



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

**İKİ FARKLI *JUNIPERUS* TÜRÜ**  
**(*Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa*)'NE AİT YAPRAK VE MEYVE ÖZÜTLERİNİN DU145 VE PC-3 PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK VE ANTİTÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Işıl Ezgi ERYILMAZ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**Bursa-2016**



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

İKİ FARKLI *JUNIPERUS* TÜRÜ  
(*Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa*)'NE  
AİT YAPRAK VE MEYVE ÖZÜTLERİNİN DU145 VE PC-3 PROSTAT KANSERİ  
HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK VE ANTİTÜMÖRAL ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Işıl Ezgi ERYILMAZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Ünal EGELİ




Bursa-2016



Bu tez, Uludağ Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından HDP(T)-2014/34 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Işıl Ezgi Eryılmaz tarafından hazırlanan "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" konulu Yüksek Lisans tezi 08/01/2016 günü, 11:00-12:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Ünal Egeli	
Üye	Prof. Dr. Berrin Tunca	
Üye	Doç. Dr. Didem Turgut Coşan	
Üye		
Üye		

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülgen GÜNAY

Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	IV
İNGİLİZCE ÖZET.....	V
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
Prostat Bezinin Yapısı ve Fonksiyonu.....	3
Prostat Kanseri, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	4
Prostat Kanserinde Klinik ve Histopatolojik Evreleme.....	7
Prostat Kanserinin Farklı Prognostik Özelliklere Sahip Formları.....	10
Lokalize Prostat Kanseri.....	10
Lokal İleri (Metastatik) Prostat Kanseri.....	11
Kastrasyon Dirençli Prostat Kanseri.....	11
Prostat Kanserinde Mevcut Tedaviler.....	11
Aktif İzlem.....	11
Radikal Prostatektomi.....	12
Radyasyon Terapi.....	12
Endokrin Terapi.....	12
Kemoterapi.....	13
Prostat Kanseri Patogenezinde Rol Alan Genetik Mekanizmalar.....	14
Prostat Kanseri İçin Risk Faktörü Oluşturan Gen Polimorfizmleri.....	14
Prostat Kanserinde Somatik Genetik ve Epigenetik Değişimler.....	15
Tümör Süpresör Genler.....	16
Onkogenler.....	17
Prostat Kanseri Progresyonundan ve Kastrasyon Direncinden Sorumlu Tutulan Moleküler Değişimler.....	18
Hücre Ölümü ve Kansere İlişkisi.....	19
Kanser Tedavisinde Hedef Olarak Programlı Hücre Ölüm Tipleri.....	20
Kansere Hücrelerinde İnvaziv Süreçler.....	23
Prostat Kanserinde İnvaziv Süreçler ve Moleküler Mekanizmaları.....	23
Matriks Metalloproteinaz (MMP) Ailesinin Prostat Kanserinde İnvaziv Süreçlerdeki Etkileri.....	25
Matriks Metalloproteinaz Enzimlerinin Regülasyonu.....	26
Prostat Kanserinde Matriks Metalloproteinazların Fonksiyonu ve Regülasyonu.....	27
Matriks Metalloproteinaz- 2 (MMP-2).....	29
Matriks Metalloproteinaz- 9 (MMP-9).....	29
Kanser Tedavisinde Bitkilerin Yeri ve Önemi.....	30
<i>Juniperus L.</i> (Ardıç) Bitkisi.....	30
Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen <i>Juniperus L.</i> Türleri.....	31
<i>Juniperus L.</i> Türlerinin Farmakolojik Özellikleri.....	31
<i>Juniperus L.</i> Türlerinin Antitümöral Özellikleri.....	32
GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
Gereç.....	36
Kullanılan Cihazlar.....	36

Kullanılan Kimyasallar.....	37
Prostat Kanseri Model Hücre Hatları.....	38
DU145 (ATTC ® HTB-81™) Prostat Kanseri Hücre Hattı.....	38
PC-3 (ATTC ® CRL-1435™) Prostat Kanseri Hücre Hattı.....	38
HUVEC (ATTC ® CRL-1730™) İnsan Normal Hücre Hattı.....	38
Yöntem.....	38
Bursa Uludağ'da Doğal Olarak Yetişen <i>Juniperus L.</i> Türlerinin Toplanması.....	38
<i>Juniperus communis L. var. saxatilis</i> Pall. ve <i>Juniperus excelsa M. Bieb.</i> subsp. <i>excelsa</i> Türlerine Ait Yaprak ve Meyvelerden Sulu Özüt Hazırlanması.....	39
<i>Juniperus communis L. var. saxatilis</i> Pall. ve <i>Juniperus excelsa M. Bieb.</i> subsp. <i>excelsa</i> Türlerinin Yaprak ve Meyvelerinden Hazırlanan Özütlerin Fenolik İçeriklerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Analizi.....	40
<i>Juniperus communis L. var. saxatilis</i> Pall. ve <i>Juniperus excelsa M. Bieb.</i> subsp. <i>excelsa</i> Türlerinin Yaprak ve Meyvelerine Ait Özütler ile Prostat Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Gerçekleştirilen <i>in vitro</i> Deneyle.....	41
Hücre Kültürü.....	41
Hücre Hatlarının Dondurulması.....	41
Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi.....	42
Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	42
Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	42
Sitoksisite Deneyle.....	43
WST-1 Analizi.....	43
Hücre Ölümü Analizine Yönelik Deneyle.....	44
Hücre Ölümünün Morfolojik Değerlendirilmesi.....	44
Hoechst - Propidyum İyodid (PI) Boyama Yöntemi.....	45
Hücre Ölümünün İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi.....	46
Annexin V Analizi.....	46
<i>Juniperus communis L. var. saxatilis</i> Pall. ve <i>Juniperus excelsa M. Bieb.</i> subsp. <i>excelsa</i> Türlerinin Yaprak ve Meyvelerine Ait Özütlerinin Prostat Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Antitümöral Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	47
Hücrelerden RNA İzolasyonu.....	47
RNA'dan cDNA Sentezi.....	47
<i>MMP-2</i> ve <i>MMP-9</i> Gen Ekspresyon Düzeylerinin Real Time Kantitatif PCR (RT-qPCR) Yöntemi ile Belirlenmesi.....	48
İstatistiksel Analizler.....	50
<b>BULGULAR.....</b>	<b>51</b>
<i>Juniperus L.</i> Türlerine Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin DU145 ve PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hatları ile HUVEC Normal Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....	51
<i>Juniperus communis L. var. saxatilis</i> Pall. Türüne Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin Sitotoksik Etkisi.....	51
<i>Juniperus excelsa M. Bieb.</i> subsp. <i>excelsa</i> Türüne Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin Sitotoksik Etkisi.....	60
<i>Juniperus communis L. var. saxatilis</i> Pall. ve <i>Juniperus excelsa M. Bieb.</i> subsp. <i>excelsa</i> Türlerine Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin DU145 ve PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hatları ile HUVEC Normal Hücre Hattında Hücre Ölümü Üzerine Etkileri.....	69

Morfolojik Analiz.....	69
İmmünohistokimyasal Analiz.....	71
<i>Juniperus communis</i> L. var. <i>saxatilis</i> Pall. ve <i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb. subsp. <i>excelsa</i> Türlerinin Yaprak ve Meyvelerine Ait Özütlerin DU145 ve PC-3 Hücre Hatlarında <i>MMP-2</i> ve <i>MMP-9</i> Gen Ekspresyon Düzeylelerine Etkisi.....	72
<i>Juniperus communis</i> L. var. <i>saxatilis</i> Pall. ve <i>Juniperus excelsa</i> M. Bieb. subsp. <i>excelsa</i> Türlerinin Yaprak ve Meyvelerinden Hazırlanan Özütlerin Fenolik İçeriklerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Analizi.....	80
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR.....	96
TEŞEKKÜR.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	114

## ÖZET

Günümüzde kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK) mevcut taksan türevi ilaçlar ile etkin tedavi edilememektedir. KDPK tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekmekte ve bu anlamda biyoaktif moleküllerin zengin kaynakları olarak bitkiler yoğun ilgi çekmektedir. Son yıllarda sahip olduğu antitümöral özellikteki bileşikler nedeni ile *Juniperus* L. türlerinin kanser tedavisinde faydalanılabilecek bitkiler arasında yer alabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen çalışmada Türkiye florasında yetişen iki farklı *Juniperus* L. türüne ait yaprak ve meyve sulu özütlerinin iki farklı KDPK hücre hattı ve bir normal hücre hattında sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Sitotoksikite analizine göre *Juniperus* L. özütlerinin KDPK hücreleri üzerindeki seçici sitotoksik etkisinin doz-zaman bağımlı arttığı bulunmuştur. Hücre ölümünün morfolojik ve immünohistokimyasal analizlerine göre 48 saatlik özüt uygulamasında erken apoptozda artış saptanırken, 72 saatlik özüt uygulamasında yüksek oranda geç apoptotik ve daha az oranda nekrotik hücre ölümü belirlenmiştir. Türler arasında *J. excelsa*'nın, tür içinde ise yaprak özütlerinin daha etkili olduğu bulunmuştur. HPLC-DAD analizi ile özütlerin farklı sayıda ve miktarda fenolik bileşik içerdiği saptanmış ve saptanan fenolik bileşiklerin yaprak özütlerinde daha çok olmak üzere klorojenik asit, ferulik asit, gallik asit, kaempferol-3-glikozit, rutin ve t-cinnamik asit olduğu belirlenmiştir. RT-qPCR analizine göre *Juniperus* L. özütlerinin KDPK hücre hatlarında *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarında (sırasıyla  $p<0.01$  ve  $p<0.05$ ) anlamlı azalışa yol açtığı saptanmıştır.

Mevcut tez çalışması ile *Juniperus* L. özütlerinin KDPK hücre hatlarındaki antitümöral etkileri literatürde ilk kez araştırılmıştır. Bulgularımız doğrultusunda *Juniperus* L. türlerinin, kanser tedavisinde yeni terapötik aday araştırmaları için önemli bitki türleri arasında yer alabileceğini ve ileri ilaç araştırmalarında *Juniperus* L. türlerinde bulunan küçük moleküllerin umut vaat eden bileşikler olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** *Juniperus*, prostat kanseri, KDPK, sitotoksik etki



## SUMMARY

### **Investigation of Cytotoxic and Antitumoral Effects of Leaf and Berry Extracts from Two Different *Juniperus* Species (*Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. and *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa*) on DU145 and PC-3 Prostate Cancer Cell Lines**

Nowadays, castration resistant prostate cancer (CRPC) can not be effectively treated with available taxane derivatives. It is needed to develop new approaches for the treatment of CRPC. In this sense, plants, the richest source of bioactive molecules, have attracted interest. In recent years, cause of having compounds with antitumor properties, *Juniperus* L. species is thought to be among the plants that can be utilized in cancer therapy.

In the present study, cytotoxic effects of leaf and berries aqueous extracts of two different *Juniperus* L. from Turkey on CRPC and a normal cell lines were evaluated. It was determined that selective cytotoxic effects of the extracts on CRPC cell lines was increased dose and time dependent manner. According to the morphological and immunohistochemical analysis of cell death, while an increase was detected in early apoptosis after 48 h, for 72 h application higher rate of late apoptotic and lower rate of necrotic cell death were detected. More cytotoxic effect was revealed in *J. excelsa* extracts between two species and in leaf extracts in the same species. The extracts were determined by HPLC-DAD analysis to contain phenolic compounds including chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, kaempferol-3-glycoside, rutin and t-cinnamic acid with different number and amount. It was also revealed that phenolic compounds were more abundant in leaf extracts. According to RT-qPCR analysis, *Juniperus* L. extracts significantly downregulated *MMP-2* ( $p < 0.01$ ) and *MMP-9* ( $p < 0.05$ ) gene expression levels in CRPC cell lines.

This is the first study to investigate antitumor effects of *Juniperus* L. extracts on CRPC cell lines. In accordance with our findings, we suggest that *Juniperus* L. may be important plant species as a new therapeutic candidate and small molecules found in *Juniperus* L. species are possibly promising compounds in advanced drug research for cancer therapy.

**Key words:** *Juniperus*, prostate cancer, CRPC, cytotoxic effect

## GİRİŞ

Prostat kanseri gelişmiş ülkelerde erkeklerde en sık rastlanan epitel kökenli solid doku kanseridir. Ülkemizde ise görülme sıklığı açısından akciğer kanserini takiben ikinci sırada yer almaktadır (1). Prostat kanseri ilişkili ölümlerin büyük oranda metastaz kaynaklı olduğu bilinmektedir (2). Oldukça heterojen formlarda ortaya çıkabilen bu hastalığın klinik olarak anlamlı formu lokal ileri prostat kanseridir. Metastatik potansiyel taşıyan lokal ileri prostat kanserinin tedavisinde cerrahi müdahalenin yanı sıra anti-androjenik ajanların kullanımı ile prostat kanseri progresyonunda yaşamsal etkisi olduğu bilinen androjen reseptör sinyalizasyonunu represe etmeyi hedefleyen kimyasal kastrasyon yaklaşımları (endokrin terapi) uygulanmaktadır (3). Mevcut tedavinin başlangıçta oldukça etkin sonuçları olsa da hastaların %80-90'ında yaklaşık 18-24 ay sonra androjene duyarsız olarak ortaya çıkan ve kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK) olarak tanımlanan agresif fenotiple karşılaşılmaktadır. Etkin tedavisi şu an için mümkün olmayan KDPK'da anti-androjenik ilaçların yanında en etkili kemoterapötik ajanlarla ortalama yaşam süresi birkaç ay ile sınırlıdır (4).

Pek çok kanser türünün günümüzdeki tedavisinde sıklıkla bitkisel metabolitler kullanılmaktadır. KDPK tedavisinde kullanılan mevcut kemoterapötik ajanlar da (dosetaksel ve kabazitaksel) bitkisel kökenli taksan türevleridir (5). Son yıllarda kanser tedavisinde daha etkin yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlamayı hedefleyen pek çok çalışmada geniş spektrumlu farmakolojik özelliklere sahip bitkilerin ya da bitkisel kökenli metabolitlerin önemli terapötik adaylar olabileceği belirtilmektedir (6-10). Ülkemiz, coğrafi ve iklimsel koşullarının bir avantajı olarak oldukça zengin floraya sahip nadir ülkeler arasında yer almaktadır. Kuzey yarı kürede 70, ülkemizde ise 7 tür ile temsil edilen ve fenolik bileşikler, flavonoidler, esansiyel yağlar, lignanlar, terpenoidler yönünden zengin bitkiler olan *Juniperus* L. (ardıç) türlerinin farmakolojik özellikleri nedeniyle dünya çapında geleneksel tıpta kullanımları oldukça yaygındır (11). Son yıllarda *Juniperus* L. türlerinin yaprak ve meyvelerinden farklı çözücüler ve farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen özütlerin veya özütlerden izole edilen farklı tipteki etken maddelerin çeşitli kanser türleri üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğuna yönelik bulgular artış göstermiştir (12-15). Mevcut bulgular sitotoksik etkisi araştırılan *Juniperus* L. türüne, kanser tipine, özüt ekstraksiyon koşullarına ve özütün içeriğine bağlı değişim göstermektedir. Literatürde *Juniperus* L. türlerinin kastrasyon dirençli prostat kanseri

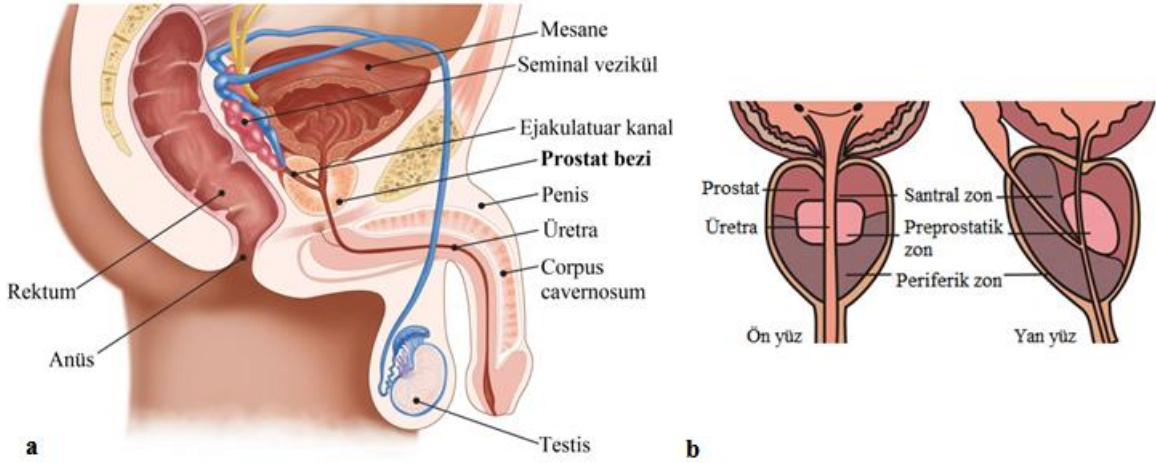
üzerindeki olası sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca daha çok içerik karakterizasyonuna yönelik gerçekleştirilen mevcut çalışmaların pek çoğunda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi saptanan özütlerin normal hücreler üzerindeki etkileri değerlendirilmemiş, belirlenen sitotoksik etkinin hücre ölümü üzerindeki ileri analizleri gerçekleştirilmemiştir. Ek olarak *Juniperus* L. türlerinin sahip olduğu antitümöral etkilerin olası moleküler mekanizmalarını araştıran çalışmalar ise oldukça az sayıdadır.

Bu doğrultuda mevcut tez çalışmasının hipotezini Türkiye florasında doğal olarak yetişen iki farklı *Juniperus* L. türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin KDPK hücre hatları üzerindeki olası sitotoksik etkileri oluşturmaktadır. Tez çalışması kapsamında Uludağ'ın Kirazlıyayla ve Harmancık mevkiinden toplanan iki farklı *Juniperus* L. türüne ait yaprak ve meyvelerden sulu özütler hazırlanarak dört farklı özütün iki farklı KDPK ve bir normal hücre hattında sitotoksik etkileri araştırılmış, saptanan sitotoksik etkinin hücre ölümü üzerindeki etkileri iki farklı yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Özüt muameleleri sonrasında, kanser hücrelerinde invaziv süreçlerde görev aldığı bilinen matriks metalloproteinaz-2 (*MMP-2*) ve -9 (*MMP-9*) genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler RT-qPCR ile analiz edilmiştir. Ayrıca tüm özütlerin HPLC-DAD analizi ile 33 farklı fenolik bileşik için içerik analizleri gerçekleştirilmiş olup, özütlerin tümünde farklı miktarlarda 6 farklı fenolik bileşik belirlenmiştir. Mevcut tez çalışması ile *Juniperus* L. türlerinin KDPK hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi ilk kez araştırılmıştır. Sulu ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan iki farklı *Juniperus* L. türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin KDPK hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin literatürdeki benzer çalışmalara göre daha kapsamlı değerlendirildiği ilk çalışma olarak, bulgularımızın ilgili alanda gelecek çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Ayrıca sonuçlarımız doğrultusunda antitümöral özellikteki pek çok küçük molekülün kaynağı olarak *Juniperus* L. türlerinin kanser tedavisi için ileri ilaç araştırmalarında kullanılma potansiyeli yüksek bitki türleri olabileceği görüşündeyiz.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Prostat Bezinin Yapısı ve Fonksiyonu

Prostat, mesanenin hemen altında lokalize, yaklaşık 15-20 gr ağırlığında fibromuskuler ve glandüler yapılu bir salgı bezidir. Konik yapılu ve uzunluğu yaklaşık 2.5 cm olan prostat bezi erkek üreme sisteminde üretrayı sararak mesane boynu ile devam eder (Şekil-1a). Erkeklerde prostat gelişimi döllenmenin 8. haftasında başlar, fetal testislerden androjen hormonu üretimiyle birlikte 16. haftaya kadar sürer. Epitelyal ve stromal hücrelerden oluşan prostat dokusu prostatik üretra ile olan ilişkisine göre glandüler ve nonglandüler olmak üzere iki ana bölgeye ayrılır (16). Glandüler bölge santral zon, periferik zon ve preprostatik zondan oluşur (Şekil-1b). Periferik zon glandüler prostat dokusunun yaklaşık %70'ini oluşturup prostat kansinomlarının %70-75 oranında en sık köken aldığı bölgedir. Periferik zonu takiben kansinomların %15-20'si santral zondan ve %10-15'i preprostatik bölgede yer alan transizyonel zondan kaynaklanır (17).

