koymuştur. Western blot verileri, özellikle LNCaP-HPR ve C4-2 hücre hatlarında sitoplazmik AR ve PSA ekspresyonlarının 80 µM Apigenin ve 80 µM Apigenin + 5 µM PEITC doz grubu sırasına bağlı olarak sırası ile 2.6-kat ve 3.0-kat; 4.2-kat ve 5.4-kat azaldığını göstermiştir. Nükleer AR ekspresyonunda ise tüm PK hücrelerinde Apigeninin tek başına uygulandığı doz gruplarında daha fazla düşüş belirlenmesine rağmen kombin doz grubundan elde edilen veriler de AR'nin yakın kat değişimlerinde baskılandığını göstermiştir. Doz grubu sırasına bağlı nükleer AR ekspresyonunda azalma yönündeki kat değişimleri LNCaP hücre hattında 26.0-kat ve 18.0-kat, LNCaP-HPR hücre hattında 22.0-kat ve 18.2-kat, C4-2 hücre hattında ise 5.14-kat ve 5.0-kat; PSA ekspresyonunda azalma yönündeki kat değişimleri ise doz grubu sırasına bağlı şekilde LNCaP hücre hattında 4.5-kat ve 4.8-kat, LNCaP-HPR hücre hattında 1.81-kat ve 1.6-kat, C4-2 hücre hattında ise 1.6-kat ve 1.78-kat olarak belirlenmiştir (Şekil 188-193). Ek olarak immünfloresan analiz bulguları, PK hücre hatlarında doz grubu sırasına bağlı olarak AR ve PSA'nın sırasıyla nükleer ve sitoplazmik lokalizasyonlardaki seviyelerinde belirgin azalmalar olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 217-218; Şekil 222-223; Şekil 227-228). Apigenin ve PEITC'in ayrı olarak PK hücrelerinde anti-androjenik etkileri olduğu bilinmesine rağmen Apigenin ve PEITC kombinasyonunun PK'nde anti-androjenik etkileri ilk kez birlikte değerlendirilmiş ve Apigeninin tek başına etkilerine yakın olmasına rağmen kombin uygulamanın anti-androjenik yönde sinerjistik etkilerinin bulunabileceği tespit edilmiştir.

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre gen ekspresyonu üzerine etkileri karşılaştırıldığında, Cabazitaxel'in prooksidan etkisine rağmen tüm hücre hatlarında pro-apoptotik etkileri ile ilişkili olabileceği öngörülerek *NF-κB* geninin mRNA seviyesini arttırdığı ancak Apigenin ve PEITC kombinasyonunun *NF-κB*'nin da dahil olduğu redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin tümünün transkripsiyon seviyesinde azalmaya neden olduğu görülmektedir. Buna ek olarak, Cabazitaxel'in diğer redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri Nrf2 ve Hif-α'nın mRNA düzeylerindeki değişimleri çok az düzeyde etkilediği hatta C4-2 hücre hattında

transkripsiyonu baskılama yönündeki etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir. Mevcut bulguya rağmen, Apigenin ve PEITC kombinasyonu için elde edilen veriler, tüm hücre hatlarında kombin uygulamanın hem redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin hem de antioksidan savunma sistemi enzimlerini kodlayan genlerin mRNA seviyeleri üzerinde azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur. Ayrıca iki uygulamanın mRNA düzeyinde anti-androjenik etkileri karşılaştırıldığında, Apigenin ve PEITC kombinasyonunun ilişkili etkilerinin kanser hücrelerinde belirgin olarak fazla olduğu saptanmıştır.

Apigenin ve PEITC kombinasyonunun Cabazitaxel'e göre proteinlerin aktif formları ve nükleer ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri karşılaştırıldığında ise, Cabazitaxel'in LNCaP dışındaki LNCaP-HPR, C4-2 ve RWPE-1 hücre hatlarında p-NF-κB proteinini, RWPE-1 hücre hattında p-NF-κB'ya ek olarak p-Nrf2 protein ekspresyonunu artırıcı etkileri olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık bulgular, Apigenin ve PEITC kombinasyonunun tüm hücre hatlarında p-Nrf2, p-NF-κB ve Hif-α protein seviyelerinin azalması yönünde etkilerinin bulunduğunu, mevcut etkilerin tüm hücre hatlarında Cabazitaxel etkinliğinden fazlaca yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak Apigenin ve PEITC kombinasyonunun hem sitoplazmik hem de nükleer AR seviyesini daha fazla olarak inhibe ettiği ve PK hücrelerinde PSA sekresyonundaki azalmanın kombin doz gruplarında daha belirgin olduğu görülmüştür. Mevcut bulgular tüm hücre hatlarında immünfloresan analiz bulguları ile desteklenmiştir.

Sonuç olarak mevcut tez çalışmasında ilk kez sitotoksik, apoptotik ve prooksidan etkiler açısından kanser seçiciliği Cabazitaxel'e göre daha yüksek olan, PK hücrelerinde hem onkogenik redoks adaptasyon mekanizmasına hem de antioksidan savunma sistemi üzerine etki edebilen özellikleri bulunan iki ajan (Apigenin ve PEITC) birleştirilerek etkinliği artırılmış, sağlıklı prostatik epitel hücreleri üzerinde minimal toksik etkileri bulunan, anti-androjenik etkileri ile de farklı direnç fenotiplerine sahip PK hücrelerinde hedefleri ve kullanılabilirliği gösterilen bir *in vitro* kombin terapi modeli oluşturulmuştur.

Tez çalışmasından elde edilen bulgular ile Apigenin ve PEITC bazlı prooksidan kombin terapi modelinin stres adaptasyonu artmış olan agresif fenotipteki PK hücrelerinde klasik kemoterapiye göre toksik yan etkiler açısından daha üstün ve etkin olarak kullanılabilirliğinin gösterilmiş olması, KDPK tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilecek yeni prooksidan kanser terapi stratejilerine ışık tutacak niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

- Aboeella, N. S., Brandle, C., Kim, T., Ding, Z. C., & Zhou, G. (2021). Oxidative Stress in the Tumor Microenvironment and Its Relevance to Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 13(5), 986.
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., ... Sethi, G. (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735.
- Ahamad, M. S., Siddiqui, S., Jafri, A., Ahmad, S., Afzal, M., & Arshad, M. (2014). Induction of apoptosis and antiproliferative activity of naringenin in human epidermoid carcinoma cell through ROS generation and cell cycle arrest. *PloS one*, 9(10), e110003.
- Aizawa, K., Liu, C., Tang, S., Veeramachaneni, S., Hu, K. Q., Smith, D. E., ... Wang, X. D. (2016). Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation. *International Journal of Cancer*, 139(5), 1171-81.
- Al Nakouzi, N., Le Moulec, S., Albigès, L., Wang, C., Beuzeboc, P., Gross-Goupil, M., ... Lorient, Y. (2015). Cabazitaxel Remains Active in Patients Progressing After Docetaxel Followed by Novel Androgen Receptor Pathway Targeted Therapies. *European Urology*, 68(2), 228-35.
- Ali, F., Rahul, F. Naz, Jyoti, S., & Siddique, H. Y. (2017). Health functionality of Apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1197-238.
- Alukal, J. P., & Lepor, H. (2016). Testosterone Deficiency and the Prostate. *Urologic Clinics of North America*, 43(2), 203-8.
- Amin, A. R. M. R., Karpowicz, P. A., Carey, T.E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., ... Shin, D. M. (2015). Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S55-S77.
- Antonarakis, E. S., Piulats, J. M., Gross-Goupil, M., Goh, J., Ojamaa, K., Hoimes, C. J., ... de Bono, J. S. (2020). Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Multicohort, Open-Label Phase II KEYNOTE-199 Study. *Journal of Clinical Oncology*, 38(5), 395-405.
- Antwi, S. O., Eckert, E. C., Sabaque, C. V., Leof, E. R., Hawthorne, K. M., Bamlet, W. R. ... Petersen, G. M. (2015). Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer. *Cancer causes & control*, 26(11), 1583-1591.
- Apopa, P. L., He, X., & Ma, Q. (2008). Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(1), 63-76.
- Aras, U., Gandhi, Y. A., Masso-Welch, P. A., & Morris, M. E. (2013). Chemopreventive and anti-angiogenic effects of dietary phenethyl isothiocyanate in an N-methyl nitrosourea-induced breast cancer animal model. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 34(2), 98-106.

- Bae, S. H., Sung, S. H., Oh, S. Y., Lim, J. M., Lee, S. K., Park, Y. N., ... Rhee, S. G. (2013). Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metabolism*, 17(1), 73-84.
- Bagnardi, V., Blangiardo, M., La Vecchia, C., & Corrao, G. (2001). Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25(4), 263-270.
- Bai, H., Jin, H., Yang, F., Zhu, H., & Cai, J. (2014). Apigenin induced MCF-7 cell apoptosis-associated reactive oxygen species. *Scanning*, 36(6), 622-31.
- Barber, L., Gerke, T., Markt, S. C., Peisch, S. F., Wilson, K. M., Ahearn, T., ... Mucci, L. A. (2018). Family History of Breast or Prostate Cancer and Prostate Cancer Risk. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(23), 5910-5917.
- Barbieri, C. E., Baca, S. C., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Blattner, M., Theurillat, J. P. ... Garraway, L. A. (2012). Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature Genetics*, 44(6), 685-9.
- Barford, D. (2004). The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(6), 679-86.
- Barqawi, Y. K., Borrego, M. E., Roberts, M. H., & Abraham, I. (2019). Cost-effectiveness model of abiraterone plus prednisone, cabazitaxel plus prednisone and enzalutamide for visceral metastatic castration resistant prostate cancer therapy after docetaxel therapy resistance. *Journal of Medical Economics*, 22(11), 1202-1209.
- Barrera, G., Cucci, M. A., Grattarola, M., Dianzani, C., Muzio, G., & Pizzimenti, S. (2021). Control of Oxidative Stress in Cancer Chemoresistance: Spotlight on Nrf2 Role. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(4), 510.
- Basak, P., Sadhukhan, P., Sarkar, P., & Sil, P. C. (2017). Perspectives of the Nrf-2 signaling pathway in cancer progression and therapy. *Toxicology reports*, 4, 306-318.
- Bebber, C. M., Müller, F., Prieto Clemente, L., Weber, J., & von Karstedt, S. (2020). Ferroptosis in Cancer Cell Biology. *Cancers (Basel)*, 12(1), 164.
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245-313.
- Bellezza, I., Mierla, A. L., & Minelli, A. (2010). Nrf2 and NF- κ B and Their Concerted Modulation in Cancer Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)*, 2(2), 483-97.
- Benkafadar, N., François, F., Affortit, C., Casas, F., Ceccato, J. C., Menardo, J., ... Wang, J. (2019). ROS-Induced Activation of DNA Damage Responses Drives Senescence-Like State in Postmitotic Cochlear Cells: Implication for Hearing Preservation. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5950-5969.
- Bertram, C., & Hass, R. (2008). Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biological Chemistry*, 389(3), 211-20.
- Bhatia, S., Monkman, J., Toh, A. K. L., Nagaraj, S. H., & Thompson, E. W. (2017). Targeting epithelial-mesenchymal plasticity in cancer: clinical and preclinical advances in therapy and monitoring. *Biochemical Journal*, 474(19), 3269-3306.

- Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(5), 1596-604.
- Bild, A. H., Yao, G., Chang, J. T., Wang, Q., Potti, A., Chasse, D., ... Nevins, J. R. (2006). Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature*, 439(7074), 353-7.
- Biswas, S. K. (2015). Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity*, 43(3), 435-49.
- Bogeski, I., & Niemeyer, B. A. (2014). Redox regulation of ion channels. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(6), 859-62.
- Bonini, M. G., Miyamoto, S., Di Mascio, P., & Augusto, O. (2004). Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 51836-43.
- Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genetics and molecular biology*, 38(4), 420-432.
- Brahimi-Horn, M. C., & Pouysségur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters*, 581(19), 3582-9.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J. Jr., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142, w13659.
- Brigelius-Flohé R., & Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3289-303.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2015). The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, 163(4), 1011-25.
- Cao, X., Liu, B., Cao, W., Zhang, W., Zhang, F., Zhao, H., ... Zhang, B. (2013). Autophagy inhibition enhances Apigenin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Chinese Journal of Cancer Research*, 25(2), 212-222.
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395-417.
- Carvalho, K. C., Cunha, I. W., Rocha, R. M., Ayala, F. R., Cajaíba, M. M., Begnami, M. D., ... Soares, F. A. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(6), 965-972.
- Carver, B. S., Tran, J., Chen, Z., Carracedo-Perez, A., Alimonti, A., Nardella, C., ... Pandolfi, P. P. (2009). ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature*, 457(7231), E1; discussion E2-3.
- Chaiswing, L., St Clair, W. H., & St Clair, D. K. (2018). Redox Paradox: A Novel Approach to Therapeutics-Resistant Cancer. *Antioxidants & redox signaling*, 29(13), 1237-1272.
- Chan, S. C., & Dehm, S. M. (2014). Constitutive activity of the androgen receptor. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 70, 327-366.
- Checa, J., & Aran, J. M. (2020). Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *Journal of Inflammation Research*, 13, 1057-1073.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S. J., & Gibson, S. B. (2008). Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 171-82.
- Cheung, K. L., & Kong, A. N. (2010). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *The AAPS Journal*, 12(1), 87-97.

- Chial, H. (2008). Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis. *Nature Education*, 1(1), 177.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L. D., Singhal, J., Horne, D., Awasthi, S., & Singhal, S. S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122-134.
- Choi, D. G., Venkatesan, J., & Shim, M. S. (2019). Selective Anticancer Therapy Using Pro-Oxidant Drug-Loaded Chitosan-Fucoidan Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3220.
- Choi, E. J., & Kim, G. H. (2009). 5-Fluorouracil combined with Apigenin enhances anticancer activity through induction of apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Oncology Reports*, 22(6), 1533-7.
- Choi, S. I., Jeong, C. S., Cho, S. Y., & Lee, Y. S. (2007). Mechanism of apoptosis induced by Apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase. *Archives of Pharmacal Research*, 30(10), 1328-35.
- Chou, T. C., & Martin, N. (2005). CompuSyn for drug combinations: PC Software and User's Guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. *Paramus (NJ): ComboSyn*; Retrieved from <http://www.combosyn.com/>.
- Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55.
- Chou, Y. C., Chang, M. Y., Wang, M. J., Liu, H. C., Chang, S. J., Harnod, T., ... Chung, J. G. (2017). Phenethyl isothiocyanate alters the gene expression and the levels of protein associated with cell cycle regulation in human glioblastoma GBM 8401 cells. *Environmental Toxicology*, 32(1), 176-187.
- Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., & Prakash, O. (2020). Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1614.
- Christian, F., Smith, E. L., & Carmody, R. J. (2016). The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*, 5(1), 12.
- Chun, S. Y., Johnson, C., Washburn, J. G., Cruz-Correa, M. R., Dang, D. T., & Dang, L. H. (2010). Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1 α and HIF-2 α target genes. *Molecular Cancer*, 9, 293.
- Chung, F. L., Morse, M. A., Eklind, K. I., & Lewis, J. (1992). Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1(5), 383-8.
- Colebatch, A. J., Dobrovic, A., & Cooper, W. A. (2019). TERT gene: its function and dysregulation in cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 72(4), 281-284.
- Comen, E. A., Bowman, R. L., & Kleppe, M. (2018). Underlying Causes and Therapeutic Targeting of the Inflammatory Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 56.
- Conklin, K. A. (2004). Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative Cancer Therapies*, 3(4), 294-300.
- Connor, J. (2017). Alcohol consumption as a cause of cancer. *Addiction*, 112(2), 222-228.

- Corcoran, A., & Cotter, T. G. (2013). Redox regulation of protein kinases. *FEBS Journal*, 280(9), 1944-65.
- Cornford, P., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., De Santis, M., Gross, T., ... Mottet, N. (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 71(4), 630-642.
- Corrado, C., & Fontana, S. (2020). Hypoxia and HIF Signaling: One Axis with Divergent Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5611.
- Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 501-7.
- Cox, A. G., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2009). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425(2), 313-25.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and cellular biology*, 23(20), 7198-7209.
- D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., & Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, 17, 611-625.
- Dai, M. Y., Wang, Y., Chen, C., Li, F., Xiao, B. K., Chen, S. M., & Tao, Z. Z. (2016). Phenethyl isothiocyanate induces apoptosis and inhibits cell proliferation and invasion in Hep-2 laryngeal cancer cells. *Oncology Reports*, 35(5), 2657-64.
- D'Angelo, S., Martino, E., Ilisso, C. P., Bagarolo, M. L., Porcelli, M., & Cacciapuoti, G. (2017). Pro-oxidant and pro-apoptotic activity of polyphenol extract from Annurca apple and its underlying mechanisms in human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 51(3), 939-948.
- Das, S., Das, J., Samadder, A., Boujedaini, N., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2012). Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. *Experimental Biology and Medicine*, 237(12), 1433-48.
- Dayalan Naidu, S., Suzuki, T., Yamamoto, M., Fahey, J. W., & Dinkova-Kostova, A. T. (2018). Phenethyl Isothiocyanate, a Dual Activator of Transcription Factors NRF2 and HSF1. *Molecular nutrition & food research*, 62(18), e1700908.
- de Bono, J. S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J. P., Kocak, I., ... TROPIC Investigators. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet*, 376(9747), 1147-54.
- de Magalhães, J. P. (2013). How ageing processes influence cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(5), 357-65.
- De Pergola, G., & Silvestris, F. (2013). Obesity as a major risk factor for cancer. *Journal of obesity*, 2013, 291546.
- DeBlasi, J. M., & DeNicola, G. M. (2020). Dissecting the Crosstalk between NRF2 Signaling and Metabolic Processes in Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(10), 3023.
- Denis, I., Cellierin, L., Gregoire, M., & Blanquart, C. (2014). Cisplatin in combination with Phenethyl Isothiocyanate (PEITC), a potential new therapeutic strategy for malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget*, 5(22), 11641-52.

- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., ... Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072.
- Dodson, M., Castro-Portuguez, R., & Zhang, D. D. (2019). NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biology*, 23, 101107.
- Dong, J., Liu, B., & Zhu, R. (2016) Targeting ROS for Cancer Therapy. *Chemotherapy Open Access*, 5, 199.
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 12222–12248.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-48.
- Duran, G. E., Wang, Y. C., Francisco, E. B., Rose, J. C., Martinez, F. J., Collier, J., ... Sikic, B. I. (2015). Mechanisms of resistance to cabazitaxel. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(1), 193-201.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., & Izzo, A. A. (2019). Novellino E, Santini A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.
- Durgan, J., & Florey, O. (2018). Cancer cell cannibalism: Multiple triggers emerge for entosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(6), 831-841.
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(11), 859-68.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516.
- Endo, S., Kawai, M., Hoshi, M., Segawa, J., Fujita, M., Matsukawa, T., ... Ikari, A. (2021). Targeting Nrf2-antioxidant signaling reverses acquired cabazitaxel resistance in prostate cancer cells. *The Journal of Biochemistry*, XXX doi: 10.1093/jb/mvab025.
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., & Humphrey, P. A. (2016) Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American Journal of Surgical Pathology*, 40(2), 244-52.
- Eren-Guzelgun, B., Ince, E., & Gurer-Orhan, H. (2018). In vitro antioxidant/prooxidant effects of combined use of flavonoids. *Natural Product Research*, 32(12), 1446-1450.
- Ertoy Baydar, D. (2017). Prostat Kanser Patolojisi. *Türk Radyoloji Seminerleri*, 5, 370-82.
- Erzurumlu, Y. (2021). Prostate Cancer: Signal Mechanism of Androgen Receptor. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 28(1), 187-198.
- Espinosa-Die, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., ... Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6, 183-197.
- Eyvazi, S., Vostakolaei, M. A., Dilmaghani, A., Borumandi, O., Hejazi, M. S., Kahroba, H., ... Tarhriz, V. (2020). The oncogenic roles of bacterial infections in development of cancer. *Microbial Pathogenesis*, 141: 104019.

- Fang, J., Xia, C., Cao, Z., Zheng, J. Z., Reed, E., & Jiang, B. H. (2005). Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB Journal*, 19(3), 342-53.
- Fang, J., Zhou, Q., Liu, L. Z., Xia, C., Hu, X., Shi, X., & Jiang, B. H. (2007). Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogenesis*, 28(4), 858-64.
- Feins, S., Kong, W., Williams, E. F., Milone, M. C., & Fraietta, J. A. (2019). An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American Journal of Hematology*, 94(S1), S3-S9.
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl(Suppl), S25-S54.
- Ferguson, L. R., Chen, H., Collins, A. R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., ... Maxwell, C. A. (2015). Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl(Suppl), S5-S24.
- Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*, 23(12), 620–633.
- Firczuk, M., Bajor, M., Graczyk-Jarzynka, A., Fidyk, K., Goral, A., & Zagozdzon, R. (2020). Harnessing altered oxidative metabolism in cancer by augmented prooxidant therapy. *Cancer Letters*, 471, 1-11.
- Fitzpatrick, J. M., & de Wit, R. (2014). Taxane mechanisms of action: potential implications for treatment sequencing in metastatic castration-resistant prostate cancer. *European Urology*, 65(6), 1198-204.
- Fizazi, K., Tran, N., Fein, L., Matsubara, N., Rodriguez-Antolin, A., Alekseev, B. Y., ... Chi, K. N. (2017). LATITUDE Investigators. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 377(4), 352-360.
- Flemming, A. (2007). Double death for cancer cells. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 186.
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, 122(6), 877-902.
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016–1036.
- Foyer, C. H., Wilson, M. H., & Wright, M. H. (2018). Redox regulation of cell proliferation: Bioinformatics and redox proteomics approaches to identify redox-sensitive cell cycle regulators. *Free radical biology & medicine*, 122, 137–149.
- Franco, R., & Navarro, G. (2019). Martínez-Pinilla E. Hormetic and Mitochondria-Related Mechanisms of Antioxidant Action of Phytochemicals. *Antioxidants (Basel)*, 8(9), 373.
- Fraser, M., Sabelnykova, V. Y., Yamaguchi, T. N., Heisler, L. E., Livingstone, J., Huang, V., ... Boutros, P. C. (2017). Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. *Nature*, 541(7637), 359-364.