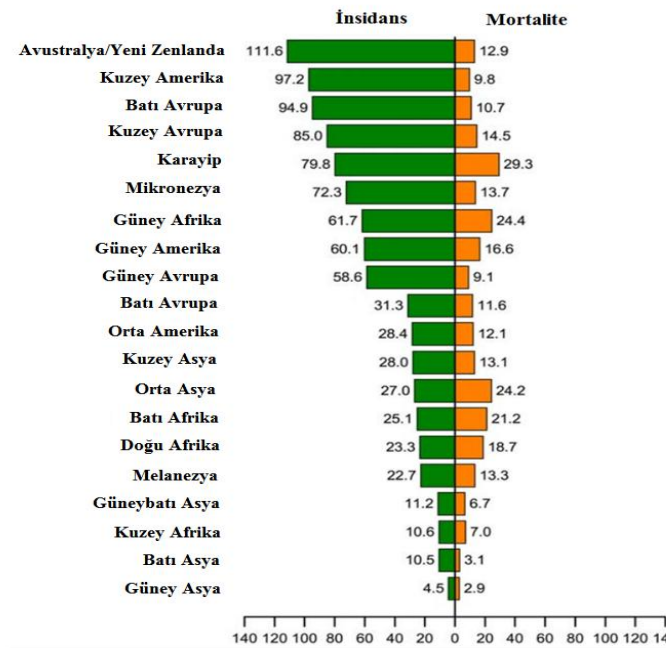


Şekil-1 (a) Erkek üreme sistemi ve prostat bezi anatomisi, (b) Prostatın glandüler zonu (18)

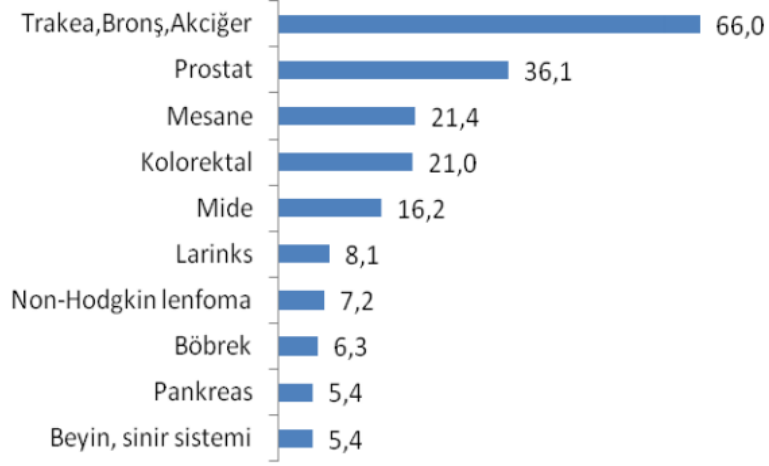
Prostat bezi fonksiyonu açısından fertilizasyon sürecinde büyük önem taşımaktadır. Sperm hücrelerinin büyüme gelişmesini destekleyen, canlılığını korumasını sağlayan ve hücreleri fertilizasyona hazır halde tutan ortalama 2-5 ml hacme sahip seminal plazmanın büyük kısmını seminal vezikül sekresyonu oluşturmaktadır. Prostat bezinden salgılanan prostat spesifik antijen (PSA) bir serin proteaz olup semenogelin adı verilen seminal proteinin proteolizi yolu ile seminal sıvının çözünmesini sağlar. Prostattan sağlanan sitrik asit ise seminal sıvının ozmotik dengesini koruyucu görev üstlenir (19).

## 2.2. Prostat Kanseri, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Prostat kanseri, prostat bezindeki genetik ve epigenetik değişimler sonucu hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasıyla organ hacminin büyümesi sonucu normal glandüler yapının preneoplastik lezyonlara dönüşümüyle karakterize invaziv bir karsinom türüdür. Özellikle gelişmiş ülkelerde erkeklerde en sık rastlanan epitel kökenli solid doku kanseridir (20). Uluslararası Kanser Ajansı'nın son istatistiklerine göre her yıl yaklaşık 1.1 milyon yeni olguya prostat kanseri tanısı koyulmaktadır. Dünya'da kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ise beşinci sıradadır (1). Dünya genelinde erkeklerde görülen tüm kanser türlerinin %11'inden ve kansere bağlı ölümlerin %9'undan sorumlu olan prostat kanserinin yaşa göre standardize edilmiş insidans ve mortalite hızı Şekil-2'de gösterilmiştir. Ülkemizde ise görülme sıklığı açısından akciğer kanserini takiben ikinci sırada yer almaktadır (7). Türkiye'de prostat kanserinin yaşa göre standardize edilmiş hızı ise 100.000 kişide 36.1 olarak açıklanmıştır (Şekil-3).



Şekil-2 Dünya genelinde yaşa göre standardize edilmiş prostat kanseri insidans ve mortalite hızı (100.000 kişide) (1)

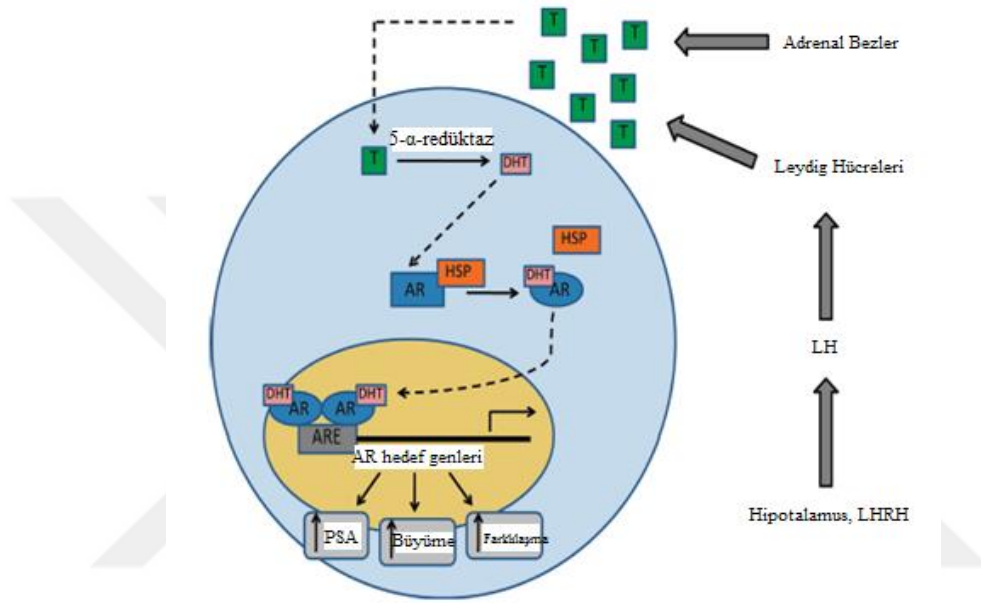


**Şekil-3** Türkiye'de erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızı (100.000 kişide) (21)

Prostat kanserinin epidemiyolojisi ve etiyojisinde yaş, ırk, çevresel etkiler (diyet), hormonal etkiler ve genetik etmenler gibi pek çok önemli faktörden söz edilebilir. Prostat kanseri yaşla birlikte insidanda en hızlı artışı gösteren kanser türüdür. Yeni tanı konmuş hastaların %75'inden fazlası 65 yaş üstüdür (22). Dünya'da prostat kanseri insidansı en yüksek olan ırk ise Amerikalı zenci ırktır (20). Prostat kanserinin gelişimi ve progresyonuna neden olan faktörler kesin olarak bilinmemesine rağmen literatürde diyet ile alınan likopen, vitamin D, vitamin E ve selenyumca zengin besinlerin prostat kanseri insidansını azalttığı belirtilmekteyken yüksek miktarda kalsiyum alımının ve et tüketiminin ise prostat kanseri açısından risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (23).

Prostat kanserinin gelişimi ve progresyonu normal prostat dokusunda olduğu gibi hormon bağımlıdır (24). Androjen, testislerdeki Leydig hücreleri ve adrenal bezlerce üretilen erkek steroid hormonudur. Kandaki testesteronun azalmasına paralel olarak hipotalamustan uyarı geldiğinde luteinize edici hormon salgılamından sorumlu olan hormon (LHRH/GnRH) salgısı artar. LHRH reseptörlerinin aktif hale geçmesi ile luteinize edici hormon (LH) salgılamı uyarılır. LH sirkülasyonu Leydig hücrelerinde steroidogenezi uyararak androjen üretimini başlatır. Üretilen testosteron prostat içine girdiğinde 5- $\alpha$ -redüktaz tip 2 (SRD5A2) enzimi tarafından androjenin daha aktif formu olan dihidroksitesterona (DHT) dönüştürülür. DHT, hücre içinde androjen reseptörüne (AR) bağlanır ve oluşan bu kompleks nükleusa giriş yapar (Şekil-5). DHT bağlı AR, ekspresyonu androjen tarafından düzenlenen genlerin promotör bölgelerindeki androjen

cevap elementleri (ARE) olarak isimlendirilen spesifik DNA dizilerine bağlanarak PSA'yı kodlayan *KLK3* geninin de içinde yer aldığı hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (4). Prostatik bazal epitel hücrelerin salgı luminal epitel hücrelere dönüşümünü gerektiren normal farklılaşma sürecinde, stromal hücrelerin parakrin desteği aracılığıyla gerçekleşen prostatik epitel hücrelerin proliferasyonunda ve yaşamında AR sinyalizasyonu görev almaktadır.



**Şekil-5** Prostat hücrelerinde AR sinyalizasyon mekanizması (4)

Prostat kanseri insidansını etkileyen önemli bir faktör de genetik yatkınlıktır. Tüm prostat kanserlerinin yaklaşık %10 oranda nadir otozomal dominant prostat kanseri yatkınlık genlerinden kaynaklandığı hipotezi çeşitli kanıtlar ile desteklenmiştir. Birinci derece akrabalarında prostat kanseri hikayesi olan bireylerde 2-3 kat risk artışı (25), birinci derece akrabalarında iki ya da daha fazla kişide prostat kanseri hikayesi olan bireylerde 5-11 kat risk artışı söz konusudur (26). Bu rakamlar ailesinde prostat kanseri hikayesi olmayan erkeklere kıyasla 8 kat fazla risk teşkil etmektedir. Aile hikayesi olan erkeklerde hastalık çok daha erken yaşlarda ortaya çıkmakla beraber bu süre yaklaşık olarak sporadik olgulara göre 6-7 yıl öncedir (27). Ailesel prostat kanser riski sebebiyle genetik danışma gerektiren erkek adaylar, üç ya da daha fazla birinci derece yakınının (baba, oğul, erkek kardeş) prostat kanseri olması, paternal ya da maternal kaynaklı üç nesilde ardışık şekilde hastalığın gözükmesi, en az iki akrabasının 55 yaşından önce prostat kanseri tanısı almış

olması veya maternal kaynağı da içeren en az üç akrabasında prostat kanseri hikayesi olması şeklinde sıralanan Hopkins Kriterleri'nden en az birini taşımalıdır (28). Ailesel prostat kanserini net şekilde saptamak ve yüksek prevalans nedeniyle hastalığın sporadik formundan ayırmak çok mümkün olmasa da farklı çalışmalar ile prostat kanserine yatkınlıktan sorumlu olarak tanımlanmış pek çok gen bulunmaktadır (Tablo-1).

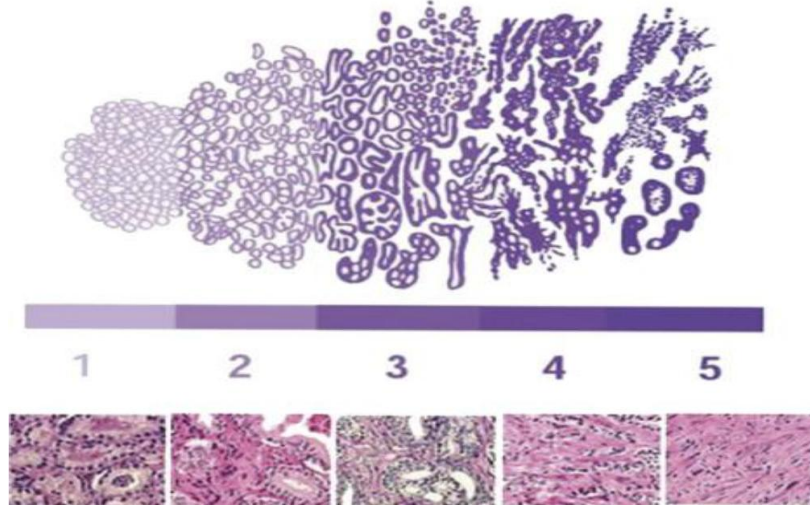
**Tablo-1** Prostat kanserine yatkınlıktan sorumlu olarak tanımlanmış genler

Gen	Kromozomal Lokus	Kaynak
<i>RNASEL (HPC1)</i>	1q24-25	(29)
<i>ELAC2 (HPC2)</i>	17p11	(30)
<i>HPCX</i>	Xq27-28	(31)
<i>HPC20</i>	20q13	(32)
<i>MSR1</i>	8p22-23	(33)
<i>HOXB13</i>	17q21-22	(34)
<i>NBS1</i>	8q21	(35)

### 2.3. Prostat Kanserinde Klinik ve Histopatolojik Evreleme

Serum PSA düzeyi, klinikte prostat kanseri tanısında yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Prostatik semptomlara bağlı olarak üriner fonksiyon bozuklukları artmış, anormal rektal tuşe bulgulu ve serum PSA düzeyi >4 ng/ml olan erkek bireylerde prostat kanseri şüphesi nedeni ile biyopsi endikasyonu söz konusudur (36). Prostat kanseri pozitif doku örneklerinin evrelemesindeki amaç ise prognozu tayin ederek hastalığın yayılımına göre uygun tedaviyi belirlemektir. Prostat adenokarsinomlarının patolojik değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan sistem prostat biyopsi örneklerinin ışık mikroskobu altında analiz edildiği Gleason evreleme sistemidir (37). Bu sistemde sitolojik özelliklerden bağımsız olarak tümörün glandüler diferansiasyonu ve büyüme paterni stromal ilişki açısından değerlendirilir. Primer ve sekonder yapısal paternler belirlendikten sonra tümörün agresifliği 5 temel Gleason evre paternine göre tanımlanır; derece 1 iyi diferansiasyonu, derece 5 kötü diferansiasyonu gösterir (Şekil-6). Primer ve sekonder yapısal paternler için ayrı ayrı derecelendirme yapıldıktan sonra elde edilen değerler toplanarak Gleason skoru elde edilir. Gleason skoru 2-4 arası tümörler iyi diferansiye, 4-6 tümörler orta diferansiye, 7 orta-kötü diferansiye ve 8-10 kötü diferansiye şeklinde gruplandırılır. Gleason skoru yüksek olan tümörler, düşük skorlu tümörlere göre agresif fenotipe sahiptir (38).





**Şekil-6** Gleason evreleme sistemi (39)

Gleason evreleme sistemine ek olarak prostat adenokarsinomlarının evrelemede American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in 2002 yılında modifiye ettiği tümör (T), nod (N), uzak metastaz (M) evreleme sisteminden de yararlanılmaktadır. Bu sistemde cerrahi öncesi klinik (k) (PSA düzeyi, rektal muayene, görüntüleme bulguları) ve cerrahi sonrası patolojik (p) (prostat dokusundaki histolojik bulgular) olmak üzere iki farklı evreleme yapılmaktadır (40). Prostat kanseri tanısının TNM evrelemesine göre belirlenmesine rağmen olup tedavi aşamasında PSA düzeyi, klinik T evresi ve patolojik bulgular önem taşır. TNM evreleme sistemi, tümör dokunun prostat içine ve etrafı saran diğer yapılar içerisine ne kadar yayıldığını tanımlar (Şekil-7). Prostat kanseri için TNM evreleme sistemi aşağıda özetlenmiştir;

**Primer tümör (T);**

**p/k T1:** Palpe edilemeyen ve rektal muayene ile saptanamayan tümör

**p/k T2:** Prostat ile sınırlı tümör

**p/k T2a:** Tümör bir lobun %50'den azını kapsıyor

**p/k T2b:** Tümör bir lobun %50'den fazlasını kapsıyor.

**p/k T2c:** Tümör her iki lobu kapsıyor

**p/k T3:** Prostatik kapsülden seminal vezikül içerisine yayılım gösteren tümör

**p/k T4:** Lenf nodu ve organ (mesane boynu veya rektuma invaze) yayılımı gösteren tümör

**Lenf nodu yayılımı (N);**

**N0:** Lenf nodu metastazı negatif tümör

**N1:** Tek, çapı < 2cm, bölgesel lenf nodu metastazlı tümör

**N2:** Tek > 2cm ancak < 5cm, ya da multipl < 5 cm, lenf nodu metastazlı tümör

**N3:** Bölgesel lenf nodlarına > 5 cm'lik metastazlı tümör

**Uzak metastaz (M);**

**M0:** Uzak metastaz negatif tümör

**M1:** Uzak metastaz pozitif tümör

**M1a:** Bölgesel olmayan lenf nodu tutulumu gösteren tümör

**M1b:** Kemik tutulumu pozitif tümör

**M1c:** Kemik tutulumu ya da başka bölgelere metastazı pozitif gösteren tümör

T, N, M kategorileri belirlendikten sonra evrelendirme yapılır;

**Evre I : (Şekil-7 a)** T1a N0 M0 G1

**Evre II: (Şekil-7 b,c)** T1a N0 M0 G2,3,4

T1b N0 M0 Herhangi bir GS

T1c N0 M0 Herhangi bir GS

T1 N0 M0 Herhangi bir GS

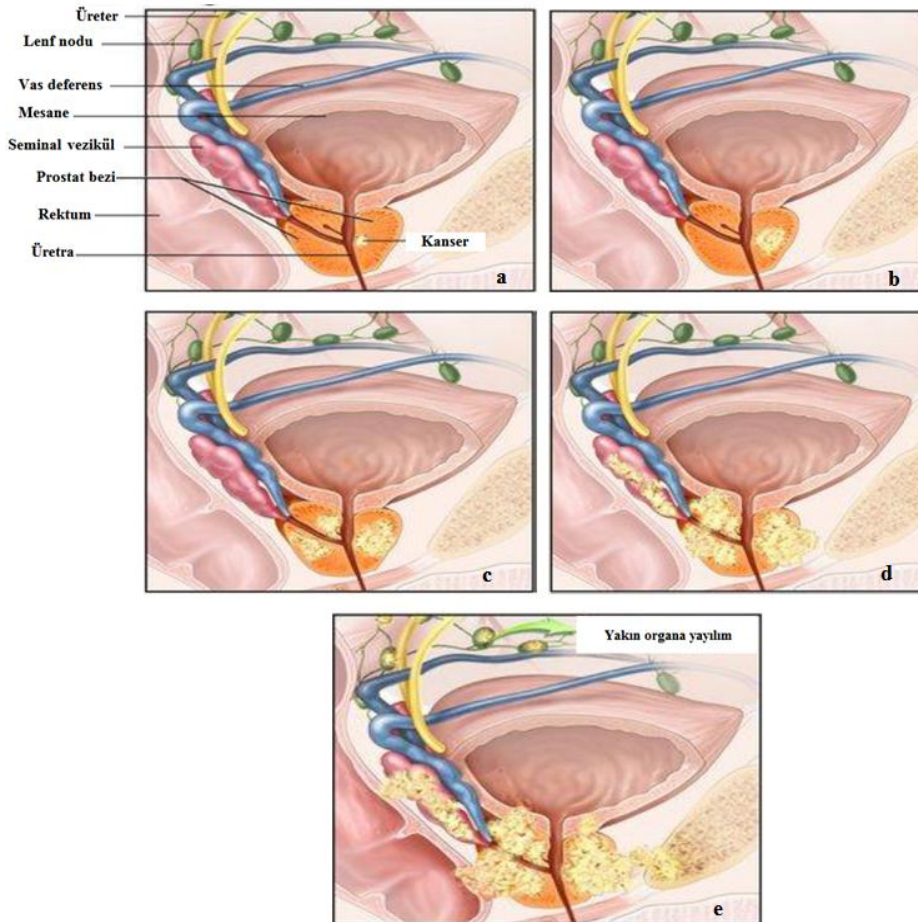
T2 N0 M0

**Evre III: (Şekil-7 d)** T3 N0 M0 Herhangi bir GS

**Evre IV: (Şekil-7 e)** T4 N0 M0 Herhangi bir GS

T1-T4 N1 M0 Herhangi bir GS

T1-T4 N1-N3 M1 Herhangi bir GS



**Şekil-7** Prostat kanserinde TNM evrelemesinin şematize hali  
a: Evre I, b,c: Evre II, d: Evre III, e: Evre IV (41)

Prostat kanseri hastaları PSA düzeyi, Gleason skoru, klinik T evresi ve TNM evrelemesine göre 3 farklı risk grubuna ayrılır (40) (Tablo-2).

**Tablo-2** Prostat kanseri risk grupları

Risk Grubu	PSA (ng/ml)	Gleason skoru	Klinik evre (kT)
Düşük	<10	≤ 6	T1-T2
Orta	≤10- ≤20	7	T2b
Yüksek	>20	≥8	T2c-T3

Klinik ve patolojik bulgular ile tanı koyulan prostat kanseri farklı prognostik özellikler gösteren formlarda ortaya çıkabilmekte ya da hastalık kötü prognoz ile seyreden daha agresif forma ilerleyebilmektedir. Klinik açıdan birbirinden farklı olan bu formlarda tedavi seçenekleri de oldukça farklılık göstermektedir. Bu kapsamda prostat kanserini 3 ana formda incelemek gerekir.

### 2.3.1. Prostat Kanserinin Farklı Prognostik Özelliklere Sahip Formları

#### 2.3.1.1. Lokalize Prostat Kanseri

Tümörün prostat bezine sınırlı olup prostat kapsülü içine yayılım göstermediği tipteki prostat kanseri "lokalize prostat kanseri" olarak isimlendirilir. Lokalize prostat kanserini tanımlayan klinik evre T1-T2'dir. Dolayısıyla lokalize prostat kanserli hastalar düşük ya da orta risk grubuna dahildir. Tümörün oldukça yavaş büyüme gösterdiği ve iyi prognoz gösteren bu formda lokalize prostat kanseri tanısı alan hastaların %50'sinde prostat kanseri progresyon riski yaklaşık 15-20 yıl gibi bir süreyi kapsamaktadır (42). Lokalize prostat kanseri için en uygun tedavi yaklaşımı genellikle PSA düzeyi ve prostat morfolojisinin düzenli takibi olmasına rağmen prognostik biyobelirteçlerin eksikliği nedeniyle lokalize prostat kanserlerinde tedavi yönteminin seçimi klinik açıdan zorluklar oluşturabilmektedir.

### **2.3.1.2. Lokal İleri (Metastatik) Prostat Kanseri**

Tümörün prostat kapsülünü geçerek seminal veziküllere ve/veya lokal organlara (mesane, rektum ya da pelvis boşluğu) yayılım gösterdiği ve klinik evre T3-T4 (T3 N0 M0 ve T4 N0 M0) olan prostat kanseri "lokal ileri prostat kanseri" olarak isimlendirilir. Ek olarak lokal ileri prostat kanseri lokal organlar dışında uzak organ metastazı ile de karakterize olabilir. Klinik evre T4 olan (T1-T4 N1 M0 ve T1-T4 N1-N3 M1) ileri evre prostat kanserlerinde uzak metastaz varlığı %90 oranda kemik, %40-50 oranda akciğer ve %25-30 oranda karaciğer olarak bildirilmiştir (2). Günümüzde metastatik prostat kanserlerinde en uygun tedavi cerrahi ve kimyasal kastrasyon yaklaşımlarını kapsayan endokrin (anti-androjenik) tedavidir.