- Freitas, M., Baldeiras, I., Proença, T., Alves, V., Mota-Pinto, A., & Sarmiento-Ribeiro, A. (2012). Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase. *FEBS Open Bio*, 2, 119–28.
- Fritz, V., & Fajas, L. (2010). Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene*, 29(31), 4369–77.
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6), 1583–1606.
- Furrukh, M. (2013). Tobacco Smoking and Lung Cancer: Perception-changing facts. *Sultan Qaboos University medical journal*, 13(3), 345–358.
- Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology & Medicine*, 104, 144–164.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541.
- Gan, L., Chen, S., Wang, Y., Watahiki, A., Bohrer, L., Sun, Z., ... Huang, H. (2009). Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer. *Cancer Research*, 69(21), 8386–94.
- Gann, P. H. (2002). Risk factors for prostate cancer. *Reviews in Urology*, 5(Suppl 5), S3–S10.
- Gao, A. M., Zhang, X. Y., & Ke, Z. P. (2017). Apigenin sensitizes BEL-7402/ADM cells to doxorubicin through inhibiting miR-101/Nrf2 pathway. *Oncotarget*, 8(47), 82085–82091.
- Gào, X., & Schöttker, B. (2017). Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget*, 8(31), 51888–51906.
- Garber, J. E., & Offit, K. (2005). Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 23(2), 276–92.
- Ghoneum, A., Abdulfattah, A. Y., Warren, B. O., Shu, J., & Said, N. (2020). Redox Homeostasis and Metabolism in Cancer: A Complex Mechanism and Potential Targeted Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3100.
- Gilardini Montani, M. S., Cecere, N., Granato, M., Romeo, M. A., Falcinelli, L., Ciciarelli, U., ... Cirone, M. (2019). Mutant p53, Stabilized by Its Interplay with HSP90, Activates a Positive Feed-Back Loop Between NRF2 and p62 that Induces Chemo-Resistance to Apigenin in Pancreatic Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 11(5), 703.
- Gillessen, S., Attard, G., Beer, T. M., Beltran, H., Bjartell, A., Bossi, A., ... Omlin, A. (2020). Management of Patients with Advanced Prostate Cancer: Report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference 2019. *European Urology*, 77(4), 508–547.
- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 90–101.
- Głowacki, R., Furmaniak, P., Kubalczyk, P., & Borowczyk, K. (2016). Determination of Total Apigenin in Herbs by Micellar Electrokinetic Chromatography with UV Detection. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 3827832.

- Goncalves, R. L., Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., & Brand, M. D. (2015). Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *The Journal of biological chemistry*, 290(1), 209–227.
- Goto, S., Kawabata, T., & Li, T. S. (2020). Enhanced Expression of ABCB1 and Nrf2 in CD133-Positive Cancer Stem Cells Associates with Doxorubicin Resistance. *Stem Cells International*, 2020, 8868849.
- Görlach, A. (2009). Regulation of HIF-1alpha at the transcriptional level. *Current Pharmaceutical Design*, 15(33), 3844-52.
- Grasso, C. S., Wu, Y. M., Robinson, D. R., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Khan, A. P., ... Tomlins, S. A. (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 487(7406), 239-43.
- Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51(1), 27-41.
- Guney Eskiler, G., Ozkan, A. D., Eryilmaz, I. E., Egeli, U., & Cecener, G. (2021). Association between the anticancer efficacy of cabazitaxel and toll-like receptor 4 mediating signaling pathways in metastatic castration-resistant prostate cancer cells. *Human & Experimental Toxicology*, 40(7), 1122-1129.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., & Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 8(21), 2003–2014.
- Gupta, N., Verma, K., Nalla, S., Kulshreshtha, A., Lall, R., & Prasad, S. (2020). Free Radicals as a Double-Edged Sword: The Cancer Preventive and Therapeutic Roles of Curcumin. *Molecules*, 25(22), 5390.
- Gupta, P., Kim, B., Kim, S. H., & Srivastava, S. K. (2014). Molecular targets of isothiocyanates in cancer: recent advances. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(8), 1685-707.
- Gupta, P., Wright, S. E., Kim, S. H., & Srivastava, S. K. (2014). Phenethyl isothiocyanate: a comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846(2), 405-24.
- Gupta, S., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2002). Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by Apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene*, 21(23), 3727-38.
- Guzy, R. D., Mack, M. M., & Schumacker, P. T. (2007). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and gene transcription in yeast. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(9), 1317-28.
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9); 505-13.
- Han, C., Wang, Z., Xu, Y., Chen, S., Han, Y., Li, L., ... Jin, X. (2020). Roles of Reactive Oxygen Species in Biological Behaviors of Prostate Cancer. *BioMed research international*, 2020, 1269624.
- Han, J., & Sun, P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8), 364-71.
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10(3), 727–742.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hancock, J. T., Desikan, R., & Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 345-50.
- Hart, P. C., Mao, M., de Abreu, A. L., Ansenberger-Fricano, K., Ekoue, D. N., Ganini, D., ... Bonini, M. G. (2015). MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nature Communications*, 6, 6053.
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127-129.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*, 18(18), 2195-224.
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167-197.
- Hegedűs, C., Kovács, K., Polgár, Z., Regdon, Z., Szabó, É., Robaszkiewicz, A., ... Virág, L. (2018). Redox control of cancer cell destruction. *Redox Biology*, 16, 59-74.
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 411-21.
- Hong, Y. H., Uddin, M. H., Jo, U., Kim, B., Song, J., Suh, D. H., ... Song, Y. S. (2015). ROS Accumulation by PEITC Selectively Kills Ovarian Cancer Cells via UPR-Mediated Apoptosis. *Frontiers in oncology*, 5, 167.
- Hongo, H., Kosaka, T., & Oya, M. (2018). Analysis of cabazitaxel-resistant mechanism in human castration-resistant prostate cancer. *Cancer Science*, 109(9), 2937-2945.
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature reviews Cancer*, 20(2), 74-88.
- Hsia, T. C., Huang, Y. P., Jiang, Y. W., Chen, H. Y., Cheng, Z. Y., Hsiao, Y. T., ... Chung, J. G. (2018). Phenethyl Isothiocyanate Induces Apoptotic Cell Death Through the Mitochondria-dependent Pathway in Gefitinib-resistant NCI-H460 Human Lung Cancer Cells In Vitro. *Anticancer Research*, 38(4):2137-2147.
- Hu, H., Chen, J., Yang, H., Huang, X., Wu, H., Wu, Y., ... Yang, X. (2019). Potentiating photodynamic therapy of ICG-loaded nanoparticles by depleting GSH with PEITC. *Nanoscale*, 11(13), 6384-6393.
- Huang, G., & Pan, S. T. (2020). ROS-Mediated Therapeutic Strategy in Chemo-/Radiotherapy of Head and Neck Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 5047987.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., ... Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 275(5296), 90-4.
- Imran, M., Aslam Gondal, T., Atif, M., Shahbaz, M., Batool Qaisarani, T., Hanif Mughal, M., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Apigenin as an anticancer agent. *Phytotherapy Research*, 34(8), 1812-1828.
- Inamura, K. (2018). Prostatic cancers: understanding their molecular pathology and the 2016 WHO classification. *Oncotarget*, 9(18), 14723-14737.

- International Agency for Research on Cancer GLOBOCAN 2020 Cancer Statistics. Retrieved from <http://gco.iarc.fr/>.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., ... Goldschmidt-Clermont, P. J. (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, 275(5306), 1649-52.
- Ishay-Ronen, D., & Christofori, G. (2019). Targeting Cancer Cell Metastasis by Converting Cancer Cells into Fat. *Cancer Research*, 79(21), 5471-5475.
- Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H., & Shay, J. W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*, 8(1), 69.
- Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski Mercuriusz Lekarski*, 48(284), 124-127.
- Jakubikova, J., Cervi, D., Ooi, M., Kim, K., Nahar, S., Klippel, S., ... Mitsiades, C. S. (2011). Anti-tumor activity and signaling events triggered by the isothiocyanates, sulforaphane and phenethyl isothiocyanate, in multiple myeloma. *Haematologica*, 96(8), 1170-9.
- Javed, Z., Sadia, H., Iqbal, M. J., Shamas, S., Malik, K., Ahmed, R., ... Sharifi-Rad, J. (2021). Apigenin role as cell-signaling pathways modulator: implications in cancer prevention and treatment. *Cancer Cell International*, 21(1), 189.
- Jeon, J. S., Kwon, S., Ban, K., Kwon Hong, Y., Ahn, C., Sung, J. S., & Choi, I. (2019). Regulation of the Intracellular ROS Level Is Critical for the Antiproliferative Effect of Quercetin in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. *Nutrition and Cancer*, 71(5), 861-869.
- Jin, S., Zhang, Q. Y., Kang, X. M., Wang, J. X., & Zhao, W. H. (2010). Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Annals of Oncology*, 21(2), 263-268.
- Jing, Y., Liu, L. Z., Jiang, Y., Zhu, Y., Guo, N. L., Barnett, J., ... Jiang, B. H. (2012). Cadmium increases HIF-1 and VEGF expression through ROS, ERK, and AKT signaling pathways and induces malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 125(1), 10-9.
- Ju, H. Q., Gocho, T., Aguilar, M., Wu, M., Zhuang, Z. N., Fu, J., ... Chiao, P. J. (2015). Mechanisms of Overcoming Intrinsic Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through the Redox Modulation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(3), 788-98.
- Ju, H. Q., Lu, Y. X., Chen, D. L., Tian, T., Mo, H. Y., Wei, X. L., ... Xu, R. H. (2016). Redox Regulation of Stem-like Cells Through the CD44v-xCT Axis in Colorectal Cancer: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Theranostics*, 6(8), 1160-1175.
- Jung, S., Jeong, H. & Yu, S. W. (2020). Autophagy as a decisive process for cell death. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 52, 921-930.
- Kachadourian, R., & Day, B. J. (2006). Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free radical biology & medicine*, 41(1), 65-76.
- Kaczanowski, S. (2016). Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physics in Medicine & Biology*, 13(3), 031001.

- Kaelin, W. G. Jr. (2017). The VHL Tumor Suppressor Gene: Insights into Oxygen Sensing and Cancer. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 128, 298-307.
- Kala, C., Ali, S. S., Ahmad, N., Gilani, S. J., & Khan, N. A. (2018). Isothiocyanates: a review. *Pharmacognosy Research*, 5(2), 71–89.
- Kane, C. J., Eggener, S. E., Shindel, A. W., & Andriole, G. L. (2017). Variability in Outcomes for Patients with Intermediate-risk Prostate Cancer (Gleason Score 7, International Society of Urological Pathology Gleason Group 2-3) and Implications for Risk Stratification: A Systematic Review. *European Urology Focus*, 3(4-5), 487-497.
- Kang, M. A., So, E. Y., Simons, A. L., Spitz, D. R., & Ouchi, T. (2012). DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell death & disease*, 3(1), e249.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonen, A. L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 1(1), 45-9.
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, 3(3), 221-7.
- Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., Mimura, J., & Itoh, K. (2020). Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*, 10(2), 320.
- Kaushik, S., Shyam, H., Agarwal, S., Sharma, R., Nag, T. C., Dwivedi, A. K., & Balapure, A. K. (2019). Genistein potentiates Centchroman induced antineoplasticity in breast cancer via PI3K/Akt deactivation and ROS dependent induction of apoptosis. *Life Sciences*, 239, 117073.
- Kemble, D. J., & Sun, G. (2009). Direct and specific inactivation of protein tyrosine kinases in the Src and FGFR families by reversible cysteine oxidation. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), 5070-5.
- Keum, Y. S., Owuor, E. D., Kim, B. R., Hu, R., & Kong, A. N. (2003). Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharmaceutical Research*, 20(9), 1351-6.
- Khor, T. O., Cheung, W. K., Prawan, A., Reddy, B. S., & Kong, A. N. (2008). Chemoprevention of familial adenomatous polyposis in Apc(Min/+) mice by phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Molecular Carcinogenesis*, 47(5), 321-5.
- Kikuchi, H., Yuan, B., Hu, X., & Okazaki, M. (2019). Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *American journal of cancer research*, 9(8), 1517–1535.
- Kim S. Y. (2018). Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory. *Biomolecules & therapeutics*, 26(1), 39–44.
- Kim, A. D., Zhang, R., Kang, K. A., You, H. J., & Hyun, J. W. (2011). Increased glutathione synthesis following Nrf2 activation by vanadyl sulfate in human Chang liver cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 8878-94.
- Kim, S. J., Kim, H. S., & Seo, Y. R. (2019). Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5381692.