### **2.3.1.3. Kastrasyon Dirençli Prostat Kanseri**

Lokal ileri prostat kanseri tanısı almış hastaların %80-90'ında endokrin tedavi yöntemleri ilk 18-24 ay içerisinde istenilen biyokimyasal cevapları sağlasa da uzun sürede bu tedavi etkin sonuçlar vermemekte ve tedavinin son dönemi, tedaviye direnç gösteren kanser hücrelerinin seleksiyonu ile sonuçlanmaktadır (43). Lokal ileri prostat kanserinin rekürrensi ile ortaya çıkan ve "kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK)" olarak isimlendirilen bu form prostat kanserinin ölümcül formudur. KDPK progresyonunun moleküler temelleri henüz bilinmese de hastalıkta özellikle *AR* sinyalizasyonunu kapsayan pek çok değişimin ve onkogenik aktiviteye katkı sağlayan diğer moleküler yolların etkili olduğu düşünülmektedir (44). KDPK'li hastalarda anti-androjenik ilaçların yanında en etkili kemoterapötik ajanlarla ortalama yaşam süresi 5-8 aydır (4).

## **2.3.2. Prostat Kanserinde Mevcut Tedaviler**

### **2.3.2.1. Aktif İzlem**

Tümörün küçük boyutta olduğu ve yavaş büyüme gösterdiği düşük riskli (lokalize) prostat kanseri hastalarında en güvenli tedavi seçeneğidir (42). Prostat kanserindeki ilerleme her 3-6 ayda bir PSA taraması ve 3-5 yılda bir prostat biyopsisi ile değerlendirilir. Aktif izlemdeki amaç düşük risk grubuna dahil, yaşam beklentisi yaşa bağlı olarak

nispeten düşük prostat kanseri hastalarında tümör progresyonu artana kadar ( $PSA \geq 10 \text{ ng/ml}$  ve  $GS > 7$ ) agresif tedaviden kaçınmaktır.

### **2.3.2.2. Radikal Prostatektomi**

Düşük ve orta risk grubuna dahil, yaşam beklentisi 10 yıldan fazla olan lokalize prostat kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılan bu küratif tedavi yönteminde cerrahi müdahale ile prostat bezinin tüm bölümleri ve seminal veziküller çıkarılır (45). Radikal prostatektomi sonrasında kanda PSA saptanmaması beklenir. Kan PSA düzeyinde  $0.5 \text{ ng/ml}$ 'nin üzerindeki artış prostat kanseri rekürrensine işaret eder.

### **2.3.2.3. Radyasyon Terapi**

Lokalize ya da lokal ileri prostat kanserlerinde eksternal (eksternal beam radyasyon terapi, XRT) ya da internal (brakiterapi) radyasyon tedavileri düşünülebilir. XRT'de hedeflenmiş radyasyon küratif dozda çevre dokulara zarar vermeden direkt olarak prostat içerisine verilir. Brakiterapide ise iki seçenek mevcuttur; brakiterapi düşük doz hızında radyoaktif çekirdekçikler transrektal ultrason eşliğinde prostatik doku içerisine kalıcı olarak implant edilirken genellikle XRT ile kombin şekilde uygulanan brakiterapi yüksek doz hızında ise implantasyon geçicidir (40).

### **2.3.2.4. Endokrin Terapi**

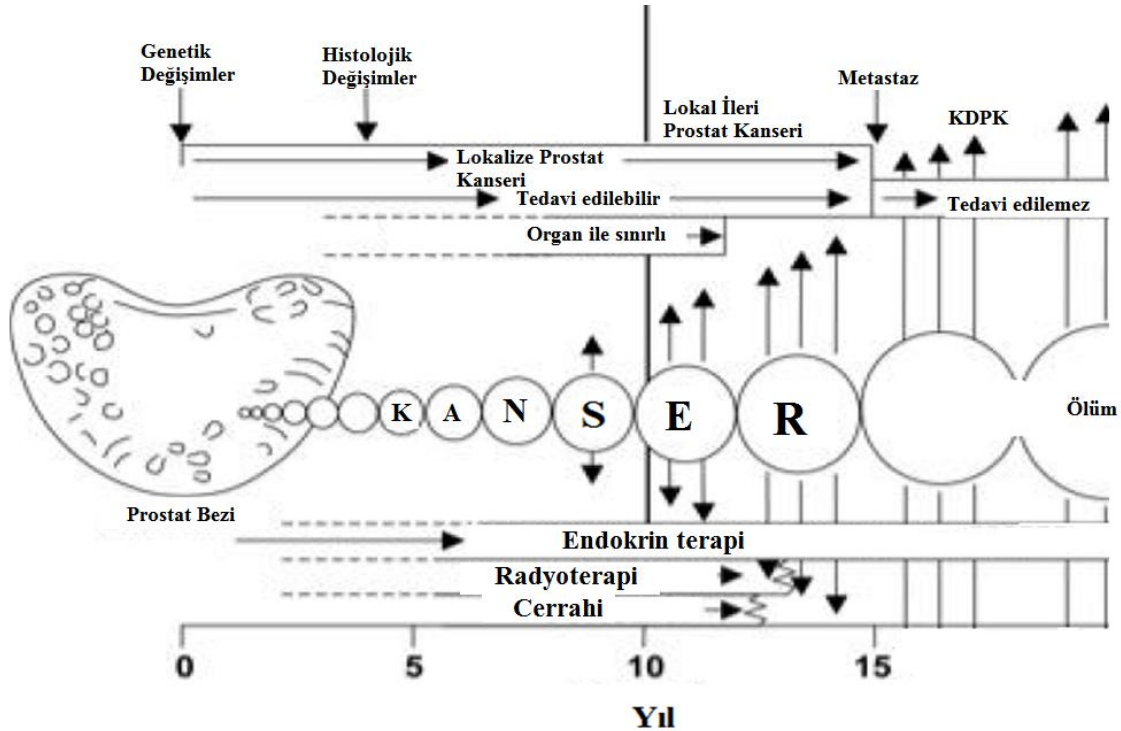
1941 yılında Huggins ve Hodges prostat kanseri progresyonunun testosteron aktivitesi ile güçlü ilişkisi olduğunu açıklamışlardır (46). Bu ilişkiyi baz alarak testosteron aktivasyon mekanizmasını elimine etmeyi hedefleyen endokrin tedavi, günümüzde lokal ileri ve metastatik prostat kanseri hastalarında ya da primer tedavi (prostatektomi ve/veya radyasyon terapi) sonrasında rekürrens gösteren prostat kanseri hastalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (3). Endokrin terapide farklı tedavi seçenekleri bulunmaktadır; ilk seçenekte gonadotropin salıcı hormon (GnRH/LHRH) agonistlerinin kullanımı ile GnRH reseptör fonksiyonunu inhibe edilerek luteinize edici hormon (LH) düzeyindeki düşüş sonrasında testislerde testosteron üretimi baskılanır. İkinci seçenekte anti-androjenik ajanların kullanımı ile AR sinyalizasyonu repress edilerek testosteronun ve DHT'nin AR'ye bağlanması engellenir. Böylelikle hücre içerisinde transkripsiyonu AR tarafından yönlendirilen büyüme-farklılaşma ilişkili hedef genlerin transkripsiyonu baskılanır.

Endokrin tedavide son seçenek GnRH agonistleri ve anti-androjenik ajanların kombin kullanımı ile sağlanan maksimum androjen blokajıdır. Bu kombin tedavide testosteron üretimi ve AR sinyalizasyonu aynı anda baskılanmaktadır. Başlangıçta yüksek düzeyde etki görülse de gelişen direnç nedeniyle metastatik prostat kanserinde endokrin tedavi küratif bir tedavi seçeneği değildir (47).

### 2.3.2.5. Kemoterapi

Metastatik prostat kanseri hastalarında endokrin tedavi sonrasında ortaya çıkan agresif fenotipe sahip KDPK tümör büyümesini yavaşlatmak amacıyla anti-androjenik tedaviye ek olarak ya da tek başına kemoterapiden faydalanılmaktadır. Prostat kanserinde kullanılmakta olan pek çok kemoterapi ajanı olmasına rağmen dosetaksel (Taxotere) en sık kullanılanıdır. Dosetaksel dirençli olgularda kullanımı uygun bulunarak 2010 yılında FDA onayı alan kabazitaksel (Jevtana) ise, KDPK için ikinci jenerasyon kemoterapi ajanı olarak piyasaya sürülmüştür ancak günümüzde KDPK'nın mevcut terapötik ajanlar ile etkin tedavisinin mümkün değildir (48).

Prostat kanserinin klinik açıdan farklılık gösteren formları ve uygun tedavi seçenekleri Şekil-8'de şematize edilmiştir.



Şekil-8 Prostat kanserinin farklı klinik formları ve tedavi yaklaşımları (49)

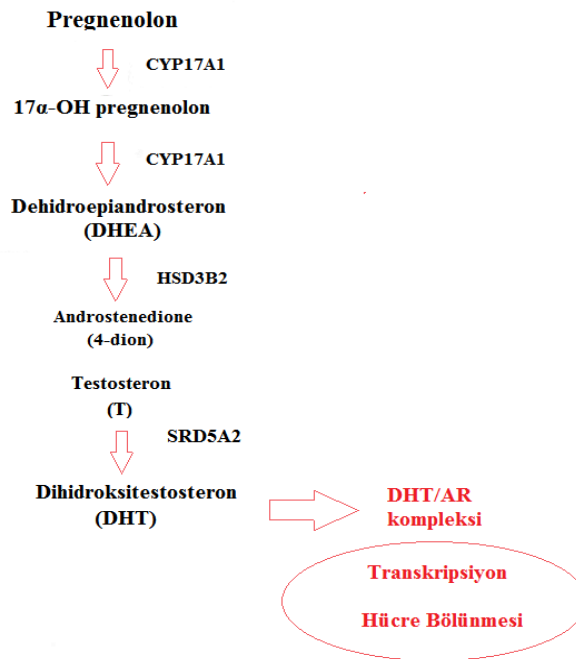
## 2.4. Prostat Kanseri Patogenezinde Rol Alan Genetik ve Epigenetik Mekanizmalar

Prostat kanserleri yaklaşık %10-20 oranda ailesel olmakla birlikte %80-90 oranda sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (24). Hastalığın sporadik formunda farklı genetik ve epigenetik mekanizmaların etkisi söz konusudur. Bu mekanizmalar;

- Prostat kanseri için risk faktörü oluşturan gen polimorfizmleri
- Prostat kanserinde somatik genetik ve epigenetik değişimler
- Prostat kanseri progresyonundan ve kastrasyon direncinden sorumlu tutulan moleküler mekanizmalar olmak üzere üç grupta incelenmelidir.

### 2.4.1. Prostat Kanseri İçin Risk Faktörü Oluşturan Gen Polimorfizmleri

Prostat gelişiminde önemli görevlere sahip hormonlar olan androjenler (testosteron ve DHT) prostat kanseri gelişimi için de kritik öneme sahiptir. DHT düzeyinde anormal artışa neden olarak AR sinyalizasyonunu sürekli uyararak ve hücreye yaşamsal avantaj sağlayan faktörler prostat kanseri için risk teşkil etmektedir (50). Bu nedenle bu kapsamda değerlendirilen genlerin tümü androjen hormonlarının metabolik döngüsünden sorumlu enzimleri kodlayan genlerdir (Şekil-9).



Şekil-9 Androjen metabolizmasının biyokimyası



### **Sitokrom p450C17 $\alpha$ (CYP17) geni**

Sitokrom p450 süperaillesine üye 10q24.3 lokalizasyonlu *CYP17* gen ailesi tarafından kodlanan 17 $\alpha$ -hidroksilaz ve 17,20 liyaz enzimleri, pregnenolonu sırasıyla 17 $\alpha$ -OH pregnenolone ve dehidroepiandrosterona dönüştürür (Şekil-9). *CYP17* mutasyonları hem sporadik ve hem de ailesel prostat kanseri olgularında saptanmıştır (24).

### **Tip 2, 3 $\beta$ -Hidroksisteroid Dehidrogenaz (HSD3B2) geni**

1p13.1 lokalizasyonlu, DHEA'dan 4-diol sentezinde ve DHT'nin inaktivasyonunda görev alan HSD3B2 enzimi prostat kanseri riskini belirleyebilecek aday genler arasındadır (51).

### **5 $\alpha$ -Redüktaz Tip II (SRD5A2) geni**

2p22-23 lokalizasyonlu SRD5A2 enzimi geri dönüşümsüz olarak testosteronun DHT'ye dönüşümünü katalizler. *SRD5A2* genindeki polimorfizmler farklı etkinliklerde aktivitelere sahip enzimlerin ekspresyonuna neden olur. Prostat kanserinde SRD5A2 enzim aktivitesinin artması sonucu hem prostat dokusunda hem de kanda DHT düzeyi yükselir ve buna paralel olarak hastalarda PSA düzeyi artar (52).

### **Sitokrom p450 3A4 (CYP3A4) geni**

Sitokrom p450 süperaillesine üye 7q21.3- 22.1 lokalizasyonlu *CYP3A4* geni tarafından kodlanan bu enzim, testosteronun oksidasyonunu katalizleyerek hormonun fonksiyonunu kaybetmesine neden olur. İleri yaşlarda ortaya çıkan sporadik prostat kanseri olgularında testosteron oksidasyon oranında azalmaya neden olan CYP3A4\*1B genotip varlığı anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (51).

## **2.4.2. Prostat Kanserinde Somatik Genetik ve Epigenetik Değişimler**

Büyük oranda sporadik olarak ortaya çıkan prostat kanseri bazı tümör süpresör genlerde ve onkogenlerde pek çok genetik ve epigenetik değişimin sonucu oluşan ve ilerleyen heterojen bir hastalıktır.



### 2.4.2.1. Tümör Süpresör Genler

Hücre döngüsü düzenleyicileri, apoptozu uyarıcı ya da DNA tamir mekanizmalarından sorumlu proteinleri kodlayan, normal fonksiyonları ile tümör oluşumunu baskılayan tümör süpresör genlerde genin her iki allelinde mutasyon, delesyon ya da promotör hipermetilasyonu mekanizmalarından herhangi biri ya da ikisi meydana geldiğinde proteinin normal fonksiyonunu kaybetmektedir (53). Aşağıda sıralanan bazı tümör süpresör genlerin prostat kanseri patogenezinde rol oynadığı tanımlanmıştır;

**p53 geni:** 17p13.1 lokalizasyonlu, hücre siklusunun G1-S kontrol noktasında görevli olmakla birlikte apoptoz düzenleyicisi olarak görev yapan ve "genom koruyucusu" olarak isimlendirilen p53 geninde primer prostat kanserinde %10-20 oranında, lokal ileri prostat kanserlerinde ise %42 oranında mutasyon bildirilmiş ve mutasyon varlığı kemik metastazı ve kastrasyon direnci ile ilişkili bulunmuştur (54).

**Glutasyon S- transferaz 1 (GSTP1) geni:** 11q13 lokalizasyonlu, genomun oksidatif hasara karşı korunmasında görevli GSTP1 geninin prostat kanserinde yaygın şekilde promotör hipermetilasyonu yolu ile inaktivasyonu söz konudur. Erken evrede ortaya çıkan bu değişim prostat kanseri için diagnostik bir biyobeliteç olma potansiyeli taşımaktadır (55).

**Fosfataz ve Tensin Homoloğu (PTEN) geni:** 10q23.31'te lokalizasyonlu fosfolipid fosfataz kodlayan bu gen hücre proliferasyon sürecinin temel yollarından olan PI3K-Akt yolağını inhibe ederek tümörögenезisi inhibe etmektedir. Prostat kanserlerinde sıklıkla PTEN delesyonlarına rastlanmaktadır. Ayrıca lokalize prostat kanserlerinin %5-27'sinde, metastatik prostat kanserlerinin %30-60'ında PTEN mutasyonu görülmektedir (56).

**Prostat spesifik homeobox (NKX3.1) geni:** 8p21'te lokalizasyonlu bu gen prostat bezinin gelişiminde negatif regülatör olarak görevlidir. Erken evre prostat kanserlerinin %6'sında, KDPK'ların %34'ünde, ileri evre prostat kanserlerinin %78'inde NKX3.1 delesyonu görülmektedir (57).

**Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (CDKN1B/p27) geni:** 12p13'te lokalize siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür. Lokalize prostat kanserlerinin %23'ünde, lokal ileri prostat kanserlerinin ise metastaz durumuna göre %30-45'inde delesyonu tespit edilmiştir (58).

#### 2.4.2.2. Onkogenler

Transkripsiyon faktörleri, sinyal ileticiler, apoptoz regülatörleri ya da büyüme faktörleri ve reseptörleri gibi büyüme ve gelişme ilişkili esansiyel proteinleri kodlayan proto-onkogenler gen amplifikasyonu, kromozomal yeniden düzenlenme ya da fonksiyon kazanımına neden olan nokta mutasyonları gibi genetik değişimler sonrasında onkogen aktivitesi kazanmaktadır. Meydana gelen değişim sonucu hücrede büyüme ve gelişme ile ilgili normal fonksiyonlar bozulmakta, hücre ölümünden kaçış sonucu malignan transformasyon gerçekleşmektedir (59). Onkogen aktivasyonu için ilgili değişimin genin tek allelinde gerçekleşmesi yeterlidir. Aşağıda sıralanan bazı onkogenlerin prostat kanseri patogenezinde rol oynadığı tanımlanmıştır;

**Hüresel myelositomatozis viral onkogeni (*c-myc*):** 8q24.12 lokalizasyonlu bir transkripsiyon faktörü olan bu genin ürünü hücre proliferasyonu ve transformasyonu için gereklidir. Lokalize prostat kanserlerinde %8 oranında metastatik prostat kanserlerinde %30 oranında amplifikasyonu bildirilmiştir. Ayrıca *c-myc* aşırı ekspresyonu yüksek Gleason skoru kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (60).

**B-hücre lenfoma 2 (*Bcl-2*) geni:** 18q21.3 lokalizasyonlu anti-apoptotik protein kodlamaktadır. Normal prostat dokusunda eksprese olmayan *Bcl-2* proteinin lokal ileri prostat kanserlerinde aşırı ekspresyonu söz konusudur (61).

**Prostat kök hücre antijen (*PSCA*) geni:** Prostat dokusunda artmış ekspresyonu yüksek Gleason skoru, yüksek hastalık evresi ve kastrasyon direncinden sorumlu tutulmuştur (62).

**TMPRSS2-ETS füzyonları:** AR hedef genlerinden biri olan prostat hücre yüzey spesifik serin proteaz 2 (*TMPRSS2*) geni ile ETS transkripsiyon faktör ailesi üyelerinden *ERG* veya *ETVI* füzyonu (21q) oluşması sonucunda ortaya çıkan kimerik protein, prostat kanserinde onkogenik aktiviteden sorumlu tutulan spesifik bir yeniden düzenlenme olarak tanımlanmıştır (63). *TMPRSS2*'nin *ERG* ile yaptığı füzyon en sık füzyon tipi olup ikinci sık füzyon tipi ise *ETVI* ile oluşan füzyondur. Prostat kanserli olguların %40-70'i iki değişimden biri için füzyon pozitifdir (64). Hastaların doku veya rektal muayene sonrası idrar örneklerinde füzyon transkriptin ekspresyon düzeyinin saptanmasının, prostat kanser tanı özgüllüğünü oldukça arttırdığı ve prostat kanseri için diagnostik bir biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir (65). Literatürde yüksek tümör evresi ve yüksek Gleason

skoruyla (>7) seyreden ileri evre prostat kanserine bağlı ölümler ile *TMPRSS2- ETS* füzyonu arasında anlamlılık bildiren çalışmalar da mevcuttur (66, 67).

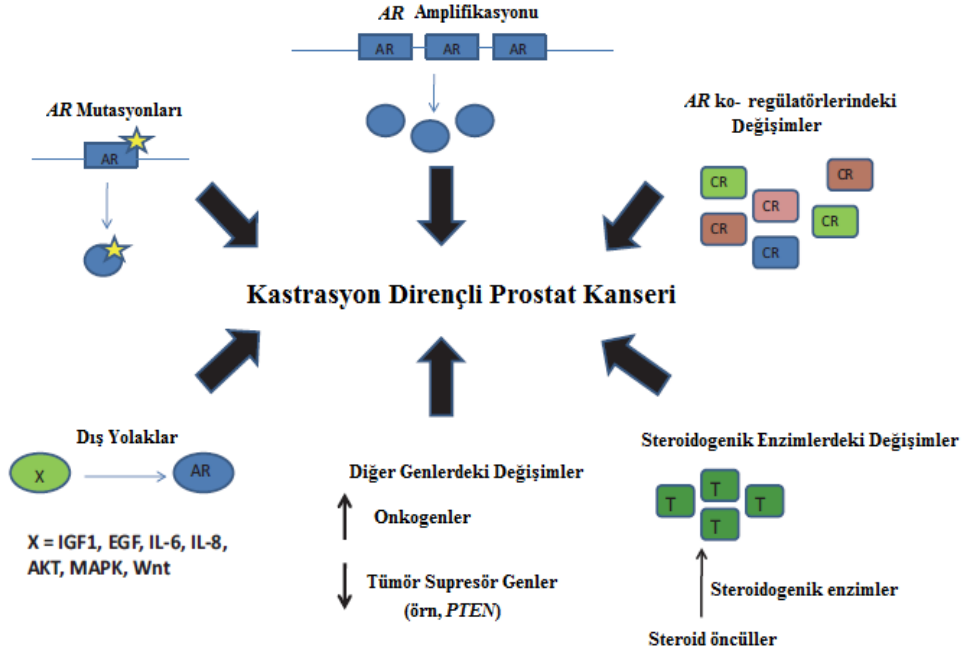
**A metil koenzim-A rasemaz (AMACR) geni:** 5p13 lokalizasyonlu *AMACR* geni yağ asidi oksidasyonunda görevli bir protein kodlamaktadır. Prostat kanserli olgularda %88 oranında ekspresyon artışı olduğundan diagnostik bir biyobelirteç adayı olarak dikkat çekmektedir (68).

**Androjen reseptör (AR) geni:** Xq11-12 lokalizasyonlu, nükleer reseptör sperailisine ye bir steroid tiroid hormon reseptör genidir. Ligand (androjen ya da androjen türevi moleküller) ile indüklenen bir transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörünü kodlamaktadır. *AR*, prostatik dokularda normal gelişim için gerekli transkripsiyon faktörü görevi ile *PSA (KLK3)* geni ve *TMPRSS2-ERG* füzyonunun da yer aldığı hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (4). Erken evre prostat kanserlerinde fonksiyon kazanımı ile sonuçlanan *AR* somatik mutasyonlarının sıklığı %4 gibi düşük bir oran iken ileri evre rekürens gösteren tümörlerde ve KDPK'de *AR* mutasyon oranı %20-25'e ulaşmaktadır (69). Ek olarak *AR* amplifikasyonları da KDPK progresyonundan sorumlu tutulmaktadır.

#### **2.4.3. Prostat Kanseri Progresyonundan ve Kastrasyon Direncinden Sorumlu Tutulan Moleküler Değişimler**

Lokal ileri prostat kanserinin cerrahi ya da kimyasal olarak endokrin tedavisi sonrasında tedaviye direnç geliştiren prostat kanseri formu olarak ortaya çıkan KDPK'nın moleküler temelleri ve KDPK progresyonunu önceden tahmin edilmesini sağlayacak moleküler biyobelirteçler henüz bilinmese de hastalığın bu formunda özellikle *AR* sinyalizasyonunu kapsayan pek çok değişimin ve onkogenik aktiviteye katkı sağlayan diğer yolakların etkili olduğu düşünülmektedir (4). Prostat kanserinin en agresif formu olan KDPK'da prostat kanser hücreleri ana yaşam faktörü olan androjenden bağımsız olarak çoğalabilir hale gelseler bile hücre yaşamı hala *AR* sinyal sistemine bağlıdır. *AR* amplifikasyonu ile fazla miktarda üretilen reseptör, kanser hücrelerini minimal androjen konsantrasyonlarına duyarlı hale getirir. *AR* değişimlerini ilgilendiren bir diğer mekanizma ise fonksiyon kazanımı mutasyonlarıdır. Ligand bağlanma domainini kodlayan bölgede meydana gelen mutasyonlar, reseptörün ligand spesifitesini düşürerek reseptörü diğer steroid hormonlar ile de aktif hale getirir (70). KDPK'da *PTEN* inaktivasyonunun ve *AR* transkripsiyonel aktivitesinin artmasına sebep olarak dolaylı

yoldan AR sinyalizasyonu etkileyen aktif sinyal yollarının (AR bağımsız değişimler) (PI3K-Akt-mTOR ve MAPK) etkisi de söz konusudur. Ek olarak IL-6, EGF, TGF-beta, VEGF, IGF, ve EGFR gibi büyüme faktörleri ve büyüme faktörü reseptör genlerinin ekspresyonlarındaki artış da metastatik prostat kanseri ve KDPK progresyonu ile ilişkilendirilmiştir (4). KDPK progresyonundan sorumlu tutulan moleküler değişimler Şekil-10'da özetlenmiştir.

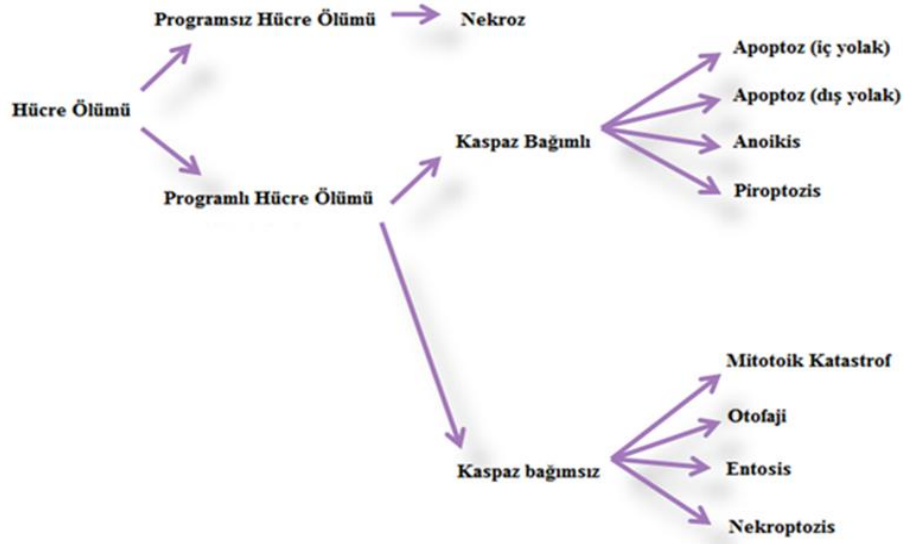


**Şekil-10** Kastrasyon direncinden sorumlu tutulan moleküler değişimler (4)

## 2.5. Hücre Ölümü ve Kanser İlişkisi

Çok hücreli organizmalarda doku homeostazisinin sağlıklı şekilde sürdürülmesi için dokuyu oluşturan hücrelerde yaşam ve ölüm arasındaki dengenin korunması gerekmektedir. Gelişim ve farklılaşma sürecinde çevresel ya da fizyolojik etmenler nedeni ile fonksiyonunu yerine getiremeyecek düzeyde hasar gören hücrelerin yaşamları, normal koşullarda hücre içi ölüm yollarının kontrollü aktivasyonu ile sona ermektedir. Ancak hücre proliferasyonunda sürekli artış ile karakterize kanser hastalığında hücre ölüm yollarının kontrollü aktivasyonu kaybolmakta ve hücre ölümünden kaçış gerçekleşmektedir (71). Günümüzde hücrenin morfolojik görüntüsüne, ölüm yollarında rol oynayan enzimlere ve immünolojik karakterlere bağlı olarak çeşitli hücre ölüm tipleri (Şekil-11) tanımlanmasına rağmen kanser terapisinde hedeflenen ölüm tipi programlı hücre ölümüdür. Mevcut kemoterapötik yaklaşımların tümünde kanser hücresinde işlevi bozulan

programlı hücre ölümünün DNA'ya hasar verme yolu ile yeniden uyarılması hedeflenmektedir. Çünkü kanser hücrelerinde hücre ölümünden kaçış, esas olarak programlı hücre ölümünü yönlendiren yollardaki bozulmalar sonucu gerçekleşmektedir (72). Programlı hücre ölümünü yönlendiren moleküler sinyal yollarının aydınlatılması kanser tedavisinde hedefe yönelik yeni ilaçların geliştirilmesine de katkı sağlayacaktır.



Şekil-11 Hücre ölümü tipleri (73)

### 2.5.1. Kanser Tedavisinde Hedef Olarak Programlı Hücre Ölüm Tipleri

Günümüzde aydınlatılabilen mekanizmalar doğrultusunda programlı hücre ölüm tipleri, birbirinden tamamen farklı işlediği kanıtlanan ve morfolojik farklılıklar sebebiyle kolaylıkla ayırt edilebilen apoptoz, otofaji ve nekroptoz şeklinde major olarak üçe ayrılmaktadır (74). Kontrollü sinyal sistemleri ile işlemleri nedeni ile programlı hücre ölümü olduğu düşünülen anoikis, piroptozis, mitotik katastrof ve entosisin üç major programlı hücre ölüm tipi ile ortak noktaları olduğu bilinmekle birlikte moleküler temelleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hücre morfolojisindeki değişimler ile aktifleşme mekanizması ve regülasyonu en iyi tanımlanmış olan ölüm tipi, programlı hücre ölümü tip 1 olarak bilinen apoptozdur. İlk kez Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanan apoptotik ölümde hücrede spesifik morfolojik ve biyokimyasal değişimler gerçekleşmektedir (75). Apoptotik bir hücrede gerçekleşen

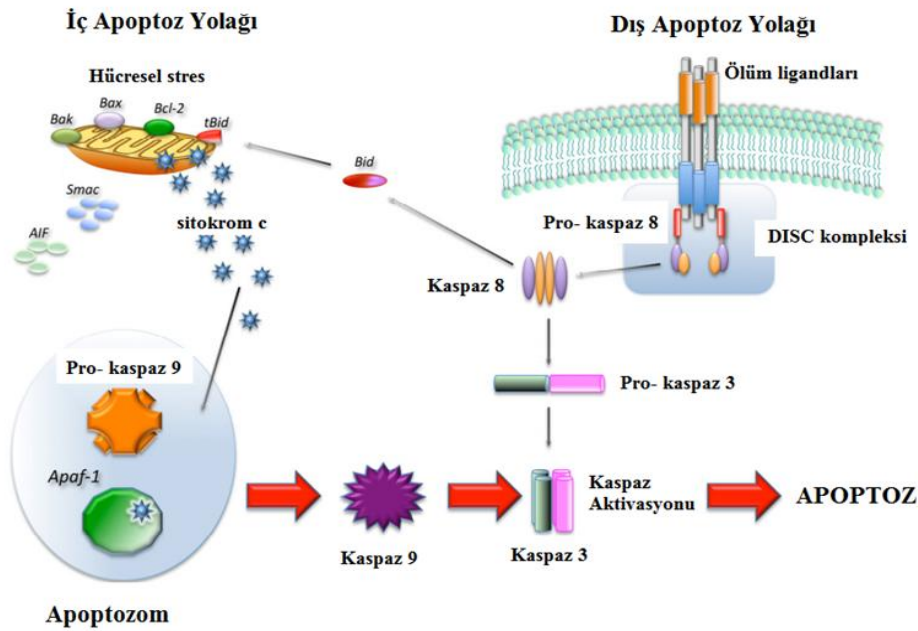
başlıca morfolojik değişimler hücre büzülmesi, nüklear kondensasyon ve fragmentasyon, hücre zarının kabarması, hücrede ekstrasellüler matriks adhezyonunun azalmasıdır. Biyokimyasal değişimler ise DNA'nın internükleozomal fragmentler şeklinde parçalanması, hücre membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin dış yüze translokasyonu ve hücre içi substratların spesifik proteolizis süreçleri ile yıkılmasıdır (76-77). Gerçekleşen bu değişimler ile apoptotik bir hücre morfolojisi nekrotik hücre morfolojisinden kolaylıkla ayrılır.

Apoptotik ölüm iç apoptoz ve dış apoptoz yolağı olarak bilinen iki ana yoldan birinin aktivasyonu ile gerçekleşir (78). Her iki yolda ortak olarak hücre içi bileşenlerin parçalanmasını sağlayan kaspaz adı verilen proteolitik enzimler görev alır. Kaspazlar fonksiyonelliklerine göre başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8, 9 ve 10) ve başlatıcı kaspazlar tarafından kesim ile aktive olan efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (79).

Büyüme faktörü veya hormon eksikliği, tamir edilemeyecek düzeyde DNA hasarı, oksidatif stres ya da onkogen aktivasyonu gibi genellikle hücre içi sinyaller tarafından yönlendirilen iç apoptoz yolağının aktifleşmesi mitokondriyal bileşenlerin kontrolü altında sağlanır. Hücre içi sinyaller ile mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişmesi (MOMP) sonucu mitokondri dış membranından pro-apoptotik moleküllerin salınımı uyarılmaktadır. Salınımı gerçekleştirilen moleküller apoptozun erken ve geç evrelerine göre iki grupta toplanır. İlk grupta yer alan ve erken evrede salınan Smac/DIABLO ve sitokrom-c kaspaz-bağımlı yolağı aktive eden moleküller olarak görev yapar; sitokrom-c salınımının uyarılması sonucu, sitozolde Apaf-1 ve pro- kaspaz 9 tarafından "apoptozom" molekülü oluşturulurken pro- kaspaz 9, kaspaz 9 şeklinde aktifleşir. Aktif hale geçen kaspaz 9'un kaspaz 3'ü uyarması ile apoptoz gerçekleşir (80). Smac/DIABLO molekülü ise bu süreçte apoptozu inhibe eden proteinlere (IAP) bağlanarak devaktivasyondan sorumlu görev üstlenmektedir. Apoptozun geç evresinde salınımı yapılan moleküller ise apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve endonükleaz G (Endo G)'dir. Geç evrede nükleusa translokasyonu gerçekleşen AIF, DNA fragmentasyonunu başlatmakla görevlidir (81). Mitokondri bağımlı apoptozun regülasyonu ise sitozolde lokalize Smac/DIABLO tarafından kontrol edilen IAP'lara ek olarak dış mitokondriyal membranda lokalize Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından sağlanır. Bcl-2 ailesi proteinler Bcl-2 homoloji (BH) domain yapılarına göre anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerden oluşur. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesine üye proteinler BH-1,4 domain yapısına sahip Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> ve Mcl-1 ile BH-3 domain yapısına

sahip Bim, Bad, Bmf, Noxa ve Puma'dır. BH-1,3 domain yapısındaki Bax ve Bak ise pro-apoptotik fonksiyona sahiptir. Bax proteininin, iç yolağın aktivasyonunda Bad ve Bid ile dimer yapısı oluşturarak MOMP'u uyardığı ve sitokrom-c salınımından sorumlu başlatıcı protein olduğu bilinmektedir (82).

Hücre dışı sinyaller ile yönlendirilen dış apoptoz yolağı ise spesifik ligandların ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen transmembran proteinlere bağlanması ile uyarılır. Hücre yüzeyinde tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesine üye TNFR, Fas (CD95) ve TNF ilişkili apoptoz tetikleyici ligand reseptörü (TRAIL) olmak üzere tanımlanmış üç farklı ölüm reseptörü bulunmaktadır (83). İlgili ligandların (FasL ve TNF gibi) reseptörler ile birlikteliği sağlandıktan sonra ölüm domaini içeren protein ve pro-kaspaz 8'den oluşan ölüm uyarıcı sinyal kompleksi (DISC) oluşmakta ve eş zamanlı olarak pro-kaspaz 8, kaspaz 8 şeklinde aktive olmaktadır (84). Aktifleşen kaspaz 8'in kaspaz 3'ü aktif hale getirmesi ile apoptoz gerçekleşmektedir (Şekil -12).



**Şekil-12** Apoptozun iç ve dış sinyal yolları (85)

Programlı hücre ölümü tip 2 olarak bilinen otofaji, sitoplazmik makromoleküllerin ve organellerin etrafını saran çift membranla çevrili "otofagozom" yapılarının oluşması ile başlayan, hücrelerin geri dönüşüme gönderildiği evrimsel olarak korunmuş katabolik bir süreçtir. Bu süreçte büyüme faktörü yokluğunda oluşan hüresel stres ve açlık durumunda minimal hücre fonksiyonu için gerekli enerjinin sağlanabilmesi için hücre içi

makromoleküller yıkılmaktadır (86). Bu anlamda otofaji, hücre yaşamının devam etmesi yönünde gerçekleşen kritik pro-survival öneme sahiptir. Yaşamsal fonksiyona sahip bir hücre ölüm tipi olmasından dolayı otofajinin kanser tedavisinde hedeflenen programlı hücre ölüm tipi olarak değerlendirilmesi tartışmalıdır (87).

Programlı hücre ölümü 3 olarak nitelendirilen ve programlanabilen nekroz tipi olarak literatüre son yıllarda geçen nekroptozda ise sırasıyla hücrenin şişmesi, organellerde parçalanma, hücre membran bütünlüğünün bozulması ve hücrenin lizisi sonrası inflamasyon söz konusudur. Nekroz, kontrolsüz bir süreç olarak rastlantısal hücre ölümü olarak bilinmekteyken nekrotik ölümün anahtar aracı moleküllerinin keşfi ile nekrozun programlanabilir bir hücre ölümü olduğu kanıtlanmıştır (88). Nekroptoz adı verilen bu süreçte reseptör ile etkileşen protein (RIP) kinazlar, poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP1), NADPH oksidazlar ve kalpainler görev almaktadır (89). İnflamasyonun tümör büyümesi üzerindeki etkileri bilinmiyor olmasına rağmen son yıllarda nekrotik hücre ölümünün kanser tedavisinde hedeflenebilir bir hücre ölüm tipi olabileceği düşünülmektedir (90).

## **2.6. Kanser Hücrelerinde İnvaziv Süreçler**

Tümörün oluşumu, progresyonu ve invazyonu farklı hücre tiplerinin yer aldığı tümör mikroçevresi içerisinde kompleks etkileşimlerin bir sonucu olması dolayısıyla çok basamaklı bir süreci gerektirir. Bu süreç içerisinde birbiri ardına gerçekleşen pek çok moleküler olayın genellikle sırası aynı olmakla birlikte şu şekildedir (91);

- Primer tümör bölgesinden lokal migrasyon
- Kan dolaşımı içine giriş (intravazasyon)
- Dolaşım sirkülasyonu içinde yaşam
- Kan dolaşımından çıkış (ekstravazasyon) ve hedef dokuya geçiş
- Yeni bölgede kolonizasyon

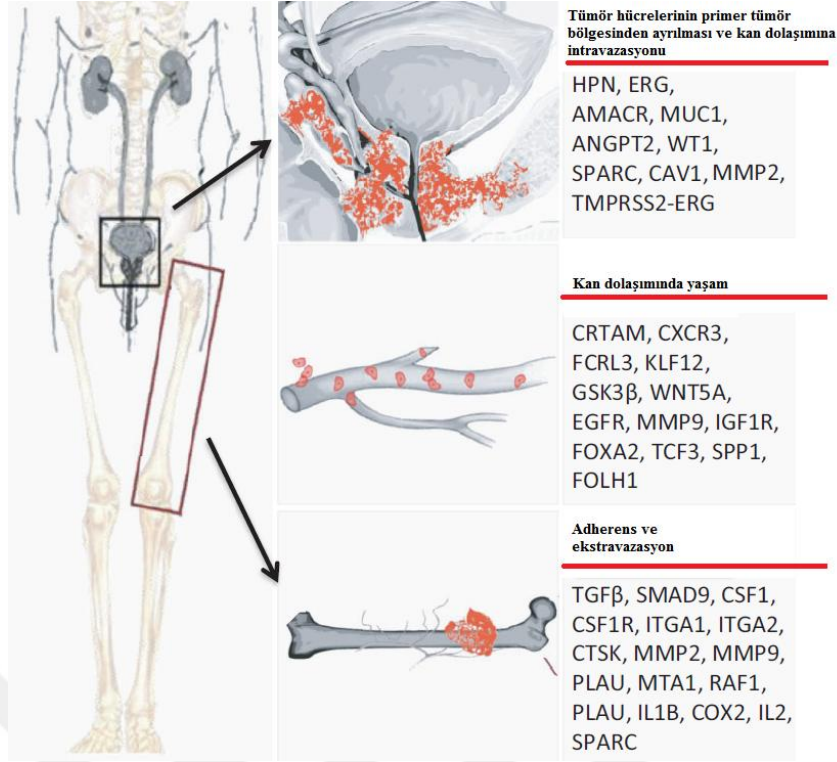
### **2.6.1. Prostat Kanseri İnvaziv Süreçler ve Moleküler Mekanizmaları**

Prostat kanserine bağlı ölümler, büyük oranda kastrasyona dirençli kanser hücrelerinin primer organdan yeni bir bölgeye yayılımı olarak tanımlanan uzak metastaz kaynaklıdır (92). Sekonder bölgede gelişen tümörün lokalizasyonu ise rastgele olmamaktadır. Prostat



kanserinde uzak metastaz çok büyük bir oranda kemikte gerçekleşmekte ve kanser hücreleri metastaz bölgelerinde osteoblastik lezyonlar oluşturarak kemiğin büyümesine neden olmaktadır (93).

Prostat kanserinde metastazın ilk basamağını primer bölgede proliferasyon, hücrelerin ilgili bölgeden ayrılması ve malignant hücrelerin migrasyon sonucu kan damarlarına ya da lenf dokuya girişi oluşturmaktadır. Normal prostat dokusunda epitel hücrelerin migrasyon yeteneği birbirlerine ve ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerine sıkı adherens göstermeleri nedeniyle oldukça sınırlıdır. Malignant dönüşüm sırasında epitel hücrelerin adhezyon özelliklerinde azalma meydana gelmekte ve hücrelerin migrasyon özelliklerinde artış olmaktadır (94). Lokal adhezyon ve migrasyonun yanı sıra prostat kanseri hücreleri invaziv süreçlerin başında ECM yıkımını uyararak çevre doku içine yayılımla birlikte dolaşıma geçmektedir. Prostat dokusundan ayrılarak kan dolaşımına katılan prostat kanseri hücreleri yaşamsal (pro-survival) genlerin ekspresyon düzeylerindeki artış ve apoptozu uyaran genlerin ekspresyonundaki düşüş ile yeni mikroçevreye hızlıca adapte olmaktadır (95). Yüksek evreli metastatik prostat kanseri hastalarında kanda sirküle tümör hücreleri ile yapılan mikroçip tabanlı bir çalışmada invazyon süreci ile ilişkili *GSK3β*, *WNT5A*, *EGFR*, *MMP9*, *IGF1R*, *FOXA2*, *TCF3*, *SPPI*, *FOLH1*, *PIM2* ve *ACP5* genlerinin ekspresyonunda değişim saptanmıştır (96). Tümör hücrelerinin kan dolaşımından çıkışı (ekstravazasyon), kemik mikroçevresi içindeki adaptasyon ve sekonder tümör oluşumunun moleküler mekanizmaları henüz anlaşılmasa da bu sürecin çevre dokuda adhezyon sonrasında proteaz yıkımını gerektiren bir süreç olduğu bilinmektedir. Prostat kanseri hücreleri ve kemik hücrelerinin aynı ortamda kültürünün sağlandığı bir çalışmada ekstrasellüler matriks proteinlerinin, matriks proteazların, koloni uyarıcı faktörlerin ekspresyon düzeylerinde değişim saptanmıştır (97). Prostat kanserinde invaziv süreçlerin üç basamağından sorumlu olarak tanımlanmış genler ve sorumlu oldukları aşamalar Şekil-13'de özetlenmiştir.