- Knudson, A. G. Jr., Meadows, A. T., Nichols, W. W., & Hill, R. (1976). Chromosomal deletion and retinoblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 295(20), 1120-3.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2), 457.
- Korga-Plewko, A., Michalczyk, M., Adamczuk, G., Humeniuk, E., Ostrowska-Lesko, M., Jozefczyk, A., ... Dudka, J. (2020). Apigenin and Hesperidin Downregulate DNA Repair Genes in MCF-7 Breast Cancer Cells and Augment Doxorubicin Toxicity. *Molecules*, 25(19), 4421.
- Kosaka, T., Hongo, H., Miyazaki, Y., Nishimoto, K., Miyajima, A., & Oya, M. (2017). Reactive oxygen species induction by cabazitaxel through inhibiting Sestrin-3 in castration resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 8(50), 87675-87683.
- Koschorke, A., Faraci, S., Giani, D., Chiodoni, C., Iorio, E., Canese, R., ... Pupa, S. M. (2019). Phenethyl isothiocyanate hampers growth and progression of HER2-positive breast and ovarian carcinoma by targeting their stem cell compartment. *Cellular Oncology*, 42(6), 815-828.
- Kotlo, K. U., Yehiely, F., Efimova, E., Harasty, H., Hesabi, B., Shchors, K., ... Deiss, L. P. (2003). Nrf2 is an inhibitor of the Fas pathway as identified by Achilles' Heel Method, a new function-based approach to gene identification in human cells. *Oncogene*, 22(6), 797-806.
- Koundouros, N., & Pouligiannis, G. (2018). Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolizma in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8, 160.
- Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V., & Perelmuter, V. M. (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae*, 7(2), 17-28.
- Kroon, J., Kooijman, S., Cho, N. J., Storm, G., & van der Pluijm, G. (2016). Improving Taxane-Based Chemotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(6), 451-462.
- Kubo, E., Chhunchha, B., Singh, P., Sasaki, H., & Singh, D. P. (2017). Sulforaphane reactivates cellular antioxidant defense by inducing Nrf2/ARE/Prdx6 activity during aging and oxidative stress. *Scientific reports*, 7(1), 14130.
- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., & Koul, H. K. (2008). Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Research*, 68(6), 1777-85.
- Kumar, G., Tuli, H. S., Mittal, S., Shandilya, J. K., Tiwari, A., & Sandhu, S. S. (2015). Isothiocyanates: a class of bioactive metabolites with chemopreventive potential. *Tumour Biology*, 36(6), 4005-16.
- Kumari, S., Badana, A. K., Murali Mohan, G., Shailender, G., & RamaRao, M. (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights*, 13, 1177271918755391.
- Kumari, V., Dyba, M. A., Holland, R. J., Liang, Y. H., Singh, S. V., & Ji, X. (2016). Irreversible Inhibition of Glutathione S-Transferase by Phenethyl Isothiocyanate (PEITC), a Dietary Cancer Chemopreventive Phytochemical. *PLoS One*, 11(9), e0163821.
- Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8135-45.

- Kweldam, C. F., van Leenders, G. J., & van der Kwast, T. (2019). Grading of prostate cancer: a work in progress. *Histopathology*, 74(1), 146-160.
- Kyriakopoulos, C. E., Chen, Y. H., Carducci, M. A., Liu, G., Jarrard, D. F., Hahn, N. M., ... Sweeney, C. J. (2018). Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. *Journal of Clinical Investigation*, 36(11), 1080-1087.
- Suraweera, T., Rupasinghe, H., Dellaire, G., & Xu, Z. (2020). Regulation of Nrf2/ARE Pathway by Dietary Flavonoids: A Friend or Foe for Cancer Management?. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 973.
- Lai, K. C., Hsu, S. C., Kuo, C. L., Ip, S. W., Yang, J. S., Hsu, Y. M., ... Chung, J. G. (2010). Phenethyl isothiocyanate inhibited tumor migration and invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human colon cancer HT29 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20):11148-55.
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181-9.
- Lange, R., ter Heine, R., van Wieringen, W. N., Tromp, A. M., Paap, M., Bloemendal, H. J., ... Geldof, A. A. (2017). Cytotoxic Effects of the Therapeutic Radionuclide Rhenium-188 Combined with Taxanes in Human Prostate Carcinoma Cell Lines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 32(1), 16-23.
- Leber, M. F., & Efferth, T. (2009). Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *International Journal of Oncology*, 34(4), 881-95.
- Lee, E. Y., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a003236.
- Lee, G., Won, H. S., Lee, Y. M., Choi, J. W., Oh, T. I., Jang, J. H., ... Lim, J. H. (2016). Oxidative Dimerization of PHD2 is Responsible for its Inactivation and Contributes to Metabolic Reprogramming via HIF-1 α Activation. *Scientific Reports*, 6, 18928.
- Lee, H. H., Jung, J., Moon, A., Kang, H., & Cho, H. (2019). Antitumor and Anti-Invasive Effect of Apigenin on Human Breast Carcinoma through Suppression of IL-6 Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3143.
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., & Kim, K. W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental & Molecular Medicine*, 36(1), 1-12.
- Lee, Y. J., Park, K. S., Nam, H. S., Cho, M. K., & Lee, S. H. (2020). Apigenin causes necroptosis by inducing ROS accumulation, mitochondrial dysfunction, and ATP depletion in malignant mesothelioma cells. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 24(6), 493-502.
- Lee, Y., Lee, J., & Lim, C. (2021). Anticancer activity of flavonoids accompanied by redox state modulation and the potential for a chemotherapeutic strategy. *Food Science and Biotechnology*, 30(3), 321-340.
- Leinonen, H. M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M., & Levonen, A. L. (2014). Role of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Advances in Cancer Research*, 122, 281-320.
- Leslie, S. W., Soon-Sutton, T. L., Sajjad, H., & Siref, L. E. Prostate Cancer. [Updated 2021 Jul 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>.

- Li, J., Wang, T., Liu, P., Yang, F., Wang, X., Zheng, W., & Sun, W. (2021). Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD. *Food & Function journal*, 12(9), 3898-3918.
- Li, W., & Kong, A. N. (2009). Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular carcinogenesis*, 48(2), 91–104.
- Li, Z., Xuan, Z., Chen, J., Song, W., Zhang, S., Jin, C., ... Song, P. (2020). Inhibiting the NF- κ B pathway enhances the antitumor effect of cabazitaxel by downregulating Bcl-2 in pancreatic cancer. *International journal of oncology*, 57(1), 161–170.
- Liao, Z., Chua, D., & Tan, N. S. (2019). Reactive oxygen species: a volatile driver of field cancerization and metastasis. *Molecular Cancer*, 18(1), 65.
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., ... Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine*, 343(2), 78-85.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772.
- Lim, S. O., Gu, J. M., Kim, M. S., Kim, H. S., Park, Y. N., Park, C. K., ... Jung, G. (2008). Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. *Gastroenterology*, 135(6), 2128-40.
- Lim, W., Park, S., Bazer, F. W., & Song, G. (2017). Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(5), 1118-1131.
- Lin, C. C., Chuang, Y. J., Yu, C. C., Yang, J. S., Lu, C. C., Chiang, J. H., ... Chung, J. G. (2012). Apigenin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction in U-2 OS human osteosarcoma cells and inhibits osteosarcoma xenograft tumor growth in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11395-402.
- Lin, P. H., Aronson, W., & Freedland, S. J. (2015). Nutrition, dietary interventions and prostate cancer: the latest evidence. *BMC Medicine*, 13, 3.
- Lingappan, K. (2018). NF- κ B in Oxidative Stress. *Current opinion in toxicology*, 7, 81–86.
- Linkermann, A., Skouta, R., Himmerkus, N., Mulay, S. R., Dewitz, C., De Zen, F., ... Krautwald, S. (2014). Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111(47), 16836-41.
- Liskova, A., Samec, M., Koklesova, L., Brockmueller, A., Zhai, K., Abdellatif, B., ... Kubatka, P. (2021). Flavonoids as an effective sensitizer for anti-cancer therapy: insights into multi-faceted mechanisms and applicability towards individualized patient profiles. *EPMA Journal*, 12(2), 1-22.
- Liu, T. T., Liu, Y. J., Wang, Q., Yang, X. G., & Wang, K. (2012). Reactive-oxygen-species-mediated Cdc25C degradation results in differential antiproliferative activities of vanadate, tungstate, and molybdate in the PC-3 human prostate cancer cell line. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(2), 311-20.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023.

- Liu, X. L., Ding, J., & Meng, L. H. (2018). Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(10), 1553-1558.
- Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., ... Straif, K. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. (2017). Carcinogenicity of benzene. *Lancet Oncology*, 18(12), 1574-1575.
- Louandre, C., Marcq, I., Bouhlal, H., Lachaier, E., Godin, C., Saidak, Z., ... Galmiche, A. (2015). The retinoblastoma (Rb) protein regulates ferroptosis induced by sorafenib in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*, 356(2 Pt B), 971-7.
- Lu, W., & Kang, Y. (2019). Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental Cell: Cell Press*, 49(3), 361-374.
- Lugano, R., Ramachandran, M., & Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 77(9), 1745–1770.
- Lv, H. H., Zhen, C. X., Liu, J. Y., & Shang, P. (2020a). PEITC triggers multiple forms of cell death by GSH-iron-ROS regulation in K7M2 murine osteosarcoma cells. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 41(8), 1119-1132.
- Lv, H., Zhen, C., Liu, J., & Shang, P. (2020b). β -Phenethyl Isothiocyanate Induces Cell Death in Human Osteosarcoma through Altering Iron Metabolism, Disturbing the Redox Balance, and Activating the MAPK Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 5021983.
- Maciag, A., Sithanandam, G., & Anderson, L. M. (2004). Mutant K-rasV12 increases COX-2, peroxides and DNA damage in lung cells. *Carcinogenesis*, 25(11), 2231-7.
- Maggioni, D., Garavello, W., Rigolio, R., Pignataro, L., Gaini, R., & Nicolini, G. (2013). Apigenin impairs oral squamous cell carcinoma growth in vitro inducing cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Oncology*, 43(5), 1675-82.
- Malavolta, M., Bracci, M., Santarelli, L., Sayeed, M. A., Pierpaoli, E., Giacconi, R., ... Provinciali, M. (2018). Inducers of Senescence, Toxic Compounds, and Senolytics: The Multiple Faces of Nrf2-Activating Phytochemicals in Cancer Adjuvant Therapy. *Mediators of inflammation*, 2018, 4159013.
- Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., ... Pinton, P. (2012). Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 329635.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, 2, 535-62.
- Martin, S. K., & Kyprianou, N. (2015). Exploitation of the Androgen Receptor to Overcome Taxane Resistance in Advanced Prostate Cancer. *Advances in Cancer Research*, 127, 123-58.
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-89.
- Mastuo, T., Miyata, Y., Yuno, T., Mukae, Y., Otsubo, A., Mitsunari, K., ... Sakai, H. (2020). Molecular Mechanisms of the Anti-Cancer Effects of Isothiocyanates from Cruciferous Vegetables in Bladder Cancer. *Molecules*, 25(3), 575.