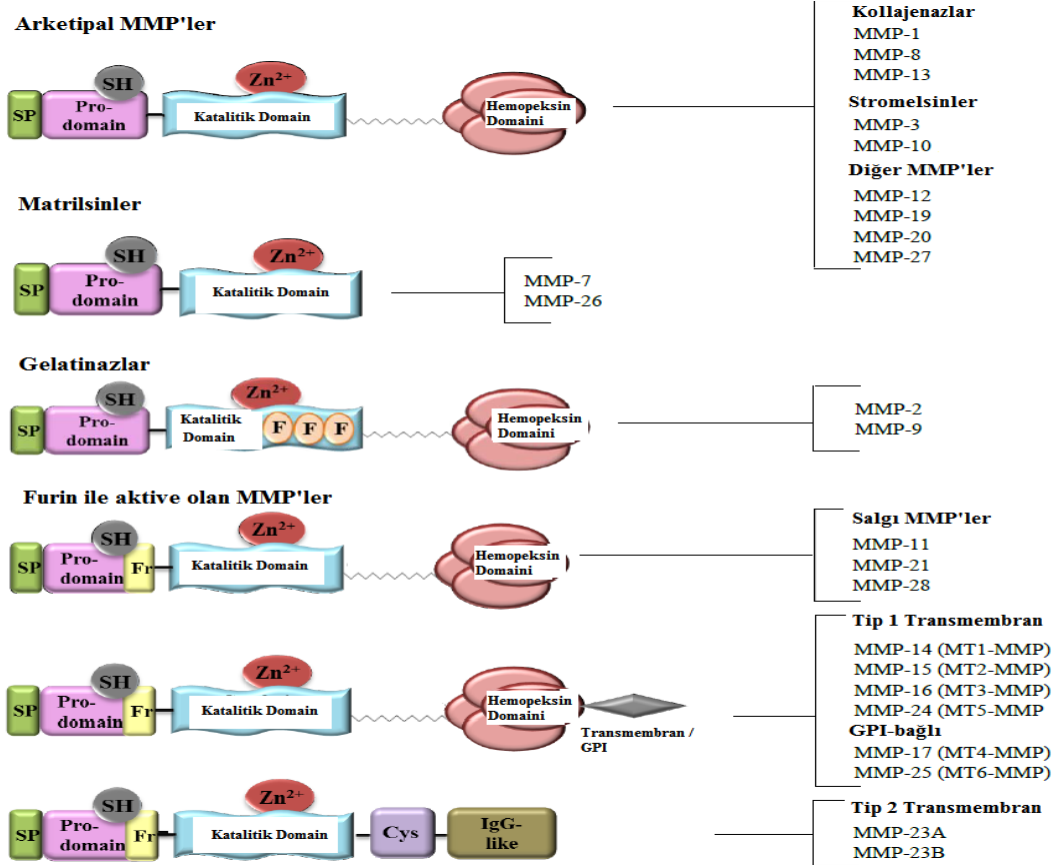


**Şekil-13** Prostat kanserinde invaziv süreçler ve sorumlu tutulan genler (95)

### 2.6.1.1. Matriks Metalloproteainaz (MMP) Ailesinin Prostat Kanserinde İnvaziv Süreçlerdeki Etkileri

Tümör hücrelerinin yayılımını kolaylaştıran invaziv süreçler ECM temel bileşenlerinin proteolitik sistemler tarafından hidroliz edilmesini gerektirir. Bugüne kadar pek çok proteaz kanserde invaziv süreçler ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen matriks metalloproteainaz (MMP) ailesi olarak isimlendirilen ve 24 enzimden oluşan spesifik enzim grubu antitümöral etkilerin değerlendirildiği pek çok çalışma için odak noktası oluşturmaktadır (98). MMP enzim ailesi ECM yapısal proteinlerini hidroliz etme yeteneğinde metal iyonlarına bağlı katalitik aktivite gösteren bir enzim grubudur (99). Tipik bir MMP bir sinyal peptid domain, bir pro-peptid domain ve bir katalitik domainden oluşan çoklu domain yapısına sahiptir (Şekil-14). Yapısal olarak MMP'ler arketipaller (tip 1 kollajenazlar), matrilsinler (membran tip MMP'ler), gelatinazlar ve furin ile aktive olan MMP'ler olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (100). Her bir grubun ana yapısal domainler dışında birbirinden farklı özellikleri bulunmaktadır; arketipal MMP'ler kollajenazlar, stromelinler ve diğer arketipal MMP'ler olmak üzere alt gruplara ayrılırken matrilsinler hemopeksin domaininden yoksun olan MMP grubunu oluşturur. Gelatinazlar

katalitik domainlerinde fibronektin tekrarlarına sahiptir. Furin ile aktive olan MMP'ler ise her biri furin tanıma motifi içeren salgı MMP'lerin yanı sıra membrana bağlanabilme özellikleri olan Tip 1 transmembran ve Tip II transmembran MMP'ler olmak üzere üç alt grupta toplanır. Membrana bağlanma tipine bağlı olarak bazı transmembran tip MMP'lerde glikofosfatidilinositol (GPI) çapaları mevcuttur (Şekil-14).



Şekil-14 Memelilerde MMP ailesinin domain yapısına göre sınıflandırılması (100)

### 2.6.1.2. Matriks Metalloproteinaz Enzimlerinin Regülasyonu

Hücre içinde MMP aktivitesi transkripsiyon düzeyinde (mRNA) ve aktivatörler /inhibitörler aracılığıyla protein düzeyinde sıkı şekilde düzenlenmektedir. Ekspresyonun mRNA düzeyinde kontrolünün yanı sıra metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) olarak isimlendirilen bir ekstrasellüler protein ailesi MMP aktivitesinin protein düzeyinde negatif regülasyonunu sağlamaktadır. TIMP protein ailesinin TIMP-1, -2, -3 ve -4 olmak üzere dört üyesi tanımlanmıştır. MMP'lerin önemli regülatörleri olarak bilinen TIMP'ler

hücre-hücre ve hücre-matriks adhezyon molekülleri ile ECM yoğunluğunun belirlenmesinde rol oynamaktadır (101, 102).

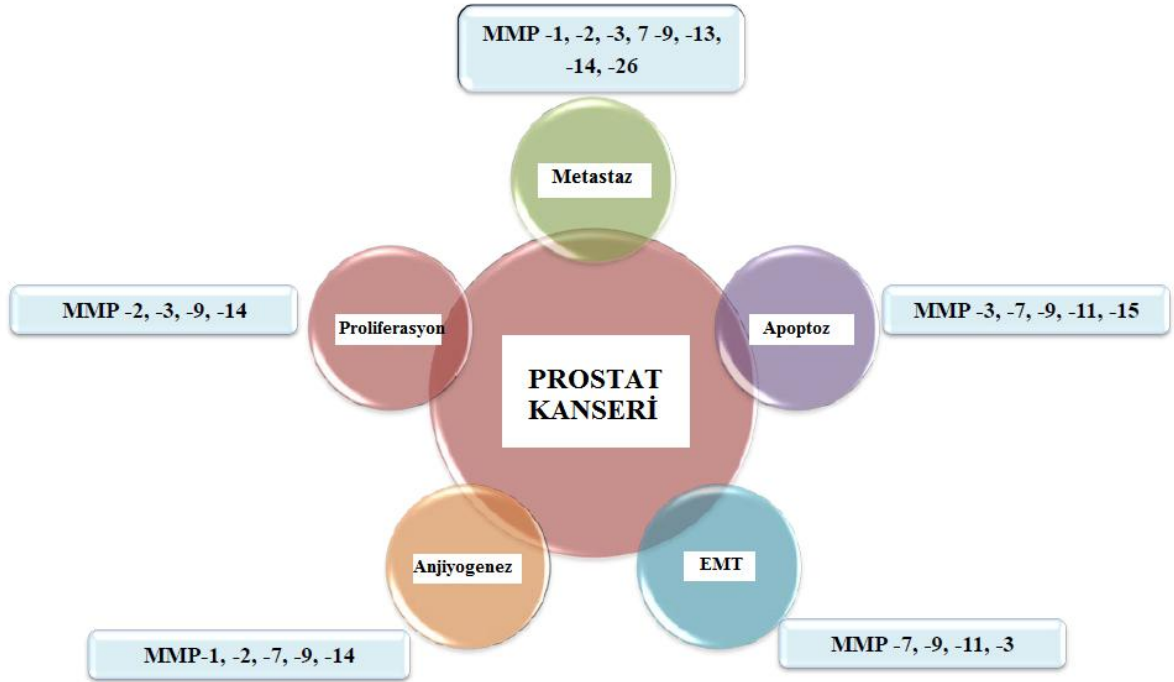
### **2.6.1.3. Prostat Kanserinde Matriks Metalloproteinazların Fonksiyonu ve Regülasyonu**

Prostat kanserinde MMP ve TIMP ekspresyon düzeylerindeki dengesizlik sonucu MMP upregülasyonu ve TIMP downregülasyonu söz konudur. Artmış MMP ekspresyonu ve aktivitesinin prostat kanseri progresyonuna metastazı kolaylaştırmak ile katkı sağlamanın yanında hücre proliferasyonunda artış, apoptozdan kaçış, anjiyogenezi teşvik etmek gibi pek çok süreçte etkin olduğu bildirilmiştir (Şekil-15). Genel olarak prostat kanserinin ileri evrelerinde MMP'lerin daha aktif oldukları (103) ve Gleason skoru yüksek prostat kanserlerinde çoğu MMP'nin yüksek ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir (104). Prostat kanseri hastalarının doku örnekleri ile yapılan çalışmalarda özellikle MMP-2, -3, -7, -9, -13, -14, -15 ve -26 ekspresyonlarındaki artış ile ileri ve/veya metastatik hastalık arasında (100), MMP-1 ekspresyonu ile de invazyon insidansının daha az olduğu düşük evreli prostat kanseri arasında korelasyon saptanmıştır (105). Prostat kanserinde MMP ekspresyonlarını değerlendiren çalışmalardan bazıları ve sonuçları Tablo-3'de listelenmiştir. Prostat kanserinin progresyonundaki rolleri açısından MMP ailesi içinde en çok üzerinde durulan ve rolleri daha iyi aydınlatılmış olan grup ise MMP-2, -7, -9 ve MT1-MMP'dir (100).

**Tablo-3** Prostat kanserlerinde MMP ekspresyonlarının değerlendirildiği bazı çalışmalar ve sonuçları

MMP	Yöntem	Sonuç	Referans
MMP-2 ve TIMP-1	Northern Blot	Yüksek evre prostat kanseri örneklerinde MMP-2/TIMP-1 anlamlı oran artışı	(106)
MMP-2	IHC	Malignant prostat kanseri dokularında Gleason skoruna bağlı olmaksızın ekspresyon artışı	(107)
MMP-2	ELISA	Kemik metastazı gösteren prostat kanseri örneklerinde serumda artış	(108)
MMP-9	Zimografi	Bening prostat hiperplazi doku örneklerine göre malignant prostatik dokularda aktivite artışı	(109)
MMP-2,-9,-13	ELISA	Uzak metastazı pozitif olan prostat kanserli olguların plazma örneklerinde artış	(103)
MMP-9	qRT-PCR	Ekspresyon düzeyindeki artış biyokimyasal rekürrens ile ilişkili	(110)
MMP-2,-9	IHC	Dokudaki artış konvensiyonel prognostik faktörler ile ilişkili	(111)
MMP-2	IHC	Malignant epitel hücrelerde saptanan ekspresyon artışı kısa yaşam süresi ile ilişkili	(112)

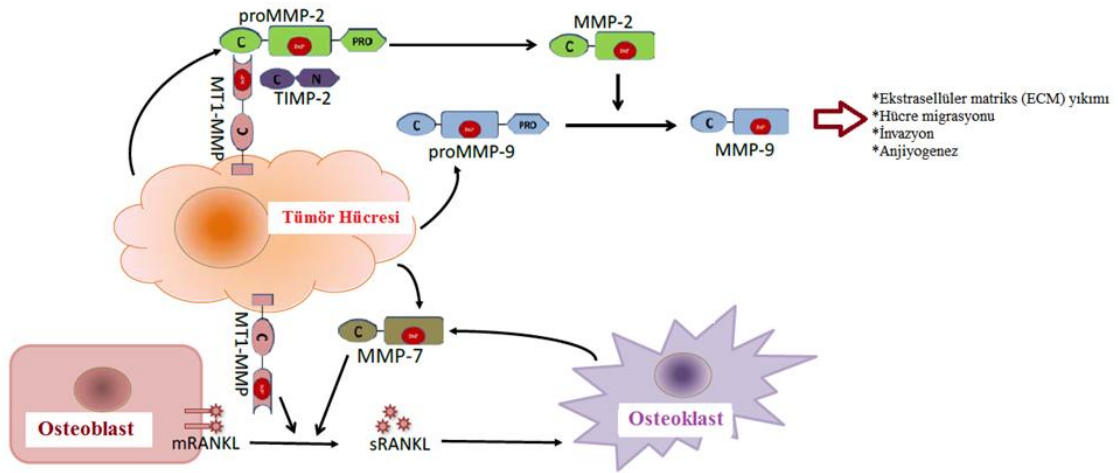
IHC: Immünohistokimya, ISH: *in situ* hibridizasyon



**Şekil-15** Prostat kanseri progresyonunun farklı aşamalarında görev alan matriks metalloproteinazlar (100)

### 2.6.1.3.1. Matriks Metalloproteinaz- 2 (MMP-2)

Matriks metalloproteinazların gelatinaz alt ailesine üye MMP-2 (Gelatinaz A) fibronektin-benzeri gelatin bağlama domaini ile ECM bileşeni olan gelatinin yıkımını sağlama yeteneğinde proteolitik bir enzimdir (113). Ekstrasellüler matriks üzerindeki proteolitik aktivitesinin yanı sıra enzimatik kesim ile MMP-9 aktivasyonundan sorumludur (114) (Şekil-16). Prostat kanserinde *MMP-2* ekspresyonunda artış olduğu ve özellikle yüksek patolojik TNM evresine ve yüksek Gleason skoruna sahip tümörlerde *MMP-2* ekspresyonunun daha da arttığı pek çok çalışma ile doğrulanmıştır (104, 115, 116). Murray ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen daha yeni bir çalışmada ise *MMP-2* ekspresyonunun prostat kanserinin agresif progresyonu ve metastaz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (117).



Şekil-16 Prostat kanseri progresyonunda MMP-2, -7 ve -9'un rolleri ve etkileşimleri (100)

### 2.6.1.3.2. Matriks Metalloproteinaz- 9 (MMP-9)

Matriks metalloproteinazların gelatinaz alt ailesine üye MMP-9 (Gelatinaz B) inaktif formda sentez edildikten sonra MMP-2 tarafından aktif hale getirilir (Şekil-16). Tümör hücrelerinden köken alan MMP-9'un MMP-2 fonksiyonuna benzer olarak kanser metastazında görev aldığı bilinmektedir (118). Trudel ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada prostat kanseri dokusunda %94.1 oranda intrasellüler *MMP-9* ekspresyonunun varlığı yüksek Gleason skoru ile ilişkilendirilmiş ancak prognostik bir sonuca ulaşamamıştır (119). Başka bir çalışmada ise radikal prostatektomi sonrası analiz

edilen invaziv fenotipte olmayan 22 lokalize primer prostat kanserli dokuda ise gelatinolitik ekspresyon düzeyinin düşük bulunması gelatinolitik aktivitenin agresif fenotipe bağlı arttığı sonucunu doğrulamaktadır (120). Değişen *MMP-9* ekspresyon düzeyinin prostat kanserinde invazyon ve metastatik özellikler ile olan ilişkisi *in vitro* çalışmalarda yaygın kullanılan prostat kanseri hücre hatlarında da doğrulanmıştır. LNCaP, DU145 ve PC-3 hücreleri invazyon aktiviteleri ile korele olarak sırasıyla düşük, orta ve yüksek *MMP-9* eksprese ettikleri bildirilmiştir (121). İnvaziv özellikleri oldukça yüksek olan DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında *MMP-9* ekspresyonunun siRNA-aracılı susturulması sonucu anjiyogenezin azalarak apoptozun uyarıldığı bildirilmiştir (122, 123). İnvaziv özelliği bulunmayan LNCaP hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise *MMP-9* transfeksiyonu sonrası invaziv özelliklerde artış olduğu bulunmuştur (124).

## **2.7. Kanser Tedavisinde Bitkilerin Yeri ve Önemi**

Günümüzde çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların çoğu bitkisel kökenlidir. Prostat kanserinin agresif formu olan KDPK kemoterapisinde de kullanılan mevcut ilaçlar (dosetaksel ve kabazitaksel), kanser hücrelerinde hücre bölünmesi sırasında iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyen mitoz bloke edici ajanlar olarak etki gösteren taksan türevleri olup *Taxus* cinsi bitkilerden elde edilen diterpenlerdir (5). Ek olarak irinotekan, etoposid, paklitaksel, vinkristin ve vinblastin gibi diğer kanser türlerinin kemoterapisinde yaygın kullanılan ilaçlar da bitkisel kökenli ajanlardır (125). Kanser tedavisi için yeni terapötik yaklaşımların oluşturulmasında bitkisel metabolitler hala yoğun ilgi çekmektedir.

### **2.7.1. *Juniperus* L. (Ardıç) Bitkisi**

Ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede 70 tür ile temsil edilen *Juniperus* L. (Cupressaceae) özellikle Himalayalar, Tayvan, Tropikal Afrika ve Batı Hint Adaları gibi güneyin dağlık alanları içerisine kadar uzanan bir yayılım göstermektedir (126). Türkiye'de ise yerel bölgelerde genellikle "Ardıç" ismi ile bilinen *Juniperus* L. 7 tür ile temsil edilmektedir (127). *Juniperus* cinsi *Juniperus* ve *Sabina* Spach. olmak üzere 2 alt şubeye ayrılmaktadır. *Juniperus* şubesindeki türler asikular (iğnemi), oldukça sert ve tabanda eklemli yaprakları ile tespit edilmektedir. *Sabina* Spach. şubesine üye türler ise pul benzeri yapraklara sahip olmakla birlikte asikular yapılı yapraklara sahip bazı türlerde tabanda eklem yapısı gözlenmemektedir. *Juniperus* şubesi içinde *J. drupacea* Lab., *J.*

*communis* L., ve *J. oxycedrus* L. olmak üzere 3 tür yer alırken *Sabina* Spach. şubesinde ise *J. phoenicia* L., *J. foetidissima* Willd., *J. sabina* L., ve *J. excelsa* M.Bieb. isimleri ile 4 tür bulunmaktadır (128, 129).

### **2.7.1.1. Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen *Juniperus* L. Türleri**

Türkiye'de doğal olarak yetişen *Juniperus* cinsi üyeleri *J. communis* L. subsp. *communis*, *J. communis* L. subsp. *nana* Syme, *J. communis* L. subsp. *hemisphaerica* (Presl.) Nyman, *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, *J. oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Ball., *J. phoenicea* L., *J. foetidissima* Willd., *J. sabina* L., *J. oblonga* Bieb., ve *J. excelsa* Bieb. olmak üzere 10 takson altında 7 tür ile temsil edilmektedir (130).

### **2.7.2. *Juniperus* L. Türlerinin Farmakolojik Özellikleri**

Esansiyel yağlar, tanenler, fenolik bileşikler, flavonoidler, lignanlar ve terpenoidler yönünden zengin bitkiler olan *Juniperus* L. türlerinin çeşitli farmakolojik özellikleri nedeniyle dünya çapında geleneksel tıpta kullanımları oldukça yaygındır. Ülkemiz de dahil olmak üzere dünyanın pek çok ülkesinde *Juniperus* L. türlerinin deri iltihaplarına, baş ağrılarına, sindirim yolu hastalıklarına, bronşit, astım, böbrek ve idrar yolu rahatsızlıklarına, romatizmaya, solunum yolu rahatsızlıklarına, sinüzite, karaciğer rahatsızlıklarına ve metabolizma bozukluklarına iyi geldiği bilinmekte ve geleneksel tıpta *Juniperus* L. türlerinden sıklıkla faydalanılmaktadır (11, 131). Yapraklarından ve meyvelerinden elde edilen özütler ve esansiyel yağlar soğuk algınlığı, üriner enfeksiyonlar ve dermatolojik hastalıklar gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (132). Bugüne kadar *Juniperus* L. türlerinin sahip olduğu çeşitli biyolojik aktiviteler; antiinflamatuvar (133, 134), diüretik, antiseptik (135-139), antihelmintik (140), hipoglisemik (141), hipotensif, abortif, antinosiseptif ve vazorelaksatif (133, 142), antimikrobiyal (14, 143-145), antiviral (146), antioksidatif (14, 134, 139, 143, 147-149), antikolinesteraz (148, 149) ve analjezik (150) çeşitli çalışmalar ile doğrulanmıştır. Ek olarak sedef hastalığının (151) ve nörastenik nöroz (152) tedavisinde kullanımları sonucu potansiyel etkileri doğrulanmıştır. Tavares ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada farklı *Juniperus* L. türlerine (*J. navicularis*, *J. oxycedrus*, *J. phoenicea* ve *J. turbinata*) ait fenolik bileşiklerce zengin fraksiyonların nöro-koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (15). Ayrıca ardıç yağı ve seyreltilmiş ardıç tohumu çayının vücutta birikmiş



olan laktik asidi azalttığı, çocuklardaki böbrek iltihaplanmasına ve kronik mesane hastalıklarına iyi geldiği tespit edilmiştir. Kan dolaşımını arttırdığından düzenli alınan ardıç tohumu çayı vücuttaki ağrı semptomlarını da azaltmaktadır. Çeşitli ve şiddetli sinir sistemi bozukluklarında özellikle ilaçların etkisiz kaldığı durumlarda baş ağrısı, ense ağrısı, genel kırgınlık, mide krampı rahatsızlıklarında ardıç tohumu çayının abortif etkisi olduğu bilinmektedir. Özellikle migren vb. baş ağrılarında ardıç tohumu çayının sürekli kullanımı iyileşme sağlamaktadır (153, 154). Wegener ve Schmidt, *J. communis* meyvelerinin ürolojik ve hazımsızlık (sindirim güçlüğü) rahatsızlığı olan hastalarda uzun süre kullanımı sonucu meyvelerin diüretik özelliği sayesinde potansiyel etkilere sahip olduğunu ve bu amaçla kullanılan Roleca R adlı ardıç kapsülünün ise böbreklere zararı bulunmadığını bildirmişlerdir (155). Bunun yanı sıra *J. excelsa* Bieb. tüberküloz ve sarılık hastalıklarında, aynı türün meyvelerinden hazırlanan dekoksasyon soğuk algınlığı ve bronşit tedavisinde kullanım alanı bulmuştur (156). Finike ardıcının yapraklarından hazırlanan dekoksasyon ise antidiyabetik ve laksatif özelliklere sahiptir (157, 158). *J. communis* yaprakları Türkiye'de herbal mağazalarda satılmasının yanı sıra yerli ihracat kaynağı olarak da kullanılmaktadır (159). *J. oxycedrus* yaprak ve meyvelerinin kaynatılması ile elde edilen özütten ülkemizde hemoroit ve böbrek taşı tedavisinde yine diüretik olarak faydalanılmaktadır (160).

### **2.7.2.1. *Juniperus* L. Türlerinin Antitümöral Özellikleri**

Kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere sahip medikal bitkiler arasında *Juiperus* L. türleri antitümöral özellikteki çeşitli bileşiklerin zengin bir kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Bugüne kadar *Juniperus* L. türlerinin yaprak ve meyvelerinden farklı çözücüler ve yöntemler kullanılarak elde edilen özütlerin veya özütlerden elde edilen farklı tipte etken maddelerin pek çok farklı kanser hücresi üzerinde sitotoksik etkisi olduğu bildirilmiştir. Literatürde *Juniperus* L. türlerinin antitümöral özelliklerine yönelik günümüze kadar yapılan çalışmalar sitotoksik etkisi değerlendirilen *Juniperus* L. türü, ilgili türe ait özütün hazırlandığı çözücü, varsa belirlenebilen özüt içeriği, kullanılan kanser hücre hattı ve bulguları yönünden Tablo-4'de listelenmiştir.

**Tablo-4** *Juniperus* L. türlerinin antitümöral özelliklerine yönelik yapılan çalışmalar

<i>Juniperus</i> L. türü	Özütün hazırlandığı çözücü	İçeriği	Kullanılan kanser hücre hattı	Bulgular	Kaynak
<i>J. taxifolia</i> yaprağı	Kloroform	Diterpenler	HL-60	Özütten izole edilen 7- $\alpha$ -hidroksisandaropimarik asit 2.5 $\mu$ g/ml konsantrasyonda 24 saatte apoptozu uyarmıştır.	(161)
<i>J. drupacea</i> meyvesi	Metanol	Fenolik ve Flavonoid bileşikler	HepG2	Özütün IC <sub>50</sub> değeri 24 saat için 10 $\mu$ g/ml olarak belirlenmiştir.	(162)
<i>J. communis</i> meyvesi	Su	-	MCF-7/AZ	96 saat özüt muamelesi boyunca 50 $\mu$ g/ml'nin üzerindeki her dozda hücre canlılığında anlamlı inhibisyon belirlenmiştir.	(163)
<i>J. brevifolia</i> yaprağı	Hekzan, aseton ve etanol	Yeni spiro bileşikler	HeLa, A549, MCF-7	Özütten izole edilen 18- hidroksidehidroabietan molekülü 48 saatte HeLa hücrelerinde daha düşük dozda olmakla birlikte ortalama 25 $\mu$ M konsantrasyonda anlamlı inhibisyona yol açmıştır.	(164)
<i>J. oxycedrus</i> meyvesi	Metanol	Fenolik bileşikler	HepG2	24 saat periyodunda 5 ve 10 $\mu$ g/ml konsantrasyonlarda anlamlı inhibisyon saptanamamış ve bu sonuç düşük fenolik içerik ile ilişkilendirilmiştir.	(14)
<i>J. navicularis</i> , <i>J. oxycedrus</i> , <i>J. phoenicea</i> , <i>J. turbinata</i> türlerine ait yapraklar	Su ve etanol	Fenolik bileşikler	SK-N-MC	Özütlerden elde edilen fenolik fraksiyonlar 24 saat periyodunda 100 $\mu$ g/ml'den düşük dozda anlamlı inhibisyona yol açmıştır.	(15)
<i>J. foetidissima</i> ve <i>J. sabina</i> dal ve meyveleri	Etanol	-	HeLa, KB, MDA-MB-468	Kanser hücre hattına bağlı olarak 5 - 20 $\mu$ g/ml değişen dozlarda anlamlı inhibisyon saptanmıştır.	(165)
<i>J. excelsa</i> yaprak ve meyveleri	Etanol	-	HeLa, KB, MDA-MB-468	Sitotoksik etki belirlenen hücre hatlarında IC <sub>50</sub> dozunun 20 $\mu$ g/ml'den yüksek olduğu belirlenmiştir.	(166)
<i>J. excelsa</i> yaprakları	Etanol	-	HepG2	Özütün 48 saatte IC <sub>50</sub> dozu 0.54 mg/ml olarak saptanmıştır.	(167)
<i>J. communis</i>	Metanol, hekzan, diklorometan	Lignan	MB231	Özüt 1, 3 ve 5. gün periyotlarında 10 $\mu$ g/ml konsantrasyonda anlamlı inhibisyona yol açmıştır. Özütün farklı fraksiyonlarından elde edilen deoksipodofilotoksin molekülünün ise 24 saatte apoptozu uyardığı saptanmıştır.	(168)
<i>J. rigida</i>	Kloroform, metanol, hekzan, diklorometan	Lignan	A549, SK-OV, SK-MEL-2, HCT-15	İlgili hücre hatlarında özütten elde edilen 4 farklı lignan bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda IC <sub>50</sub> dozları saptanmıştır.	(169)
<i>J. sabina</i>	Etanol, hekzan, kloroform, butanol	Yeni diterpen bileşik	HL-60, HepG2, MCF7, HTC116, A549	Elde edilen sabiperon türevi bileşikler, 48 saatte ilgili hücre hatlarında farklı IC <sub>50</sub> konsantrasyonlarda anlamlı inhibisyona yol açmıştır.	(170)
<i>J. foetidissima</i> yaprak ve dalları	Aseton	Terpenoid	EJ-138, CAO-4	Özütten izole edilen üç farklı terpenoid bileşiğin ilgili hücre hatlarında orta düzeyde sitotoksik etkisi belirlenmiştir.	(171)

Farklı *Juniperus* L. türlerinden hazırlanan özütlerin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde sitotoksik olarak belirlenen etkin dozun ve sürenin, bitkinin türüne, özütün hazırlandığı çözücünün tipine, kullanılan kanser hücre hattına ve özütün farklı çözücüler ile fraksiyonlarından elde edilen içeriğine bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Hücre canlılığına toksik etkisi bulunmayan su ve/veya diğer çözücülere nispeten daha az toksik etkilere sahip olan alkol (etanol, metanol) türevleri kullanılarak hazırlanan özütlerde direkt olarak özütün sitotoksik etkisi değerlendirilmiş ve olası sitotoksik etki özüt içeriğindeki fenolik bileşiklerin miktarı, sayısı ve konsantrasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Özüt hazırlama sürecinde hücre canlılığı üzerinde ileri derecede toksik etkileri olduğu bilinen çözücülerin (kloroform, hekzan, diklorometan, aseton, butanol gibi) kullanıldığı çalışmalarda ise genellikle özütün direkt sitotoksik etkisi yerine fraksiyonlama sonucu özütten saf olarak elde edilen bileşiklerin ya da farklı fraksiyonlamaların kombinasyonu sonucu elde edildiği bildirilen yeni moleküllerin sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

Farklı *Juniperus* L. özütlerinin lösemi, meme kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri, servikal kanser, sarkoma, nöroblastoma, melanoma, over kanseri, karaciğer kanseri gibi kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmasına rağmen literatürde *Juniperus* L. türlerinden elde edilen özütlerin prostat kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendiren herhangi bir çalışma mevcut değildir. Kanser terapisindeki ana hedefin seçici olarak kanser hücrelerini hedefleyen ve normal hücrelere en az hasar veren yaklaşımları kapsamaması gerekirken yine mevcut çalışmaların pek çoğunda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenen *Juniperus* L. özüt konsantrasyonlarının normal hücreler üzerindeki olası etkileri değerlendirilmemiş ve hücre ölümü üzerindeki ileri analizleri yapılmamıştır. Ek olarak sitotoksik etkisi belirlenen *Juniperus* L. özütlerinin moleküler düzeyde antitümöral etkilerinin değerlendirildiği çalışma sayısı ise oldukça azdır. Tüm bilgiler ve veriler doğrultusunda mevcut tez çalışması kapsamında,

- Türkiye florasında doğal olarak yetişen iki farklı *Juniperus* L. (*Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa*) türünün yaprak ve meyvelerine ait sulu özütlerin hazırlanması ve endokrin terapi direnci yüksek iki farklı prostat kanseri hücre hattı (DU145 ve PC-3) ve bir normal hücre hattı (HUVEC, insan umbilikal ven endotel hücreleri) üzerinde doza ve zamana bağlı *in vitro* sitotoksik etkisinin belirlenmesi

- İlgili hücre hatlarında *in vitro* sitotoksik etkisi belirlenen özütlerin tetiklediği hücre ölüm tipinin saptanması
- Prostat kanseri hücre hatlarında *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin saptanması yolu ile özütlerin antitümöral etkilerinin değerlendirilmesi
- Hazırlanan dört farklı sulu özütün fenolik bileşikler yönünden analizi
- Saptanacak olası sitotoksik ve antitümöral etkinin özütlerde tayin edilecek fenolik bileşikler ile ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir.



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- -150°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -86°C derin dondurucu (Nüve DF 490, Türkiye)
- -20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- +4°C buzdolabı (Alaska, Türkiye)
- Laminer kabin
- Santrifüj (Nüve NF 800, Türkiye)
- CO<sub>2</sub> inkübatör (Panasonic, Japonya)
- Invert mikroskop (Labomed, ABD)
- UV-Vis Spektrofotometre/ Nano Drop (Beckman Coulter, ABD)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- StepOnePlus™ System Real Time- PCR (Applied Biosystems, ABD)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Thermal Cycler (Biorad, ABD)
- Yatay Jel Elektrofrezisi (Biorad, ABD)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- ELISA okuyucu (Tecan, İsviçre)
- Agilent 1200 HPLC (Agilent, ABD)
- Floresan Mikroskop (Eclipse i80, Nikon, ABD)

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 w/o L-Gln besiyeri, 500ml (LONZA)
- Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 4.5 g/L glucose, w L-Gln, w/o sodium pyruvate besiyeri, 500ml (Lonza)
- Fetal Bovine Serum, 500ml (Hyclone)
- Penisilin- Streptomisin, 10.000U/ml (Thermo Fisher)
- Sodyum pirüvat solüsyonu, 100mM (Lonza)
- Tripsin-EDTA (Lonza)
- Sodyum- fosfat tamponu (PBS) (Bioshop)
- WST-1 Cell Proliferation Reagent (Roche)
- Muse® Annexin V and Dead Cell Kit (Millipore)
- RNA izolasyon kiti (Omega Bio-Tek)
- cDNA sentez kiti (Applied Biosystems)
- Taqman Gene Expression Master Mix (Life Technologies)
- Taqman Gene Expression Assay (Life Technologies)
- Etanol %99.9 HPLC saflıkta (Merck)
- Asetik asit %99.9 HPLC saflıkta (Merck)
- Paraformaldehit (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- Tripan mavi (Biochrom)
- Hoechst 33258 (Sigma)
- Propidyum iyodid (PI) boyama solüsyonu (BD Biosciences)

### **3.1.3. Kullanılan Hücre Hatları**

#### **3.1.3.1. Prostat Kanseri Model Hücre Hatları**

Mevcut tez çalışmasında prostat kanserinin iki *in vitro* modeli olarak yaygın şekilde kullanılan DU145 ve PC-3 hücre hatları ile çalışılmıştır. İlgili hücre hatları endokrin terapiye dirençli (kastrasyon dirençli) özellikte olup, her ikisinde birden metastatik özellik bulunmaktadır. Ayrıca mevcut hücre hatlarında AR ve transkripsiyonu AR ile yönlendirilen gen ekspresyonunun negatif olduğu bilinmektedir.

##### **3.1.3.1.1. DU145 (ATTC ® HTB-81™) Prostat Kanseri Hücre Hattı**

Tez çalışması kapsamında kullanılan prostat kanseri hücre hatlarından ilki etnik kökeni beyaz ırk olan beyin metastazı pozitif 69 yaşında prostat kanserli bir hastadan elde edilmiş DU145 epiteliyal prostat adenokarsinom hücre hattıdır. İlgili hücre hattının metastatik potansiyeli orta düzeydedir.

##### **3.1.3.1.2. PC-3 (ATTC ® CRL-1435™) Prostat Kanseri Hücre Hattı**

Tez çalışması kapsamında kullanılan ikinci prostat kanseri hücre hattı ise PC-3'tür. Etnik kökeni beyaz ırk olan kemik metastazı pozitif 62 yaşında prostat kanserli bir hastadan elde edilmiş bu hücre hattı epiteliyal prostat adenokarsinom hücresidir. PC-3 prostat kanseri hücre hattı prostat kanseri hücre hatları içinde metastatik potansiyeli en yüksek hücre hattıdır.

##### **3.1.3.2. HUVEC (ATTC ® CRL-1730™) İnsan Normal Hücre Hattı**

HUVEC insan umbilikal ven endotel hücreleri, tümörojenik özellikte olmayan adherent normal hücre hattıdır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Bursa Uludağ'da Doğal Olarak Yetişen *Juniperus L.* Türlerinin Toplanması**

Mevcut tez çalışması kapsamında prostat kanseri hücre hatları üzerinde *in vitro* sitotoksik ve antitümöral etkileri değerlendirilmek üzere seçilen, Bursa Uludağ'da doğal olarak yetiştiği bilinen *Juniperus* cinsi bitki türlerine ait yaprak ve meyveler, Nisan 2014'te

Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik AD öğretim üyesi Prof. Dr. Hulusi Malyer ve Dr. Aycan Tosunoğlu önderliğinde Uludağ'ın kuzey yamacına gerçekleştirilen arazi çalışması sırasında toplandı. Uludağ Kirazlıyayla mevki 1522. metrede 40° 6'47.01"K, 29° 5'22.07"D koordinatlarında *Juniperus communis*'e ve Harmancık mevkiine 16 km kala Çeki-Sırlı yol ayrımında 44° 2'46.032"K, 35° 40'31.7352"D koordinatlarında ise *Juniperus excelsa*'ya rastlandı (Şekil-17). Prof. Dr. Hulusi Malyer tarafından gerçekleştirilen taksonomik tanımlama sonrasında toplanan türlerin *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* olduğu tespit edildi. İlgili *Juniperus* türlerine ait yaprak ve meyveler ayrı ayrı temizlendikten sonra etiketlenerek özüt hazırlanma aşamasına kadar -20°C'de saklandı.



Şekil-17 Nisan, 2014 Uludağ arazisinden *Juniperus* görüntüleri

### 3.2.2. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türlerine Ait Yaprak ve Meyvelerden Sulu Özüt Hazırlanması

*Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türlerine ait yaprak ve meyvelerin sulu özüt hazırlığı Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Saliha Şahin tarafından Analitik Kimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Kuru ağırlıkları 5 g olacak şekilde tartılan her iki



türe ait yaprak ve meyveler 50 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde karanlık ortamda 400 rpm hızda 5 saat sürekli çalkalama işlemine tabi tutuldu (Şekil-18). Stok konsantrasyonu 0,1 g/ml olacak şekilde elde edilen 4 farklı sulu özüt filtre kağıdı ile süzülerek 15 ml'lik temiz falkon tüplere alındı. Özütler sitotoksosite deneylerine kadar -80°C'de saklandı.



**Şekil-18** *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türlerine ait yaprak ve meyvelerin sulu özüt haline getirilmesi

### **3.2.3. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türlerinin Yaprak ve Meyvelerinden Hazırlanan Özütlerin Fenolik İçeriklerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Analizi**

*Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türlerine ait yaprak ve meyve özütlerinin fenolik bileşikler yönünden analizi ve tespit edilen fenolik bileşiklerin miktar tayini Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Saliha Şahin tarafından Analitik Kimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Özütlerin tümü, standartları Sigma'dan temin edilen 33 farklı fenolik bileşik için analiz edildi. Fenolik bileşiklerin ayrımı, XBridge C18 (4.6X250 MM, 3.5µm; Elstree, UK) kolon ile %1 H<sub>2</sub>O içerisinde çözünmüş formik asit (çözücü A) ve asetonitrilden (çözücü B) oluşan hareketli faz kullanılarak 0-10 dakika %13 B, 10-20 dakika %41.5 B, 20-25 dakika %70 B ve 25-35 dakika %10 B olmak üzere toplam 35

dakikalık sürede 0.5 ml/dakika kolon akış hızında ve 10 µl'lik enjeksiyon hacminde gerçekleştirildi. Verilerin toplanması için Chemstation for LC (Agilent) kullanıldı. Elde edilen piklerin hangi fenolik bileşiklere ait olduğu fenolik standartların alıkonma süreleri ve UV spektralleri ile karşılaştırılarak, miktarları ise kromatogram alanlarının hesaplanması ile belirlendi.

### **3.2.4. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türlerinin Yaprak ve Meyvelerine Ait Özütlere İle Prostat Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Gerçekleştirilen *in vitro* Deneyler**

#### **3.2.4.1. Hücre Kültürü**

Mevcut tez çalışması kapsamında kullanılan DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi ve danışman hocam Prof. Dr. Ünal Egeli tarafından Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'dan temin edildi. DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücreleri %10 oranında FBS, %1 oranında Penisilin- Streptomisin (10.000U/ml) ve %1 oranında sodyum pirüvat (100mM) içeren RPMI medyum içerisinde, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklık sağlayan inkübatörde kültüre edildi. Tez çalışması kapsamında kanser hücre hatlarının dışında *Juniperus* türlerine ait yaprak ve meyvelerden hazırlanan özütlerin *in vitro* sitotoksik ve antitümöral etkilerinin değerlendirileceği normal hücre hattı olarak ise ATTC'den sağlanan insan umbilikal ven endotelial hücreleri (HUVEC) kullanıldı. HUVEC hücreleri aynı kültür koşullarında DMEM besiyerinde kültüre edildi.

#### **3.2.4.1.1. Hücre Hatlarının Dondurulması**

Flasklarda kültüre edilen ve stok yapılacak yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemi ile flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra tripsin ile eşit hacimde besiyeri içeren 15 ml'lik falkon tüpe alındı. 1200 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Hücreler %10 oranında DMSO içeren besiyeri karışımı (200µl DMSO:1800µl besiyeri) ile resüspanse edilip kriyotüp içerisine alındıktan sonra -20°C'de 30 dakika bekletilip -150°C'ye kaldırıldı.

#### **3.2.4.1.2. Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi**

Kriyotüpler içerisinde  $-150^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen hücre hatları  $37^{\circ}\text{C}$ 'de çözünmeye bırakıldı. Çözünme tamamlanınca hücrelerin DMSO'dan zarar görme ihtimalini azaltmak amacıyla kriyotüp içerisindeki hücreler hızlıca 5 ml besiyeri içeren 15 ml'lik falkon tüpe alınarak 1200 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında kalan hücre pelleti üzerine besiyeri eklenerek  $25\text{ cm}^2$  flask içine ekim gerçekleştirildi. Hücreler %5  $\text{CO}_2$  ve  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklık sağlayan inkübatörde kültüre edildi. Üremeye başlayan hücrelerin 48 saat arayla besiyeri kontrolleri gerçekleştirildi.

#### **3.2.4.1.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması**

Flask yüzeyinin yaklaşık %80-90'nını kaplayan yoğunluğa ulaşan hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasajlama işlemi yapıldı. Bu işlem için öncelikle flaskta bulunan besiyeri dökülerek hücreler PBS ile yıkandı ve ardından tripsinizasyon uygulandı. Uygun sürede  $37^{\circ}\text{C}$ 'de tripsin muamelesi ile flask yüzeyinden ayrılan hücreler invert mikroskop altında kontrol edildi. Hücrelerin tümünün flask yüzeyinden ayrıldığından emin olunduktan sonra hücreler tripsin hacmi kadar besiyeri içeren 15 ml falkon tüp içerisine alındı ve 1200 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Hücre pelleti hücre yoğunluğuna göre yeni besiyeri karışımı ile uygun flasklara alınarak üremenin devam etmesi sağlandı.