- Masuelli, L., Benvenuto, M., Mattera, R., Di Stefano, E., Zago, E., Taffera, G., ... Bei, R. (2017). In Vitro and In Vivo Anti-tumoral Effects of the Flavonoid Apigenin in Malignant Mesothelioma. *Frontiers in pharmacology*, 8, 373.
- Mateo, J., Porta, N., Bianchini, D., McGovern, U., Elliott, T., Jones, R., ... de Bono, J. S. (2020). Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncology*, 21(1), 162-174.
- Mateo, J., Seed, G., Bertan, C., Rescigno, P., Dolling, D., Figueiredo, I., ... de Bono, J. S. (2020). Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 1743-1751.
- Matsui, A., Ihara, T., Suda, H., Mikami, H., & Semba, K. (2013). Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer. *Biomolecular concepts*, 4(6), 567-82.
- McLaughlin-Drubin, M. E., & Munger, K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1782(3), 127-150.
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2(1), 35-49.
- Meirson, T., Gil-Henn, H., & Samson, A. O. (2020). Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. *Oncogene*, 39(9), 2024-2026.
- Menegon, S., Columbano, A., & Giordano, S. (2016). The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 22(7), 578-593.
- Messerschmidt, J. L., Prendergast, G. C., & Messerschmidt, G. L. (2016). How Cancers Escape Immune Destruction and Mechanisms of Action for the New Significantly Active Immune Therapies: Helping Nonimmunologists Decipher Recent Advances. *Oncologist*, 21(2), 233-43.
- Milkovic, L., Zarkovic, N., & Saso, L. (2017). Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biology*, 12, 727-732.
- Mills, I. G. (2014). Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(3), 187-98.
- Mirzaei, S., Hushmandi, K., Zabolian, A., Saleki, H., Torabi, S. M. R., Ranjbar, A., ... Ahn, K. S. (2021). Elucidating Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cisplatin Chemotherapy: A Focus on Molecular Pathways and Possible Therapeutic Strategies. *Molecules*, 26(8), 2382.
- Mirzoeva, S., Franzen, C. A., & Pelling, J. C. (2014). Apigenin inhibits TGF- β -induced VEGF expression in human prostate carcinoma cells via a Smad2/3- and Src-dependent mechanism. *Molecular Carcinogenesis*, 53(8), 598-609.
- Mirzoeva, S., Kim, N. D., Chiu, K., Franzen, C. A., Bergan, R. C., & Pelling, J. C. (2008). Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid Apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Molecular Carcinogenesis*, 47(9), 686-700.
- Mishra, A. P., Salehi, B., Sharifi-Rad, M., Pezzani, R., Kobarfard, F., Sharifi-Rad, J., & Nigam M. (2018). Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 22(3), 281-295.
- Mitsuishi, Y., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2012). The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in oncology*, 2, 200.
- Miyoshi, N. (2016). Chemical alterations and regulations of biomolecules in lifestyle-related diseases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(6), 1046-53.

- Miyoshi, N., Naniwa, K., Yamada, T., Osawa, T., & Nakamura, Y. (2007). Dietary flavonoid Apigenin is a potential inducer of intracellular oxidative stress: the role in the interruptive apoptotic signal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 466(2), 274-82.
- Molenaar, R. J., Maciejewski, J. P., Wilmink, J. W., & van Noorden, C. J. F. (2018). Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene*, (15), 1949-1960.
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 50-64.
- Moloney, J. N., Stanicka, J., & Cotter, T. G. (2017). Subcellular localization of the FLT3-ITD oncogene plays a significant role in the production of NOX- and p22phox-derived reactive oxygen species in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 52, 34-42.
- Mondal, D., Narwani, D., Notta, S., Ghaffar, D., Mardhekar, N., & Quadri, S. S. A. (2021). Oxidative stress and redox signaling in CRPC progression: therapeutic potential of clinically-tested Nrf2-activators. *Cancer Drug Resistance*, 4, 96-124.
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*, 21(1), 103-15.
- Moulder, S., Dhillon, N., Ng, C., Hong, D., Wheler, J., Naing, A., ... Kurzrock, R. (2010). A phase I trial of imexon, a pro-oxidant, in combination with docetaxel for the treatment of patients with advanced breast, non-small cell lung and prostate cancer. *Investigational New Drugs*, 28(5), 634-40.
- Mucci, L. A., Hjelmborg, J. B., Harris, J. R., Czene, K., Havelick, D. J., Scheike, T., ... Kaprio, J., Nordic Twin Study of Cancer (NorTwinCan) Collaboration (2016). Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*, 315(1)68-76.
- Mukhtar, E., Adhami, V. M., Siddiqui, I. A., Verma, A. K., & Mukhtar, H. (2016). Fisetin Enhances Chemotherapeutic Effect of Cabazitaxel against Human Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(12), 2863-2874.
- Mulcahy Levy, J. M., & Thorburn, A. (2020). Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 843-857.
- Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49064-73.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, 417(1), 1-13.
- Münger, K. (2002). Disruption of oncogene/tumor suppressor networks during human carcinogenesis. *Cancer Investigation*, 20(1), 71-81.
- Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J. H., Xue, X., & Okumura, K. (2006). Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- κ B and JNK. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 730-7.
- Narayanan, D., Ma, S., & Özcelik, D. (2020). Targeting the Redox Landscape in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*, 12(7), 1706.
- Narayanankutty, A., Job, J. T., & Narayanankutty, V. (2019). Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. *Current Protein & Peptide Science*, 20(9), 907-917.

- National Cancer Institute Risk Factors for Cancer, Retrieved from <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>.
- National Comprehensive Cancer Network. (2018). Prostate cancer (version 4.2018). Retrieved from https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf
- NavaneethaKrishnan, S., Rosales, J. L., & Lee, K. Y. (2019). ROS-Mediated Cancer Cell Killing through Dietary Phytochemicals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9051542.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220-8.
- Neha, H. (2021). Editorial note on hallmarks of cancer cells. *Advances in Applied science research*, 12(1), 5.
- Nightingale, G., & Ryu, J. (2012). Cabazitaxel (jevtana): a novel agent for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Physical Therapy*, 37(8), 440-8.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213-9.
- Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2018). Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Letters*, 592(5), 728-742.
- Nordzicke, D. E., & Medraño-Fernandez, I. (2018). The Plasma Membrane: A Platform for Intra- and Intercellular Redox Signaling. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(11), 168.
- Oh, J. K., & Weiderpass, E. (2014). Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. *Ann Glob Health*, 80(5):384-92.
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. (2009). Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), 2223-4.
- Onul, A., Elseth, K. M., De Vitto, H., Paradise, W. A., Vesper, B. J., Tarjan, G., ... Radosevich, J. A. (2012). Long-term adaptation of the human lung tumor cell line A549 to increasing concentrations of hydrogen peroxide. *Tumour Biology*, 33(3), 739-48.
- Ooko, E., Saeed, M. E., Kadioglu, O., Sarvi, S., Colak, M., Elmasaoudi, K., ... Efferth, T. (2015). Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells. *Phytomedicine*, 22(11), 1045-54.
- Oudard, S. (2011). TROPIC: Phase III trial of cabazitaxel for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Future Oncology*, 7(4), 497-506.
- Pajares, M., Jiménez-Moreno, N., Dias, I., Debelec, B., Vucetic, M., Fladmark, K. E., ... Cuadrado, A. (2015). Redox control of protein degradation. *Redox biology*, 6, 409-420.
- Palit, S., Kar, S., Sharma, G., & Das, P. K. (2015). Hesperetin Induces Apoptosis in Breast Carcinoma by Triggering Accumulation of ROS and Activation of ASK1/JNK Pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 230(8), 1729-39.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47.
- Pandey, M., Kaur, P., Shukla, S., Abbas, A., Fu, P., & Gupta, S. (2012). Plant flavone Apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo study. *Molecular carcinogenesis*, 51(12), 952-962.

- Pandey, P., Sayyed, U., Tiwari, R. K., Siddiqui, M. H., Pathak, N., & Bajpai, P. (2019). Hesperidin Induces ROS-Mediated Apoptosis along with Cell Cycle Arrest at G2/M Phase in Human Gall Bladder Carcinoma. *Nutrition and Cancer*, 71(4), 676-687.
- Pandey, V., Chaube, B., & Bhat, M. K. (2011). Hyperglycemia regulates MDR-1, drug accumulation and ROS levels causing increased toxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in MCF-7 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(10), 2942-52.
- Panieri, E., & Santoro, M. M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death & Disease*, 7(6), e2253.
- Panieri, E., Buha, A., Telkoparan-Akillilar, P., Cevik, D., Kouretas, D., Veskoukis, A., ... Saso, L. (2020). Potential Applications of NRF2 Modulators in Cancer Therapy. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(3), 193.
- Paredes-Gonzalez, X., Fuentes, F., Jeffery, S., Saw, C. L., Shu, L., Su, Z. Y., & Kong, A. N. (2015). Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones Apigenin and luteolin. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 36(7), 440-51.
- Park, C., Cha, H. J., Lee, H., Hwang-Bo, H., Ji, S. Y., Kim, M. Y., ... Choi, Y. H. (2019). Induction of G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Genistein in Human Bladder Cancer T24 Cells through Inhibition of the ROS-Dependent PI3k/Akt Signal Transduction Pathway. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(9), 327.
- Park, H. J., Choi, Y. J., Lee, J. H., & Nam, M. J. (2017). Naringenin causes ASK1-induced apoptosis via reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 1-8.
- Park, S., Lim, W., Bazer, F. W., & Song, G. (2018). Naringenin suppresses growth of human placental choriocarcinoma via reactive oxygen species-mediated P38 and JNK MAPK pathways. *Phytomedicine*, 50, 238-246.
- Park, W. H. (2018). Hydrogen peroxide inhibits the growth of lung cancer cells via the induction of cell death and G1-phase arrest. *Oncology Reports*, 40(3), 1787-1794.
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Salamon, I., & Bukovac, A. (2020). Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 122.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., ... Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 192-203.
- Perkins, N.D. (2012). The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12, 121-132.
- Petrylak, D. P., Ankerst, D. P., Jiang, C. S., Tangen, C. M., Hussain, M. H., Lara, P. N. ... Crawford, E. D. (2006). Evaluation of prostate-specific antigen declines for surrogacy in patients treated on SWOG 99-16. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 98(8), 516-21.
- Pfleger, C. M., Harvey, K. F., Yan, H., & Hariharan, I. K. (2007). Mutation of the gene encoding the ubiquitin activating enzyme ubal causes tissue overgrowth in Drosophila. *Fly (Austin)*, 1(2), 95-105.
- Pignitter, M., Schueller, K., Burkon, A., Knorr, V., Esefelder, L., Doberer, D., ... Somoza, V. (2016). Concentration-dependent effects of resveratrol and metabolites on the redox status of human erythrocytes in single-dose studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, 164-70.

- Ping, Q., Yan, R., Cheng, X., Wang, W., Zhong, Y., Hou, Z., ... Li, R. (2021). Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Therapy*, XXX doi:10.1038/s41417-021-00318-4.
- Poon, S. L., McPherson, J. R., Tan, P., Teh, B.T., & Rozen, S. G. (2014). Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. *Genome Medicine*, 6(3), 24.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-23.
- Qian, S., Golubnitschaja, O., & Zhan, X. (2019). Chronic inflammation: key player and biomarker-set to predict and prevent cancer development and progression based on individualized patient profiles. *EPMA Journal*, 10(4), 365-381.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., ... Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014, 761264.
- Rajabi, M., & Mousa, S. A. (2017). The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines*, 5(2), 34.
- Ramirez, C. N., Li, W., Zhang, C., Wu, R., Su, S., Wang, C., ... Kong, A. N. (2017). In Vitro-In Vivo Dose Response of Ursolic Acid, Sulforaphane, PEITC, and Curcumin in Cancer Prevention. *The AAPS Journal*, 20(1), 19.
- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., & Osborn, H. M. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(12), 2821-31.
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology*, 10(2), 63–89.
- Raza, M. H., Siraj, S., Arshad, A., Waheed, U., Aldakheel, F., Alduraywish, S., ... Arshad, M. (2017). ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(9), 1789-1809.
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., ... Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 9.
- Reczek, C. R., Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 8-13.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(12), 2977-2992.
- Rhee, S. G. (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882-3.
- Ribatti, D. (2017). The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*, 8(4), 7175-7180.
- Roberts, M. J., Teloken, P., Chambers, S. K., Williams, S. G., Yaxley, J., Samarasinghe, H., Frydenberg, M., Gardiner, R. A. Prostate Cancer Detection. In: K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, ... D. P. Wilson (Eds.) Endotext [Internet]. MDText.com, Inc.; South Dartmouth (MA), 2018.
- Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y. M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J. M., ... Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), 1215–1228.