#### **3.2.4.1.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

Kültüre edilen hücrelerin canlılığını ve ilgili deneyler için sayısını tespit etmek amacıyla Tripan mavi ile boyama yapıldı. Tripsinizasyon sonrasında 15 ml'lik falkona alınan hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra falkon tüpte kalan hücre pelleti 1 ml besiyeri ile resüspanse edildi. Hücre süspansiyonu 1:1 oranında (50  $\mu\text{l}$ : 50  $\mu\text{l}$ ) Tripan mavi boyası ile karıştırılıp Thoma lamında 40X büyütme altında sayıldı.

### 3.2.4.2. Sitoksisite Deneyleri

#### 3.2.4.2.1. WST-1 Analizi

İki farklı *Juniperus L.* türüne ait yaprak ve meyvelerden elde edilen özütlerin DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatları ile HUVEC normal hücre hattındaki sitotoksik etkisini ve etken dozlarını belirlemek için WST-1 Proliferasyon Assay kullanıldı. Kolorimetrik bir canlılık testi olan WST-1 yönteminin prensibi tetrazolium tuzunun (WST) canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz (mitokondriyal süksinat tetrazolium redüktaz) enzimi ile renkli formazan bileşiğine dönüşümüne dayanır (172). Hücrelerin ekili olduğu medyum içinde çözünebilen tetrazolium tuzu, kısa bir inkübasyon süresinin ardından canlı hücrelerdeki enzim aktivitesine bağlı olarak koyuluğu artan veya azalan bir renk değişimi oluşturur. Oluşan renkli bileşiğin 450 ve 620 nm dalga boylarında absorbans değeri ölçülür. Hücrelerin net metabolik aktivitesi (canlılığı) oransal olarak oluşan renkli formazan bileşiğinin miktarına bağlıdır. Böylelikle alınan absorbans değerleri ile hücresel canlılık kantitatif bir değere dönüştürülür. Hücre canlılığında inhibisyona neden olması beklenen muamele sonrasında hücrelerdeki % canlılık oranı, muamelesiz hücre absorbansına karşılık gelen hücre canlılığının %100 olarak normalize edildiği formülden yararlanılarak hesaplanır;

$$\text{Canlılık (\%)} = (\text{muameleli hücre absorbansı} / \text{muamelesiz hücre absorbansı}) \times 100$$

Mevcut tez çalışmasında WST-1 analizinin gerçekleştirilebilmesi için 96- kuyulu kültür kaplarına her bir kuyuda  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimi takiben 24 saat sonra, *Juniperus communis L. var. saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa M. Bieb. subsp. excelsa*'ya ait yaprak ve meyvelerden elde edilen özütlerin literatür araştırması yapılarak seçilen doz uygulama spektrumu ve 96- kuyulu kültür kabı düzeneği Şekil-19'da gösterildiği şekilde planlandı. Her iki türden de stok 0,1 g/ml konsantrasyonda hazırlanan yaprak özütlerinden ilk 48 kuyuda (A-D) 1,25- 200 µg/ml aralığında; meyve özütlerinden son 48 kuyuda (E-H) 2,5- 250 µg/ml aralığında 3 tekrarlı olmak üzere 15 farklı doz uygulandı (Şekil-19). Doz seyreltmelerinin tümü besiyeri kullanılarak yapıldı. 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları takiben kuyu başına 10µl Cell Proliferation Reagent (WST-1) eklendi. %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sıcaklık sağlayan inkübatörde 45 dakika inkübasyonun ardından ELISA okuyucu kullanılarak 450-620 nm dalga boylarında ölçüm gerçekleştirildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Yaprak özütleri	A	1,25 µg/ml	1,25 µg/ml	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	7,5 µg/ml	7,5 µg/ml
	B	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	15 µg/ml	15 µg/ml	15 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
	C	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	75 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	125 µg/ml	125 µg/ml	125 µg/ml
	D	150 µg/ml	150 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	175 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	Doz yok	Doz yok	Doz yok
Meyve özütleri	E	Doz yok	Doz yok	Doz yok	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	7,5 µg/ml	7,5 µg/ml
	F	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	15 µg/ml	15 µg/ml	15 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml
	G	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	75 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	125 µg/ml	125 µg/ml	125 µg/ml
	H	150 µg/ml	150 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	175 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml

Şekil-19 *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa*'ya ait yaprak ve meyve özütlerinin 96- kuyulu kültür kabındaki doz uygulama spektrumu

### 3.2.4.3. Hücre Ölümü Analizine Yönelik Deneyler

Canlı ve ölü hücrelerin birbirinden ayırt edilmesi ve ölü hücrelerde apoptoz ve/veya nekroz varlığının belirlenmesi için kullanılan morfoloji bazlı, immünohistokimya bazlı, immünoloji bazlı (ELISA) ve çip bazlı moleküler biyolojik yöntemler gibi farklı yöntemler mevcuttur (173). Morfoloji bazlı yöntemlerde farklı özellikteki mikroskoplar ve mikroskobiye uygun farklı boyama teknikleri kullanılarak canlı, apoptotik ve nekrotik morfolojideki hücreler birbirinden ayırt edilmektedir. İmmünohistokimya bazlı yöntemlerin temeli ise canlı, apoptotik ve nekrotik ayrımı sağlayacak özellikteki hücre içi bir molekülün, bir enzim veya bir floresan boya kullanılarak tespitine ya da radyoaktif olarak işaretlenmesine dayanmaktadır (174). Mevcut tez çalışması kapsamında hücre ölümünün analizine yönelik morfolojik bazlı yöntemlerden floresan mikroskopi ve immünohistokimyasal bazlı yöntemlerden Annexin V analizi kullanılmıştır.

#### 3.2.4.3.1. Hücre Ölümünün Morfolojik Değerlendirilmesi

Hücre ölümünün morfolojik analizi Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda bulunan floresan mikroskop kullanılarak gerçekleştirildi. Analizde W eksitasyon filtre altında mavi renk görünen Hoechst 33258 (eksitasyon 350nm; emisyon 461nm) ve G eksitasyon filtre altında kırmızı renk görünen Propidyum İyodid (eksitasyon 530nm, emisyon 620nm) boya ile gerçekleştirilen ikili

boyama tekniği kullanıldı. Mikroskobi analizleri her iki boyadan alınan sinyali görünür hale getiren G ve W birleşik (merge) filtre sistemi altında gerçekleştirildi ve mikroskoba ataşmanlı kamera (Kameram21, Argenit) ile görüntüler elde edildi.

#### 3.2.4.3.1.1. Hoechst - Propidyum İyodid (PI) Boyama Yöntemi

Hoechst-PI ikili boyama yöntemi canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin eş zamanlı morfolojik ayrımını sağlayan bir floresan boyama yöntemidir. Yöntemin prensibi plazma membranının sağlam ya da bozulmuş olmasına bağlı olarak hücre içerisine farklı boyanın girmesi ve ayırt edici şekilde boyanmasına dayanmaktadır. Plazma membran yapısı bozulmamış canlı ve erken apoptotik hücreler yalnızca membranı geçerek nükleusa bağlanabilen Hoechst boyası ile boyanırken, hücre içerisine membran yapısı bozulduğunda girebilen ve seçici olarak DNA'ya bağlanan PI ile boyanmamaktadır. Membran bütünlüğü bozulmuş geç apoptotik ve nekrotik hücreler ise hem Hoechst hem de PI ile boyanmaktadır (Tablo-5). Boyanan hücrelerde apoptotik morfolojinin belirlenmesindeki en temel süreç apoptoza özgü gerçekleşen kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonudur (175).

**Tablo-5** Hoechst-PI boyamaya tekniğine dayalı apoptotik ve nekrotik ayırım

	Hoechst	PI	Apoptotik morfoloji
Normal (canlı) hücre	+	-	-
Erken apoptotik hücre	+	-	+
Geç apoptotik hücre	+	+	+
Nekrotik hücre	+	+	-

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen Hoechst-PI boyama için 4- kuyulu slide üzerine her kuyuda  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekimi gerçekleştirilen DU145 prostat kanseri hücre hattına 4 farklı özütün WST-1 analizinde belirlenen en etkin dozlarında 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları yapıldı. Uygun inkübasyon süresinin ardından her bir deney setinde slide üzerindeki canlı ve ölü hücreler birlikte fiksasyon işlemine tabi tutuldu. İlk fiksasyonda %1 paraformaldehit içeren PBS solüsyonu ile hücreler 10 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika PBS ile yıkama gerçekleştirildi. İkinci fiksasyonda ise hücreler -20°C'de soğutulmuş 2:1 etanol: asetik asit solüsyonunda 5 dakika bekletildi ve sonrasında

tekrar 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı. Fiksasyonun ardından konsantrasyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde 3 ml PBS içerisinde hazırlanan Hoechst boyası her bir kuyuya 500µl dağıtılarak 37°C'de karanlık ortamda 15 dakika boyama işlemi gerçekleştirildi. Hoechst boyamanın ardından hücreler 2 kez 2'şer dakika PBS ile yıkandıktan sonra konsantrasyonu 0.25 mg/ml olacak şekilde hazırlanan PI boyama solüsyonundan her bir kuyuya 500µl dağıtıldı ve 37°C'de karanlık ortamda 15 dakika boyunca ikinci boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyamayı takiben son olarak 2 kez 2'şer dakika PBS ile yıkandıktan sonra hazır hale gelen preparatlar floresan mikroskop altında incelendi.

### 3.2.4.3.2. Hücre Ölümünün İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi

#### 3.2.4.3.2.1. Annexin V Analizi

Hücre ölümünün immünohistokimyasal analizi, Gen Tedavi Laboratuvarı'mızda bulunan akım sitometre cihazı Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) ile Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Annexin V analizi ile *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türlerine ait yaprak ve meyve özütleri için sitotoksikite deneyleri sonucunda tespit edilen etken dozların belirlenen uygun sürelerde uygulanması sonrasında hücrelerde canlılık, nekrotik ölüm ve erken- geç apoptotik ölüm oranları tespit edildi. Bu analizin temeli, sağlıklı hücrelerde hücre membranının iç yüzünde konumlanan fosfatidilserin (PS) moleküllerinin apoptotik hücrelerde membran sağlığının bozulmasının bir sonucu olarak membranın dış yüzüne translokasyonu sonrasında kalsiyum- bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı protein olan Annexin V'in PS fosfolipidlerine seçici olarak bağlanabilmesi prensibine dayanmaktadır (174). Hücre membranının yapısal bütünlüğünün bozulması hücre ölümünün en iyi belirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Kullanılan kitin içeriğinde Annexin V boyasına ek olarak membran bütünlüğü tamamı ile bozulmuş geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde DNA'nın serbest kalması sonrasında interkalasyon ajanı olarak GC-dinükleotidlerce zengin bölgelere bağlanabilen, floresan özellikte ikici bir boya olarak 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) boyası bulunmaktadır. Böylelikle iki farklı boyama yapılması sonrasında hücreler 4 farklı popülasyona ayrılmaktadır;

- Canlı hücre popülasyonu; Annexin V (-) ve 7-ADD (-)
- Erken apoptotik hücre popülasyonu; Annexin V (+) ve 7-ADD (-)
- Geç apoptotik ve ölü hücre popülasyonu; Annexin V (+) ve 7-ADD (+)
- Nüklear debris (ölü hücre kalıntıları); Annexin V (-) ve 7-ADD (+)

Bu amaçla 6- kuyulu kültür kaplarına her bir kuyuda  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekimi gerçekleştirilen DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatları ve HUVEC normal hücre hattına 4 farklı özüte ait 72 saatlik en etkin uygulama süresi içerisinde WST-1 analizinde belirlenen en etkin dozlarda uygulamalar yapıldı. İnkübasyon süresinin ardından tripsinizasyon ile toplanan hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra %10 FBS içeren PSB ortamında hücre süspansiyonu ile 1:1 oranında Annexin V & Dead Cell Reagent eklendi. Hücreler 45 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildikten sonra Muse<sup>TM</sup> Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edildi.

#### **3.2.4.4. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türlerinin Yaprak ve Meyvelerine Ait Özütlerinin Prostat Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Antitümöral Etkilerinin Değerlendirilmesi**

##### **3.2.4.4.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu**

25cm<sup>2</sup> flaklara her bir flaskta  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekimi gerçekleştirilen DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarına 4 farklı özüte ait 72 saatlik en etkin uygulama süresi içerisinde WST-1 analizinde belirlenen en etkin dozlarda uygulamalar yapıldıktan sonra inkübasyon süresinin ardından tripsinizasyon ile toplanan hücreler PBS ile yıkandı. EZNA Total RNA kit (Omega Bio-Tek) prosedürüne uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA'ların kalite kontrolleri ve konsantrasyon ölçümleri UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında  $A_{260}/A_{280}$  optik dansite oranı kullanılarak belirlendi. Her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 10µl H<sub>2</sub>O içerisinde 0.75µg olacak şekilde ayarlanan RNA örnekleri cDNA sentezi için hazır hale getirildi.

##### **3.2.4.4.2. RNA'dan cDNA Sentezi**

Total RNA'dan cDNA sentezi için High- Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) kiti kullanıldı. İlgili kit prosedürüne göre her bir RNA örneği ile gerçekleştirilecek 20 µl reaksiyon hacmi için soğuk blok üzerinde 10 µl 2X RT master mix hazırlandı (Tablo-6). Oluşan karışım içine her biri 0.75µg RNA içeren örneklerden 10µl eklendikten sonra pipetaj yapılarak tüp içeriğinin homojen karışımı sağlandı ve örnekler cDNA sentezi için Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazına yüklendi. Kite belirtilen reaksiyon koşulları uygulanarak (Tablo-7) cDNA örnekleri elde edildi.



**Tablo-6** cDNA sentezi için oluşturulan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşeni	
10X RT Buffer	2.0 µl
25X dNTP karışımı (100 mM)	0.8 µl
10X RT random primer	2.0 µl
MultiScribe™ Revers Transkriptaz enzimi	1.0 µl
Nükleaz içermeyen dH <sub>2</sub> O	4.2 µl
0.75µg RNA örneği	10 µl
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo-7** cDNA sentezi için kullanılan thermal cycler reaksiyon koşulları

	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
<b>Sıcaklık</b>	25	37	85	4
<b>Süre</b>	10 dk	120 dk	5 dk	∞

### 3.2.4.4.3. *MMP-2* ve *MMP-9* Gen Ekspresyon Düzeylerinin Real Time Kantitatif PCR (RT-qPCR) Yöntemi ile Belirlenmesi

Real Time kantitatif PCR yöntemi nükleik asit miktarlarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan, klasik PCR sisteminin floresan okuma sistemi ile birleştirildiği duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir (176). En sık kullanıldığı alanlardan biri gen ekspresyon çalışmalarında mRNA düzeyinin sayısal olarak belirlenmesidir. RT-qPCR'da amplifikasyon döngülerini görünür hale getiren gene özgü floresan işaretli kısa ve tek zincirli oligonükleotidler (Taqman problar) ya da DNA'ya rastgele bağlanma özelliğindeki floresan boyalar (SYBR Green) kullanılmaktadır. Mevcut tez çalışmasında da kullandığımız Taqman prob yönteminde çoğaltılmak istenen DNA bölgesine tamamlayıcı özellikte 5' uçta FAM (florofor) ve 3' uçta TAMRA (quencher) ile floresan işaretlenmiş bir prob mevcuttur. Amplifikasyon başlamadan önce TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Böylece yanlış pozitif sinyal alınması engellenmekte ve yüksek özgüllük sağlanmaktadır. Amplifikasyon sırasında gene özgü primerler probun bağlandığı bölgeye geldiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz

aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır ve floresan sinyal oluşturur. Her bir döngüde oluşan floresan sinyal, ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artar (177). Bu yöntemde amplifikasyonun ilk anlamlı arttığı nokta eşik değeri, floresan sinyalin eşik değeri geçtiği döngü sayısı ise eşik döngü ( $C_T$ ) olarak isimlendirilmektedir. Bu değer başlangıçtaki kalıp miktarı ile ters orantılıdır. Kontrol grubu ve deney grubunda gen ekspresyonunun veri analizi yapılırken sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri karşılaştırmalı  $C_T$  metodu (göreceli kantifikasyon)'dur. Bu yöntemde kontrol grubunun  $C_T$  değeri, deney grubunun  $C_t$  değeri ile karşılaştırılarak bir genin ekspresyonundaki göreceli kat değişimi aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$\text{Gen ekspresyonu kat değişimi} = 2^{\Delta(C_t \text{ deney} - C_t \text{ kontrol})} = 2^{\Delta C_t}$$

Formüldeki  $\Delta C_T$ , kontrol ve deney grubunun eşik döngüleri arasındaki farktır. Deney koşullarında bir farklılık olmadığının gösterilmesi için ekspresyon düzeyi değişmeyen referans bir gen seçilmeli ve hesaplanan gen ekspresyonu kat değişimi normalize edilmelidir. Bu durumda;

$$\Delta C_{t1} = C_t (\text{deney hedef gen}) - C_t (\text{deney referans gen})$$

$$\Delta C_{t2} = C_t (\text{kontrol hedef gen}) - C_t (\text{kontrol referans gen})$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t1} (\text{deney}) - \Delta C_{t2} (\text{kontrol})$$

Normalize edilmiş gen ekspresyonu kat değişimi =  $2^{\Delta \Delta C_t}$  olarak hesaplanır (178).

Mevcut tez çalışmasında ekspresyon analizleri için ilgili mRNA'lara özgü (MMP-2 için Hs01548727\_m1 kodlu; MMP-9 için Hs00234579\_m1 kodlu ve Aktin- $\beta$  için Hs01060665\_g1 kodlu Taqman Gene Expression Assay) Taqman problemler kullanıldı. Her bir RT-PCR reaksiyonu için oluşturulan 30 $\mu$ l karışım (Tablo-8), kuyu başına 10 $\mu$ l olacak şekilde plate içine alınarak StepOnePlus™ System Real Time- PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazına yüklendi. Böylelikle her bir deney grubunun ekspresyon analizi 3 tekrarlı gerçekleştirildi. Uygun reaksiyon koşulları altında standart hızda çalışan program kullanılarak amplifikasyon sağlandı (Tablo-9).

**Tablo-8** RT-PCR için oluşturulan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşeni	
Gene Expression Master Mix	15 µl
dH <sub>2</sub> O	7.5 µl
Taqman prob	1.5 µl
cDNA	6 µl
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>	30 µl
<b>Kuyu başına reaksiyon hacmi</b>	10 µl

**Tablo-9** mRNA ekspresyon analizi için kullanılan RT-qPCR programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
Başlangıç basamağı	50	2 dk
	95	10 dk
Amplifikasyon basamağı (40 döngü)	95	15 sn
	60	1 dk

### 3.3. İstatistiksel Analizler

WST-1 analizi sonucunda kontrol ve deney gruplarından elde edilen hücre canlılığındaki inhibisyon verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı GraphPad Prism 6.01 (ABD) programı kullanılarak analiz edildi. Bu programda iki bağımsız değişken olarak doza ve zamana bağlı hücre canlılığındaki inhibisyon oranları arasındaki farklılık iki yönlü varyans (two-way ANOVA) analizi ile karşılaştırıldı. Her bir zaman diliminde deney gruplarının kontrol grubuna göre inhibisyon oranlarındaki farklılık iki yönlü varyans analizinde Dunnett çoklu karşılaştırma (post-hoc) testinden elde edilen *p* değerlerine göre belirlendi. *MMP-2*, *MMP-9* ve referans gen olarak analiz edilen *Aktin-β* için elde edilen veriler ise "RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis" web tabanlı programı kullanılarak (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) 2<sup>ΔΔCt</sup> metodu ile değerlendirildi. Karşılaştırmalı gen ekspresyonundaki farklılıkların istatistiksel anlamı RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analizi'nde bağımsız örneklem *t*- testi ile araştırıldı. Yapılan tüm istatistiksel testlerde *p*<0.05 anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### 4.1. *Juniperus L.* Türlerine Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin DU145 ve PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hatları ile HUVEC Normal Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

#### 4.1.1. *Juniperus communis L. var. saxatilis Pall.* Türüne Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin Sitotoksik Etkisi

WST-1 analizi sonuçlarına göre DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde uygulanan *J. communis L. var. saxatilis Pall.* türüne ait 15 farklı yaprak ve meyve özütü dozundan, hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azaltan 5 farklı doz aralığı tespit edilmiştir. DU145 hücre hattında ilgili doz aralıklarında hücre canlılığına bağlı olarak WST-1 analizinden elde edilen absorbans değerleri (OD) ve absorbans değerlerine karşılık gelen hücre canlılığı yüzdesi yaprak özütü için Tablo-10'da; meyve özütü için Tablo-11'de gösterilmiştir. PC-3 hücre hattında ilgili doz aralıklarında hücre canlılığına bağlı olarak WST-1 analizinden elde edilen absorbans değerleri (OD) ve absorbans değerlerine karşılık gelen hücre canlılığı yüzdesi ise yaprak özütü için Tablo-12'de; meyve özütü için Tablo-13'de gösterilmiştir.