- Rohrmann, S., Overvad, K., Bueno-de-Mesquita, H. B., Jakobsen, M. U., Egeberg, R., Tjønneland, A., ... Linseisen, J. (2013). Meat consumption and mortality--results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*, 11, 63.
- Rojo de la Vega, M., Chapman, E., & Zhang, D. D. (2018). NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*, 34(1), 21-43.
- Rolston, K. V. (2017). Infections in Cancer Patients with Solid Tumors: A Review. *Infectious diseases and therapy*, 6(1), 69–83.
- Rottach, A. M., Ahrend, H., Martin, B., Walther, R., Zimmermann, U., Burchardt, M., & Stope, M. B. (2019). Cabazitaxel inhibits prostate cancer cell growth by inhibition of androgen receptor and heat shock protein expression. *World Journal of Urology*, 37(10), 2137-2145.
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., & Chumakov, P. M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine*, 11(12), 1306–1313.
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., ... Martins, N. (2019). The Therapeutic Potential of Apigenin. *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1305.
- Salmani, J. M. M., Zhang, X. P., Jacob, J. A., & Chen, B. A. (2017). Apigenin's anticancer properties and molecular mechanisms of action: Recent advances and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(5), 321-329.
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K., ... Barford, D. (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*, 423(6941), 769-73.
- Samanta, D., & Semenza, G. L. (2017). Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. *Redox Biology*, 13, 331-335.
- Sarni, D., & Kerem, B. (2017). Oncogene-Induced Replication Stress Drives Genome Instability and Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1339.
- Savitsky, P. A., & Finkel, T. (2002). Redox regulation of Cdc25 C. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 20535–40.
- Scherz-Shouval, R., & Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(1), 30-8.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO Journal*, 26(7), 1749-60.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*, 24(10), R453–R462.
- Seiler, A., Chen, M. A., Brown, R. L., & Fagundes, C. P. (2018). Obesity, Dietary Factors, Nutrition, and Breast Cancer Risk. *Current breast cancer reports*, 10(1), 14–27.
- Semenza, G. L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3664-71.
- Senoune, S. R., Nelius, T., Jarvis, C., Pruitt, K., Kottapalli, K. R., & Filleur, S. (2020). The Wnt non-canonical signaling modulates cabazitaxel sensitivity in prostate cancer cells. *PLoS One*, 15(6), e0234078.

- Seo, Y. J., Kim, B. S., Chun, S. Y., Park, Y. K., Kang, K. S., & Kwon, T. G. (2011). Apoptotic effects of genistein, biochanin-A and Apigenin on LNCaP and PC-3 cells by p21 through transcriptional inhibition of polo-like kinase-1. *Journal of Korean medical science*, 26(11), 1489–1494.
- Seydi, E., Rasekh, H. R., Salimi, A., Mohsenifar, Z., & Pourahmad, J. (2016). Selective Toxicity of Apigenin on Cancerous Hepatocytes by Directly Targeting their Mitochondria. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(12), 1576-1586.
- Seydi, E., Salim, A., Rasekh, H. R., Mohsenifar, Z., & Pourahmad, J. (2018). Selective Cytotoxicity of Luteolin and Kaempferol on Cancerous Hepatocytes Obtained from Rat Model of Hepatocellular Carcinoma: Involvement of ROS-Mediated Mitochondrial Targeting. *Nutrition and Cancer*, 70(4), 594-604.
- Shao, W. Y., Yang, Y. L., Yan, H., Huang, Q., Liu, K. J., & Zhang, S. (2017). Phenethyl isothiocyanate suppresses the metastasis of ovarian cancer associated with the inhibition of CRM1-mediated nuclear export and mTOR-STAT3 pathway. *Cancer Biology & Therapy*, 18(1), 26-35.
- Shendge, A. K., Chaudhuri, D., & Mandal, N. (2021). The natural flavones, acacetin and Apigenin, induce Cdk-Cyclin mediated G2/M phase arrest and trigger ROS-mediated apoptosis in glioblastoma cells. *Molecular Biology Reports*, 48(1), 539-549.
- Shi, M. D., Shiao, C. K., Lee, Y. C., & Shih, Y. W. (2015). Apigenin, a dietary flavonoid, inhibits proliferation of human bladder cancer T-24 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer cell international*, 15, 33.
- Shi, Y., Nikulenkov, F., Zawacka-Pankau, J., Li, H., Gabdoulline, R., Xu, J., ... Selivanova, G. (2014). ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 21(4), 612-23.
- Shukla, S., & Gupta, S. (2007). Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle*, 6(9), 1102-14.
- Shukla, S., & Gupta, S. (2004). Molecular mechanisms for Apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Molecular Carcinogenesis*, 39(2), 114-26.
- Shukla, S., & Gupta, S. (2008). Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(10), 1833-45.
- Shukla, S., & Gupta, S. (2010). Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research*, 27(6), 962–978.
- Shukla, S., Bhaskaran, N., Babcook, M. A., Fu, P., Maclennan, G. T., & Gupta, S. (2014). Apigenin inhibits prostate cancer progression in TRAMP mice via targeting PI3K/Akt/FoxO pathway. *Carcinogenesis*, 35(2), 452–460.
- Shukla, S., Fu, P., & Gupta, S. (2014). Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis*, 19(5), 883-94.
- Shukla, S., Kanwal, R., Shankar, E., Datt, M., Chance, M. R., Fu, P., ... Gupta, S. (2015). Apigenin blocks IKK α activation and suppresses prostate cancer progression. *Oncotarget*, 6(31), 31216-32.

- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383.
- Silva, M., & Carvalho, M. D. G. (1992). Detoxification enzymes: cellular metabolism and susceptibility to various diseases. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 64(4), 307-310.
- Sivinski, J., Zhang, D. D., & Chapman, E. (2021). Targeting NRF2 to treat cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 5, S1044-579X(21)00171-1.
- Sloan, F. A., & Gelband, H. (2007). *Cancer control opportunities in low- and middle-income countries*. Washington ABD: National Academies Press
- Son, Y., Kim, S., Chung, H. T., & Pae, H. O. (2013). Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods in Enzymology*, 528, 27-48.
- Soundararajan, P., & Kim, J. S. (2018). Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers. *Molecules*, 23(11), 2983.
- Stegen, S., van Gastel, N., Eelen, G., Ghesquière, B., D'Anna, F., Thienpont, B., ... Carmeliet, G. (2016). HIF-1 α Promotes Glutamine-Mediated Redox Homeostasis and Glycogen-Dependent Bioenergetics to Support Postimplantation Bone Cell Survival. *Cell Metabolism*, 23(2), 265-79.
- Stopsack, K. H., Nandakumar, S., Wibmer, A. G., Haywood, S., Weg, E. S., Barnett, E. S., ... Abida, W. (2020). Oncogenic Genomic Alterations, Clinical Phenotypes, and Outcomes in Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 26(13), 3230-3238.
- Sun, Q., Lu, N. N., & Feng, L. (2018). Apigenin inhibits gastric cancer progression through inducing apoptosis and regulating ROS-modulated STAT3/JAK2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(1), 164-170.
- Sundarraaj, K., Raghunath, A., Panneerselvam, L., & Perumal, E. (2020). Fisetin, a phytopolyphenol, targets apoptotic and necroptotic cell death in HepG2 cells. *Biofactors*, 46(1), 118-135.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ... Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Swann, J. B., & Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1137-1146.
- Syed, V. (2016). TGF- β Signaling in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(6), 1279-87.
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO reports*, 3, 604-609.
- Sznarkowska, A., Kostecka, A., Meller, K., & Bielawski, K. P. (2017). Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*, 8(9), 15996-16016.
- Tafani, M., Sansone, L., Limana, F., Arcangeli, T., De Santis, E., Polese, M., ... Russo, M. A. (2016). The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 3907147.

- Tan, M. H., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. L. (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 36(1), 3-23.
- Tan, S. H., Petrovics, G., & Srivastava, S. (2018). Prostate Cancer Genomics: Recent Advances and the Prevailing Underrepresentation from Racial and Ethnic Minorities. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1255.
- Tang, D., Tao, D., Fang, Y., Deng, C., Xu, Q., & Zhou, J. (2017). TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Medical science monitor basic research*, 23, 141–149.
- Tang, K., Lin, Y., & Li, L. M. (2013). The role of phenethyl isothiocyanate on bladder cancer ADM resistance reversal and its molecular mechanism. *The Anatomical Record*, 296(6), 899-906.
- Tang, N. Y., Huang, Y. T., Yu, C. S., Ko, Y. C., Wu, S. H., Ji, B. C., ... Chung, J. G. (2011). Phenethyl isothiocyanate (PEITC) promotes G2/M phase arrest via p53 expression and induces apoptosis through caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways in human prostate cancer DU 145 cells. *Anticancer Research*, 31(5), 1691-702.
- Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., ... TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351(15), 1502-12.
- Taparia, S. S., & Khanna, A. (2016). Procyanidin-rich extract of natural cocoa powder causes ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis and reduction of pro-MMP-2 in epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 130-140.
- Tavsan, Z., & Kayali, H. A. (2019). Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116, 109004.
- Telkoparan-Akillilar, P., Panieri, E., Cevik, D., Suzen, S., & Saso, L. (2021). Therapeutic Targeting of the NRF2 Signaling Pathway in Cancer. *Molecules*, 26(5), 1417.
- Thanan, R., Techasen, A., Hou, B., Jamnongkan, W., Armartmuntree, N., Yongvanit, P., & Murata, M. (2015). Development and characterization of a hydrogen peroxide-resistant cholangiocyte cell line: A novel model of oxidative stress-related cholangiocarcinoma genesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(1), 182-8.
- Timms, B. G. (2008). Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*. 2008 Jul;76(6):565-77.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., ... Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Reports*, 2(3), 222-8.
- Toivanen, R., & Shen, M. M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development (Cambridge, England)*, 144(8), 1382–1398.
- Tonelli, C., Chio, I., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & redox signaling*, 29(17), 1727–1745.

- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), 579-91.
- Trachootham, D., Zhang, W., & Huang, P. (2009). Oxidative Stress and Drug Resistance in Cancer. In Z. Siddik, K. Mehta (Eds.), *Drug Resistance in Cancer Cells* (pp. 137-175). Springer, New York, NY.
- Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., ... Huang, P. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*, 10(3), 241-52.
- Trybek, T., Kowalik, A., Gózdź, S., & Kowalska, A. (2020). Telomeres and telomerase in oncogenesis. *Oncology letters*, 20(2), 1015–1027.
- Tsao, C. K., Cutting, E., Martin, J., & Oh, W. K. (2014). The role of cabazitaxel in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Therapeutic Advances in Urology*, 6(3), 97-104.
- Ujiki, M. B., Ding, X. Z., Salabat, M. R., Bentrem, D. J., Golkar, L., Milam, B., ... Adrian, T. E. (2006). Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Molecular cancer*, 5, 76.
- Valdameri, G., Trombetta-Lima, M., Worfel, P. R., Pires, A. R., Martinez, G. R., Noleto, G. R., ... Rocha, M. E. (2011). Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by Apigenin in HepG2 human hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions*, 193(2), 180-9.
- van Elsland, D., & Neefjes, J. (2018). Bacterial infections and cancer. *EMBO reports*, 19(11), e46632.
- Van Houten, B., Woshner, V., & Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*, 5(2), 145-52.
- van Soest, R. J., de Morrée, E. S., Kweldam, C. F., de Ridder, C. M. A., Wiemer, E. A. C., Mathijssen, R. H. J., ... van Weerden, W. M. (2015). Targeting the Androgen Receptor Confers In Vivo Cross-resistance Between Enzalutamide and Docetaxel, But Not Cabazitaxel, in Castration-resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 67(6), 981-985.
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, 13(7), 379-86.
- Vollrath, V., Wielandt, A. M., Iruretagoyena, M., & Chianale, J. (2006). Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *The Biochemical journal*, 395(3), 599–609.
- Vrignaud, P., Sémiond, D., Lejeune, P., Bouchard, H., Calvet, L., Combeau, C., ... Bissery, M. C. (2013). Preclinical antitumor activity of cabazitaxel, a semisynthetic taxane active in taxane-resistant tumors. *Clinical Cancer Research*, 19(11), 2973-83.
- Wang, H., Jiang, H., Corbet, C., de Mey, S., Law, K., Gevaert, T., ... De Ridder, M. (2019). Piperlongumine increases sensitivity of colorectal cancer cells to radiation: Involvement of ROS production via dual inhibition of glutathione and thioredoxin systems. *Cancer Letters*, 450, 42-52.
- Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & Therapy*, 7(12), 1875-84.

- Wang, J., Luo, B., Li, X., Lu, W., Yang, J., Hu, Y., ... Wen, S. (2017). Inhibition of cancer growth in vitro and in vivo by a novel ROS-modulating agent with ability to eliminate stem-like cancer cells. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2887.
- Wang, K., Ming, H., Zuo, J., Tian, H. L., & Huang, C. H. (2021). A Review of the Redox Regulation of Tumor Metabolism. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 52(1), 57-63.
- Wang, L. G., Liu, X. M., & Chiao, J. W. (2006). Repression of androgen receptor in prostate cancer cells by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*, 27(10), 2124-32.
- Wang, Q., & Bao, Y. (2021). Nanodelivery of natural isothiocyanates as a cancer therapeutic. *Free Radical Biology & Medicine*, 167, 125-140.
- Wang, Q., Wang, H., Jia, Y., Pan, H., & Ding, H. (2017). Luteolin induces apoptosis by ROS/ER stress and mitochondrial dysfunction in gliomablastoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79(5), 1031-1041.
- Wang, X., Govind, S., Sajankila, S. P., Mi, L., Roy, R., & Chung, F. L. (2011). Phenethyl isothiocyanate sensitizes human cervical cancer cells to apoptosis induced by cisplatin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(10), 1572-81.
- Wang, X., Li, Y., Li, J., Li, L., Zhu, H., Chen, H., ... Sun, B. (2019). Cell-in-Cell Phenomenon and Its Relationship With Tumor Microenvironment and Tumor Progression: A Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 311.
- Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., ... Liu, H. X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*, 11(10), 4839-4857.
- Wang, Z. X., Ma, J., Li, X. Y., Wu, Y., Shi, H., Chen, Y., ... Zhou, J. (2021). Quercetin induces p53-independent cancer cell death through lysosome activation by the transcription factor EB and Reactive Oxygen Species-dependent ferroptosis. *British Journal of Pharmacology*, 178(5), 1133-1148.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-14.
- Weinberg, F., Ramnath, N., & Nagrath, D. (2019). Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers*, 11(8), 1191.
- Wek, R. C., & Cavener, D. R. (2007). Translational control and the unfolded protein response. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(12), 2357-71.
- Wilkie-Grantham, R. P., Matsuzawa, S., & Reed, J. C. (2013). Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein. *The Journal of biological chemistry*, 288(18), 12777-12790.
- Wink, D. A., Hines, H. B., Cheng, R. Y., Switzer, C. H., Flores-Santana, W., Vitek, M. P., ... Colton, C. A. (2011). Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(6), 873-91.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 278-86.
- Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(5), 549-61.
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, 25(2), 85-101.
- Wu, D., Zhang, J., Wang, J., Li, J., Liao, F., & Dong, W. (2016). Hesperetin induces apoptosis of esophageal cancer cells via mitochondrial pathway mediated by the increased intracellular reactive oxygen species. *Tumour Biology*, 37(3):3451-9.

- Wu, S., Lu, H., & Bai, Y. (2019). Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Medicine*, 8(5), 2252-2267.
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., & Hannun, Y. A. (2016). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529(7584): 43-7.
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature communications*, 9(1), 3490.
- Xia, C., Meng, Q., Liu, L. Z., Rojanasakul, Y., Wang, X. R., & Jiang, B. H. (2007). Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Research*, 67(22), 10823-30.
- Xiao, D., Lew, K. L., Zeng, Y., Xiao, H., Marynowski, S. W., Dhir, R., & Singh, S. V. (2006). Phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species-dependent disruption of the mitochondrial membrane potential. *Carcinogenesis*, 27(11), 2223-34.
- Xiao, D., Powolny, A. A., Moura, M. B., Kelley, E. E., Bommarreddy, A., Kim, S. H., ... Singh, S. V. (2010). Phenethyl isothiocyanate inhibits oxidative phosphorylation to trigger reactive oxygen species-mediated death of human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26558-69.
- Xu, C., Yuan, X., Pan, Z., Shen, G., Kim, J. H., Yu, S., ... Kong, A. N. (2006). Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1918-26.
- Xu, M., Wang, S., Song, Y. U., Yao, J., Huang, K., & Zhu, X. (2016). Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Letters*, 11(5), 3075-3080.
- Xu, X., Li, M., Chen, W., Yu, H., Yang, Y., & Hang, L. (2016). Apigenin Attenuates Oxidative Injury in ARPE-19 Cells thorough Activation of Nrf2 Pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 4378461.
- Yan, G., Elbadawi, M., & Efferth, T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal*, 2, 39-48.
- Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., & Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell & Bioscience*, 7, 50.
- Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., ... Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 37(1), 266.
- Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., ... Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156(1-2), 317-331.
- Yao, Y., & Dai, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*, 5, 1000165.
- Yen, G. C., Duh, P. D., Tsai, H. L., & Huang, S. L. (2003). Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(6), 1215-22.
- Yin, P., Kawamura, T., He, M., Vanaja, D. K., & Young, C. Y. (2009). Phenethyl isothiocyanate induces cell cycle arrest and reduction of alpha- and beta-tubulin isotypes in human prostate cancer cells. *Cell biology international*, 33(1), 57-64.

- Yoboue, E. D., Sitia, R., & Simmen, T. (2018). Redox crosstalk at endoplasmic reticulum (ER) membrane contact sites (MCS) uses toxic waste to deliver messages. *Cell Death & Disease*, 9(3), 331.
- Yu, C., Gong, A. Y., Chen, D., Solelo Leon, D., Young, C. Y., & Chen, X. M. (2013). Phenethyl isothiocyanate inhibits androgen receptor-regulated transcriptional activity in prostate cancer cells through suppressing PCAF. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(10), 1825-33.
- Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y., & Chen, G. (2017). Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21, 648-657.
- Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2020). Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1):209.
- Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G. L., & Prabhakar, N. R. (2008). Induction of HIF-1α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *Journal of cellular physiology*, 217(3), 674–685.
- Yuan, J. M., Stepanov, I., Murphy, S. E., Wang, R., Allen, S., Jensen, J., ... Hecht, S. S. (2016). Clinical Trial of 2-Phenethyl Isothiocyanate as an Inhibitor of Metabolic Activation of a Tobacco-Specific Lung Carcinogen in Cigarette Smokers. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 9(5), 396–405.
- Yun, C. W., & Lee, S. H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3466.
- Zaidieh, T., Smith, J. R., Ball, K. E., & An, Q. (2019). ROS as a novel indicator to predict anticancer drug efficacy. *BMC Cancer*, 19(1), 1224.
- Zhang, H., Trachootham, D., Lu, W., Carew, J., Giles, F. J., Keating, M. J., ... Huang, P. (2008). Effective killing of Gleevec-resistant CML cells with T315I mutation by a natural compound PEITC through redox-mediated mechanism. *Leukemia*, 22(6), 1191–1199.
- Zhang, J., Duan, D., Song, Z. L., Liu, T., Hou, Y., & Fang, J (2021). Small molecules regulating reactive oxygen species homeostasis for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 342-394.
- Zhang, J., Song, J., Wu, D., Wang, J., & Dong, W. (2015). Hesperetin induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via mitochondrial pathway mediated by the increased intracellular reactive oxygen species, ATP and calcium. *Medical Oncology*, 32(4), 101.
- Zhang, J., Zhao, X., Zhu, H., Wang, J., Ma, J., & Gu, M. (2019). Apigenin Protects Against Renal Tubular Epithelial Cell Injury and Oxidative Stress by High Glucose via Regulation of NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Pathway. *Medical Science Monitor*, 25, 5280-5288.
- Zhang, L., Cheng, X., Gao, Y., Zheng, J., Xu, Q., Sun, Y., ... Sun, Z. (2015). Apigenin induces autophagic cell death in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells. *Food and Function*, 6(11), 3464-72.
- Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J., & Song, Z. (2017). Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. *Oncology Reports*, 37(4), 2277-2285.
- Zheng, J. (2013). Oncogenic chromosomal translocations and human cancer (review). *Oncology Reports*, 30(5), 2011-9.

- Zhu, J., Wang, H., Chen, F., Fu, J., Xu, Y., Hou, Y., ... Pi, J. (2016). An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, 99, 544-556.
- Zhu, Y., Mao, Y., Chen, H., Lin, Y., Hu, Z., Wu, J., ... Xie, L. (2013). Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells. *Cancer Cell International*, 13(1), 54.
- Zhu, Y., Wu, J., Li, S., Wang, X., Liang, Z., Xu, X., ... Xie, L. (2015). Apigenin inhibits migration and invasion via modulation of epithelial mesenchymal transition in prostate cancer. *Molecular Medicine Reports*, 11(2), 1004-8.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

5-FU	: 5-fluorourasil
ABC	: ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcıları
ADT	: Androjen deplesyon tedavisi
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AKT	: Kinaz B protein
ALOX5	: Araşidonat 5-lipoksijenaz
ALT	: Alternatif telomer uzatıcı
AP-1	: Aktivatör protein-1
APC	: Adenomatous polyposis coli
AR	: Androjen reseptörü
ARE	: Androjen cevap elementi
ARE	: Antioksidan cevap elementi
ARSI	: AR sinyalizasyon inhibitörleri
ASAP	: Atipik küçük asiner proliferasyon
ASK1	: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1
ATM	: Ataksi telanjiektazi ilişkili gen
ATO	: Arsenik trioksit
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
ATR	: Ataksi telanjiektazi ve Rad3 ilişkili gen
Bad	: Bcl-2-ilişkili hücre ölümü agonisti
Bak	: Bcl-2 homolog antagonisti
Bax	: Bcl-2-ilişkili X protein
Bcl-2	: B hücreli lenfoma-2 anti-apoptotik protein
Bcl-X_L	: B hücreli lenfoma-ekstra büyük anti-apoptotik protein
Bcr-Abl	: Böbrek karsinom antijeni- tirozin-protein kinaz ABL1
Bim	: Bcl-2 benzeri protein 11
BRCA1	: Meme kanseri geni 1
BRCA2	: Meme kanseri geni 2
BRIP1	: BRCA1 ilişkili helikaz 1
BSO	: Buthionin sulfoksimin
Cdc25	: M faz tetikleyici fosfataz 3
CDKN2A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
c-FLIP	: FLICE inhibitör protein
CHEK2	: Checkpoint kinaz 2
c-myc	: MYC proto-onkogen, BHLH transkripsiyon faktörü
COX2	: Siklooksijenaz 2
CTNNB1	: Katenin beta 1
CUL3	: Cullin-3
CuZnSOD	: Bakır çinko süperoksit dismutaz
DHE	: Dihidrotosteron
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR4/5	: Ölüm reseptörü 4/5
DRE	: Dijital rektal muayene
EBRT	: Eksternal beam radyoterapi

ECGC	: Epigallokateşin gallat
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
eIF2a	: Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	: Endoplazmik retikulum
ERG	: ETS-ilişkili gen
ERK	: Mitojenle aktiveştirilen protein kinaz kinaz
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FHC	: Ferritin ağır zinciri
FOXA1	: Forkhead Box A1
FOXO	: Forkhead/winged helix box
Gadd45	: JNK aracılı hücre ölümü inhibitörü
GLUT1	: Glukoz taşıyıcısı 1
GLUT3	: Glukoz taşıyıcısı 3
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GRX	: Glutaredoksin
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta
GSSG	: Oksidize glutasyon
GST	: Glutasyon-S-transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HDAC	: Histon deasetilaz
Hif-α	: Hipoksi ile uyarılan faktör-α
hMLH1	: İnsan mutL homolog 1
hMSH2	: İnsan mutS homolog 2
hMSH6	: İnsan mutS homolog 6
HO-1	: Hem oksijenaz-1 enzim
HOXB13	: Homeobox B13
HPC1	: Herediter prostat kanseri geni 1
HPC2	: Herediter prostat kanseri geni 2
HPC20	: Herediter prostat kanseri geni 20
HPCX	: Herediter prostat kanseri geni X
hPMS2	: PMS1 homolog 2
HRE	: Hipoksiye duyarlı elementler
HSF-1	: Isı şok faktör-1
IAP	: Apoptoz inhibitör proteinleri
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IDH1	: İzositrat dehidrogenaz
IFN-γ	: Interferon gamma
IKK	: IκB kinazları
IL	: İnterlökin
ITC	: İzotiyosiyanat
IκB	: İnhibitör kappa B
JAK	: Janus kinaz
JNK	: The c-Jun N-terminal kinaz
Keap1	: Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1
KLK3	: Kallikrein ilişkili peptidaz 3

LHRH	: Luteinize edici hormon salan hormon
LOX	: Lipogenaz
MAPK	: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
MHC-I	: Majör doku uygunluk kompleksi-I
mKDPK	: Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri
mKSPK	: Metastatik kastrasyona duyarlı prostat kanseri
MMP	: Matriks metalloproteinaz
Mn-SOD (SOD2)	: Mitokondriyal manganez süperoksit dismutaz
MRP1	: Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1
Mt-ETS	: Mitokondriyal elektron transport zinciri
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBS1	: Nibrin
NCCN	: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NKX3-1	: NK3 Homeobox 1
NO	: Nitrik oksit
NOS2	: Nitrik oksit sentaz 2
NOX	: NADPH oksidaz
NQO1	: NAD(P)H-kinon oksidoredüktaz
Nrf2	: Nükleer faktör-eritroid 2 p45 ilişkili faktör 2
O₂	: Moleküler oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
O₃	: Ozon
OH-	: Hidroksit
OH•	: Hidroksil radikali
ONOO-	: Peroksinitrit
PALB2	: BRCA2 ortağı ve yerini belirleyicisi
PARP	: Poli (ADP Riboz) Polimeraz
PCA3	: Prostat kanser antijen-3
PD-1	: Programlı hücre ölüm reseptörü-I
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü
PD-L1	: Programlı hücre ölüm ligandı-I
PEITC	: Fenetil izotiyosiyanat
PERK	: ER transmembran protein kinaz
P-gp	: P-glikoprotein
PHD2	: Prolil hidroksilaz domain 2
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIN	: Prostatik intraepitelial neoplazi
PK	: Prostat kanseri
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PKD1	: Polisitistin 1
PRX	: Peroksiredoksin
PSA	: Prostat spesifik antijen
PTEN	: Fosfataz ve tensin homoloğu
PUMA	: p53 yukarı regüle edilmiş apoptozis

RAS	: Rat sarkoma
Rb	: Retinoblastoma
RBX1	: ring-box 1
RCOOONO₂	: Peroksinitrat
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SESN3	: Sestrin-3
SMAC/DIABLO	: İkinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü
SMAD	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta aracısı
sMAF	: Küçük muskuloaponeotik fibrosarkom proteinleri
Snail	: Çinko parmak proteini SNAI1
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOD3	: Süperoksit dismutaz 3
SPINK1	: Serin peptidaz inhibitör kazal tip 1
SPOP	: Speckle type POZ protein
Src	: Non-reseptör tirozin kinaz
STAT	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TMPRSS2	: Transmembran proteaz serin 2
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TRAF1	: TNF reseptörü ile ilişkili faktör 1
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
TRUS	: Transrektal ultrason eşliğinde prostat biyopsisi
TRX	: Thioredoksin
TUBB3	: Tubulin beta sınıf III
UPR	: Katlanamayan protein yanıtı
UV	: Ultraviyole
VDAC	: Voltaj-bağımlı anyon kanalları
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VHL	: Von Hippel-Lindau tümör süpressör
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Wnt	: Wingless ile ilgili entegrasyon bölgesi
XIAP	: X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü
XO	: Ksantin oksidaz
XOR	: Ksantin oksidoredüktaz

8. TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilime olan ilgimi ve sevgimi sürekli arttıran, bana bilimle uğraşmanın kıymetli olduğunu öğreten, beni her koşulda yüreklendiren, cesaretlendiren ve desteğini hep arkamda hissettiğim, doktora tez çalışmam boyunca da bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, bilimsel yolculuğuma ışık tutarak beni bugünlere getiren kıymetli danışman hocam BUÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanı Sn. **Prof. Dr. Ünal EGELİ**'ye;

İlgisi, bilgisi, tecrübesi ve sonsuz desteği ile lisansüstü eğitim hayatımda her zaman yanımda olan, tez çalışmalarım süresince de yardımlarını hiçbir koşulda esirgemeyen TİK üyesi değerli hocam BUÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi Sn. **Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER**'e;

Tez süresi boyunca değerli görüşleri ve motivasyonu için TİK üyesi BUÜ Fen Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD öğretim üyesi Sn. **Prof. Dr. Tolga CAVAŞ**'a;

Prostat kanseri konusunda klinik bilgi birikiminin artmasında ve bu alanda ilerlememde çok kıymetli katkıları bulunan BUÜ Tıp Fakültesi Üroloji AD öğretim üyesi Sn. **Prof. Dr. Hakan VURUŞKAN**'a, Koç Üniversitesi Üroloji AD öğretim üyesi Sn. **Prof. Dr. Yakup KORDAN**'a ve tez çalışmam süresince manevi desteklerini de hep hissettiğim değerli hocam BUÜ Tıp Fakültesi Patoloji AD öğretim üyesi Sn. **Doç. Dr. Berna AYTAÇ VURUŞKAN**'a; BUÜ Tıp Fakültesi'nde görev yapan, araştırma projelerinde birlikte çalıştığımız ve doktora eğitimimde katkıları bulunan **tüm hocalarıma**;

Laboratuvar aşamasında sağlamış oldukları değerli teknik destek için BUÜ Dış Hekimliği Fakültesi Temel Bilimler AD Başkanı Sn. **Prof. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL**'a, BUÜ Fen Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD öğretim üyesi Sn. **Doç. Dr. Özgür VATAN**'a; tecrübelerini benimle paylaşarak tez çalışmama değerli katkılar sağlayan Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi Sn. **Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER**'e;

Tez ve diğer proje çalışmalarımda bana her zaman yardımcı olan, moral ve motivasyonu ile de hep yanımda olduğunu hissettiğim Sn. **Ayten HACİEFENDİ**'ye, tezime sağladığı çok değerli katkılar ve manevi destekleri için Sn. **Ceyda ÇOLAKOĞLU**'na ve BUÜ Tıp Fakültesi **Tıbbi Biyoloji AD idari personeline**;

Hayatımdaki karşılıksız, koşulsuz ve sınırsız destekleri için **kıymetli aileme**; zorlu süreçteki tüm fedakarlıkları, destekleri ve güzel kalpleri için en kıymetlilerim sevgili eşim **Erhan ERYILMAZ**'a ve biricik yavrum **Ezel ERYILMAZ**'a;

sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

BUAP(T)-2015/4 ve DDP(T)-2019/1 numaralı projeler ile tezime sağladığı maddi destekten dolayı BUÜ BAP birimine teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

18.06.1988 Eskişehir doğumludur. Orta öğrenimini 2006 yılında İzmir Kız Lisesi'nde tamamlamıştır. 2006-2007 eğitim-öğretim yılında Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne girmeye hak kazanmıştır. 2007 yılında Haliç Üniversitesi'nden bölüm ikinciliği derecesi ile İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümüne yatay geçiş hakkı kazanmış ve 2010 Haziran döneminde mezun olarak lisans derecesini almıştır. Şubat 2011'de Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Aralık 2013'de Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. Şubat 2014'de aynı Anabilim Dalı bünyesinde lisansüstü eğitim programlarına başlamak ve tamamlamak üzere 2547 sayılı YÖK kanununun 35. maddesi ile Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na görevlendirilmiştir. “*İki Farklı Juniperus Türü (Juniperus Communis L. Var. Saxatilis Pall. Ve Juniperus Excelsa M. Bieb. Subsp. Excelsa) 'ne Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin DU145 ve PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksik ve Antitümöral Etkilerinin Araştırılması*” başlıklı yüksek lisans tezini Prof. Dr. Ünal Egeli danışmanlığında Ocak 2016'da tamamlayarak aynı dönemde doktora eğitimine başlamıştır. Mart 2018'de doktora yeterlilik sınavını başarı ile geçmiştir. BUÜ BAP tarafından BUAP(T)-2015/4 ve DDP(T)-2019/1 proje numaraları ile desteklenen “*Farklı Direnç Fenotiplerine Sahip Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apigenin ve Fenetil İzotiyosiyanat (PEITC) Kombinasyonu ile Oluşturulan Prooksidan Kanser Terapi Modeli Etkinliğinin ve Moleküler Hedeflerinin Araştırılması*” doktora tez çalışmasını gerçekleştirmiştir. Halen aynı Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmakta olup prostat kanseri, moleküler onkoloji ve nörogenetik alanlarında proje çalışmalarına devam etmektedir. BUÜ BAP tarafından desteklenen pek çok projede araştırmacı olarak görev almıştır. Bugüne kadar SCI, SCI-Exp, ESCI kapsamında basılı 16 adet uluslararası makalesi, bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan 19 adet uluslararası ve 10 adet ulusal bildirisi bulunmaktadır. 2019 yılında Üroonkoloji'19 Temel Bilim Araştırma Dalı En İyi Araştırma Ödülü'nü kazanmıştır. TÜBİTAK 2242-Üniversite Öğrencileri Araştırma Proje Yarışmaları-2020 Sağlık Alanı Bölge Üçüncülük Ödülü'ne layık görülen öğrenci projesinin danışmanlığını yürütmüştür. Yabancı dili ingilizcedir. Evli ve bir çocuk annesidir.