**Tablo-10** *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait yaprak özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde DU145 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	0,576	0,465	0,478	0,44	0,416	0,396
OD 2	0,485	0,414	0,417	0,469	0,384	0,419
OD 3	0,475	0,516	0,449	0,422	0,448	0,407
OD ortalama	0,512	0,465	0,448	0,443	0,416	0,407
Canlılık oranı 1	-	90,8203125	93,359375	85,9375	81,25	77,34375
Canlılık oranı 2	-	80,859375	81,4453125	91,6016	75	81,8359375
Canlılık oranı 3	-	100,78125	87,6953125	82,4219	87,5	79,4921875
Canlılık oranı ortalama	100,00	90,8203125	87,5	86,5234	81,25	79,4921875
48 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	0,511	0,58	0,5	0,491	0,493	0,338
OD 2	0,705	0,564	0,523	0,55	0,457	0,427
OD 3	0,742	0,536	0,547	0,465	0,449	0,382
OD ortalama	0,652	0,56	0,52333333	0,502	0,466333	0,38233333
Canlılık oranı 1	-	88,95705521	76,6871166	75,3067	75,6135	51,8404908
Canlılık oranı 2	-	86,50306748	80,2147239	84,3558	70,09202	65,4907975
Canlılık oranı 3	-	82,20858896	83,8957055	71,319	68,86503	58,5889571
Canlılık oranı ortalama	100,00	85,88957055	80,2658487	76,9939	71,52352	58,6400818
72 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	0,409	0,321	0,299	0,244	0,215	0,191
OD 2	0,45	0,314	0,281	0,228	0,221	0,2
OD 3	0,368	0,308	0,327	0,24	0,21	0,195
OD ortalama	0,409	0,31433333	0,30233333	0,23733	0,215333	0,19533333
Canlılık oranı 1	-	78,48410758	73,1051345	59,6577	52,56724	46,6992665
Canlılık oranı 2	-	76,77261614	68,7041565	55,7457	54,03423	48,8997555
Canlılık oranı 3	-	75,30562347	79,9511002	58,6797	51,34474	47,6772616
Canlılık oranı ortalama	100,00	76,85411573	73,9201304	58,0277	52,64874	47,7587612

**Tablo-11** *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait meyve özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde DU145 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,749	0,778	0,777	0,735	0,711	0,615
OD 2	0,846	0,791	0,82	0,69	0,642	0,59
OD 3	0,921	0,814	0,734	0,75	0,64	0,743
OD ortalama	0,838667	0,794333	0,777	0,725	0,664333	0,649333
Canlılık oranı 1	-	92,7663	92,64706	87,63911	84,77742	73,33068
Canlılık oranı 2	-	94,31638	97,77424	82,27345	76,55008	70,34976
Canlılık oranı 3	-	97,05882	87,51987	89,42766	76,31161	88,593
Canlılık oranı ortalama	100,00	94,71383	92,64706	86,44674	79,21304	77,42448
48 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,587	0,593	0,549	0,528	0,462	0,418
OD 2	0,651	0,541	0,527	0,498	0,48	0,462
OD 3	0,659	0,52	0,54	0,568	0,488	0,375
OD ortalama	0,632	0,551333	0,538667	0,531333	0,476667	0,418333
Canlılık oranı 1	-	93,82911	86,86709	83,5443	73,10127	66,13924
Canlılık oranı 2	-	85,60127	83,38608	78,79747	75,94937	73,10127
Canlılık oranı 3	-	82,27848	85,44304	89,87342	77,21519	59,33544
Canlılık oranı ortalama	100,00	87,23629	85,23207	84,07173	75,42194	66,19198
72 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,409	0,471	0,432	0,41	0,363	0,313
OD 2	0,45	0,487	0,45	0,38	0,328	0,339
OD 3	0,368	0,411	0,409	0,44	0,34	0,287
OD ortalama	0,409	0,456333	0,430333	0,41	0,343667	0,313
Canlılık oranı 1	-	87,65509	80,39702	76,30273	67,55583	58,25062
Canlılık oranı 2	-	90,63275	83,7469	70,7196	61,04218	63,08933
Canlılık oranı 3	-	76,48883	76,11663	81,88586	63,27543	53,41191
Canlılık oranı ortalama	100,00	84,92556	80,08685	76,30273	63,95782	58,25062

**Tablo-12** *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait yaprak özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde PC-3 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	1,342	1,447	1,298	1,239	1,16	1,08
OD 2	1,65	1,46	1,324	1,227	1,38	1,1
OD 3	1,679	1,474	1,34	1,231	0,943	1,06
OD ortalama	1,557	1,460333	1,320667	1,232333	1,161	1,08
Canlılık oranı 1	-	92,93513	83,36545	79,57611	74,50225	69,36416
Canlılık oranı 2	-	93,77007	85,03532	78,80539	88,63198	70,64868
Canlılık oranı 3	-	94,66924	86,06294	79,0623	60,56519	68,07964
Canlılık oranı ortalama	100,00	93,79148	84,82124	79,14793	74,56647	69,36416
48 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	0,916	0,648	0,66	0,588	0,53	0,447
OD 2	0,825	0,764	0,662	0,613	0,434	0,587
OD 3	0,552	0,61	0,52	0,563	0,67	0,519
OD ortalama	0,764333	0,674	0,614	0,588	0,544667	0,517667
Canlılık oranı 1	-	84,77976	86,34976	76,92979	69,34147	58,48234
Canlılık oranı 2	-	99,95639	86,61143	80,20061	56,78151	76,79895
Canlılık oranı 3	-	79,80811	68,03314	73,65896	87,65809	67,90231
Canlılık oranı ortalama	100,00	88,18142	80,33144	76,92979	71,26036	67,72787
72 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	0,377	0,319	0,28	0,317	0,22	0,144
OD 2	0,47	0,336	0,201	0,249	0,255	0,192
OD 3	0,389	0,276	0,4	0,24	0,251	0,16
OD ortalama	0,412	0,310333	0,293667	0,268667	0,242	0,165333
Canlılık oranı 1	-	77,42718	67,96117	76,94175	53,54369	35,18447
Canlılık oranı 2	-	81,5534	48,78641	60,43689	61,93204	45,74757
Canlılık oranı 3	-	66,99029	97,08738	58,25243	60,92233	38,97087
Canlılık oranı ortalama	100,00	75,32362	71,27832	65,21036	58,73786	40,12945

**Tablo-13** *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait meyve özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde PC-3 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,342	1,527	1,467	1,379	1,262	1,147
OD 2	1,65	1,536	1,425	1,4	1,272	1,175
OD 3	1,679	1,545	1,512	1,396	1,249	1,181
OD ortalama	1,557	1,536	1,468	1,391667	1,261	1,167667
Canlılık oranı 1	-	98,07322	94,21965	88,56776	81,05331	73,66731
Canlılık oranı 2	-	98,65125	91,52216	89,91651	81,69557	75,46564
Canlılık oranı 3	-	99,22929	97,10983	89,6596	80,21837	75,851
Canlılık oranı ortalama	100,00	98,65125	94,28388	89,38129	80,98908	74,99465
48 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,916	0,691	0,632	0,611	0,5	0,517
OD 2	0,825	0,708	0,625	0,637	0,642	0,541
OD 3	0,552	0,695	0,744	0,62	0,602	0,56
OD ortalama	0,764333	0,698	0,667	0,622667	0,581333	0,539333
Canlılık oranı 1	-	90,40558	82,68644	79,93894	65,41648	67,64065
Canlılık oranı 2	-	92,62974	81,77061	83,3406	83,99477	70,78064
Canlılık oranı 3	-	90,92891	97,33973	81,11644	78,76145	73,26646
Canlılık oranı ortalama	100,00	91,32141	87,26559	81,46533	76,05757	70,56258
72 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,377	0,329	0,314	0,271	0,25	0,212
OD 2	0,47	0,318	0,291	0,256	0,223	0,226
OD 3	0,389	0,346	0,339	0,282	0,223	0,225
OD ortalama	0,412	0,331	0,314667	0,269667	0,232	0,221
Canlılık oranı 1	-	79,85437	76,21359	65,7767	60,67961	51,45631
Canlılık oranı 2	-	77,18447	70,63107	62,13592	54,12621	54,85437
Canlılık oranı 3	-	83,98058	82,28155	68,4466	54,12621	54,61165
Canlılık oranı ortalama	100,00	80,33981	76,3754	65,45307	56,31068	53,64078

WST-1 analizinde *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında maksimum sitotoksik etkisini gösterdiği zaman dilimi 72 saat olarak tespit edilmiştir. 72 saatlik süre sonunda yaprak özütü için 10 µg/ml olarak belirlenen en etkin dozun DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla %52,25 ( $p<0.001$ ) ve %59,8 ( $p<0.0001$ ) oranlarında hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır. Meyve özütü için 250 µg/ml olarak belirlenen en etkin dozun ise DU145 hücre hattında %41,75 ( $p<0.001$ ); PC-3 hücre hattında %46,36 ( $p<0.001$ ) oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Aynı dozlarda ve aynı zaman diliminde HUVEC normal hücre hattında yapılan uygulama sonucunda hücre canlılığında saptanan inhibisyon oranları ise yaprak özütü için %18,52; meyve özütü için %21,25 ( $p<0.05$ )'tir (Tablo-14 ve Tablo-15).



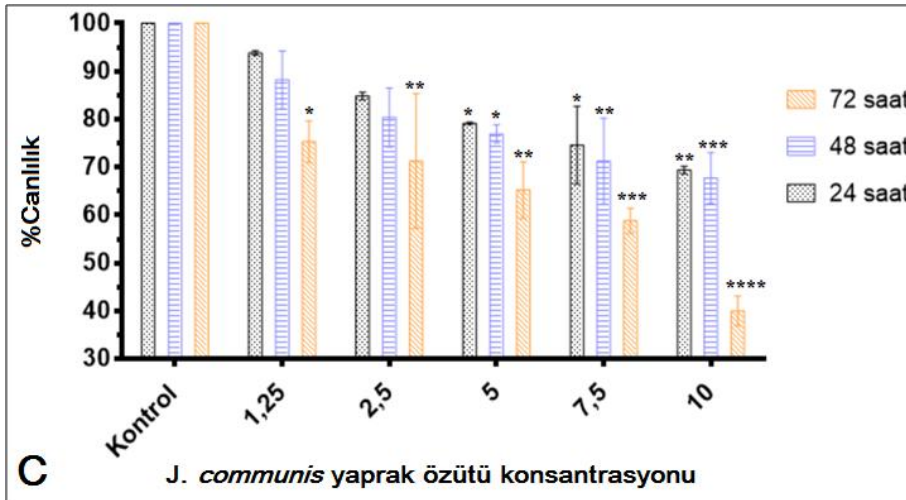
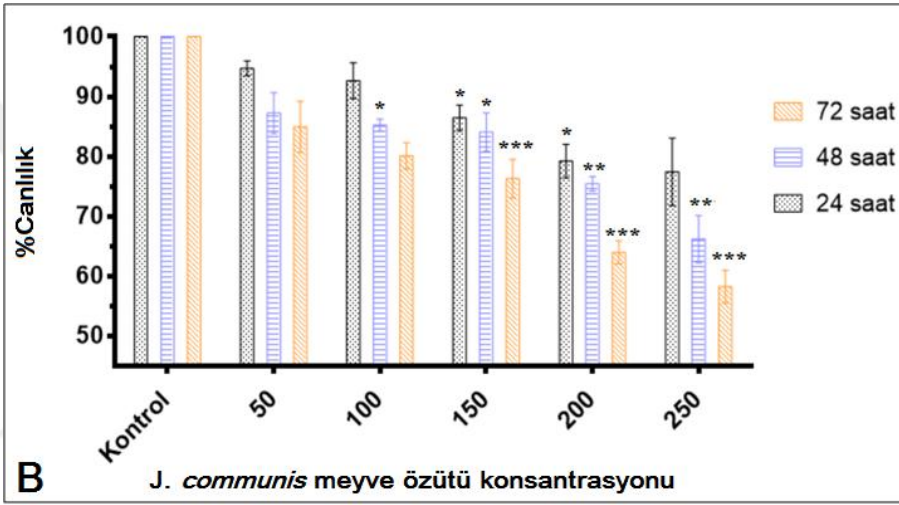
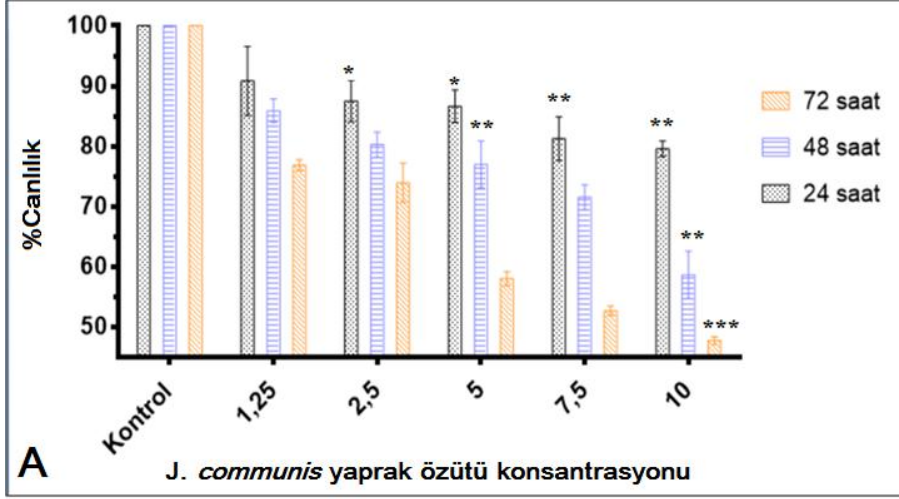
**Tablo-14** *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait yaprak özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde HUVEC hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

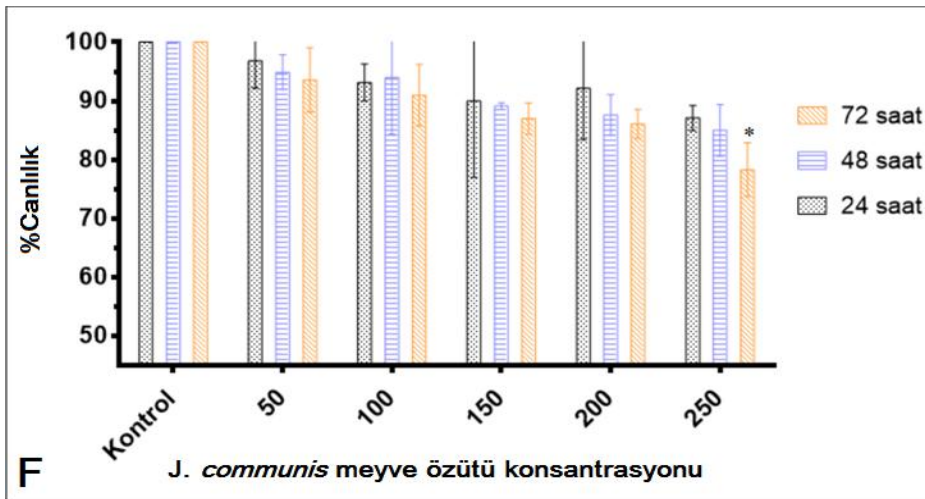
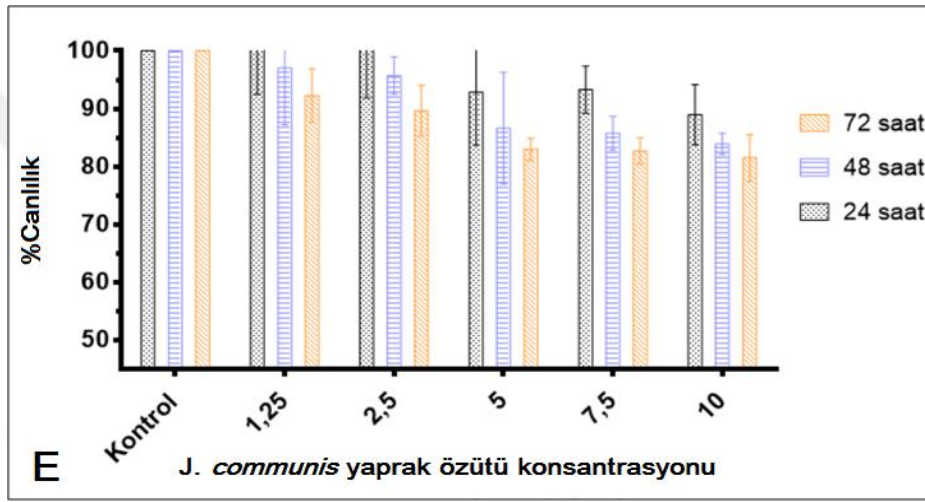
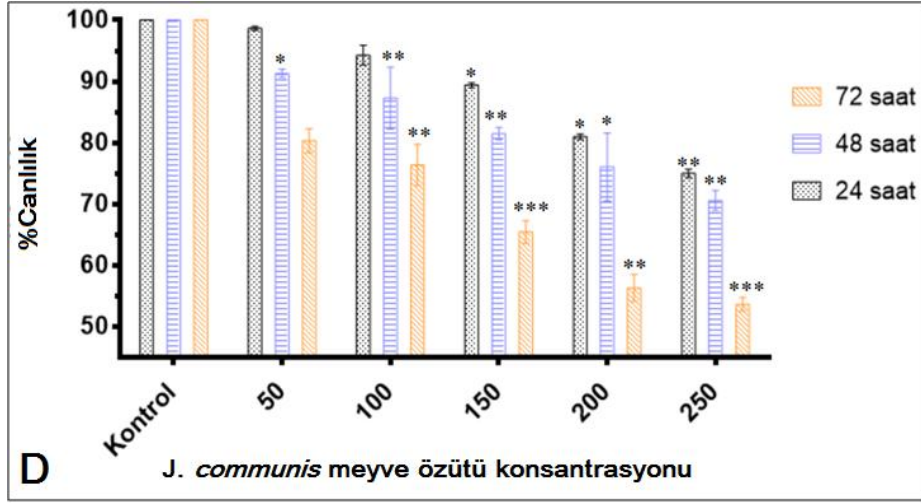
24 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	1,2	1,131	1,17	1,34	1,269	1,03
OD 2	1,49	1,5	1,16	1,24	1,09	1,1
OD 3	1,114	1,221	1,48	0,952	1,19	1,254
OD ortalama	1,268	1,284	1,248	1,179	1,157	1,128
Canlılık oranı 1	-	89,19558	92,27129	105,6782	100,0789	81,23028
Canlılık oranı 2	-	118,2965	91,48265	97,7918	85,96215	86,75079
Canlılık oranı 3	-	96,29338	116,7192	75,07886	93,84858	98,8959
Canlılık oranı ortalama	100,00	101,2618	98,42271	92,98107	91,24606	88,95899
48 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	1,1	1,23	1,112	1,07	1,056	1,03
OD 2	0,82	0,98	1,198	1,284	0,991	1,084
OD 3	1,8	1,4	1,25	0,869	1,1	1,007
OD ortalama	1,24	1,206	1,186	1,074	1,049	1,04
Canlılık oranı 1	-	99,19355	89,67742	86,29032	88,70968	83,06452
Canlılık oranı 2	-	79,03226	96,6129	103,5484	79,91935	87,41935
Canlılık oranı 3	-	112,9032	100,8065	70,08065	88,70968	81,20968
Canlılık oranı ortalama	100,00	97,25806	95,64516	86,6129	84,59677	83,87097
72 saat	Kontrol	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	7,5 µg/ml	10 µg/ml
OD 1	1,02	1,052	0,976	0,927	0,933	0,914
OD 2	0,94	0,936	1,1	0,893	0,879	0,99
OD 3	1,4	1,112	0,937	0,968	0,967	0,834
OD ortalama	1,12	1,033333	1,004333	0,929333	0,926333	0,912667
Canlılık oranı 1	-	93,92857	87,14286	82,76786	83,30357	81,60714
Canlılık oranı 2	-	83,57143	98,21429	79,73214	78,48214	88,39286
Canlılık oranı 3	-	99,28571	83,66071	86,42857	86,33929	74,46429
Canlılık oranı ortalama	100,00	92,2619	89,67262	82,97619	82,70833	81,4881

**Tablo-15** *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait meyve özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde HUVEC hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,2	1,32	1,112	1,47	1,134	1,111
OD 2	1,49	1,244	1,18	0,954	1,375	1,148
OD 3	1,114	1,118	1,25	0,998	0,996	1,054
OD ortalama	1,268	1,227333	1,180667	1,140667	1,168333	1,104333
Canlılık oranı 1	-	104,1009	87,69716	115,9306	89,43218	87,6183
Canlılık oranı 2	-	98,10726	93,05994	75,23659	108,4385	90,53628
Canlılık oranı 3	-	88,17035	98,58044	78,70662	78,5489	83,12303
Canlılık oranı ortalama	100,00	96,79285	93,11251	89,95794	92,13985	87,09253
48 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,1	1,177	1,118	1,115	1,002	1,14
OD 2	0,82	1,24	0,986	1,091	1,146	0,953
OD 3	1,8	1,113	1,392	1,108	1,11	1,069
OD ortalama	1,24	1,176667	1,165333	1,104667	1,086	1,054
Canlılık oranı 1	-	94,91935	90,16129	89,91935	80,80645	91,93548
Canlılık oranı 2	-	100	79,51613	87,98387	92,41935	76,85484
Canlılık oranı 3	-	89,75806	112,2581	89,35484	89,51613	86,20968
Canlılık oranı ortalama	100,00	94,89247	93,97849	89,08602	87,58065	85
72 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,02	0,999	1,02	0,923	0,952	0,882
OD 2	0,94	1,17	0,917	0,975	1,017	0,785
OD 3	1,4	0,975	1,12	1,025	0,924	0,963
OD ortalama	1,12	1,048	1,019	0,974333	0,964333	0,876667
Canlılık oranı 1	-	89,19643	91,07143	82,41071	85	78,75
Canlılık oranı 2	-	104,4643	81,875	87,05357	90,80357	70,08929
Canlılık oranı 3	-	87,05357	100	91,51786	82,5	85,98214
Canlılık oranı ortalama	100,00	93,57143	90,98214	86,99405	86,10119	78,27381

*J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatları ile HUVEC normal hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde ilgili doz aralıkları için belirlenen sitotoksik etkileri doza-bağlı hücre canlılığındaki % değişimler olarak Şekil-20'de gösterilmiştir.





Şekil-20 *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin sitotoksik etkileri (A)-(B) DU145 (C)-(D) PC-3 (E)-(F) HUVEC  
 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ve \*\*\*\*  $p < 0.0001$

#### **4.1.2. *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türüne Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin Sitotoksik Etkisi**

WST-1 analizi sonuçlarına göre DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde uygulanan *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait 15 farklı yaprak ve meyve özütü dozundan, hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azaltan 5 farklı doz aralığı tespit edilmiştir. DU145 hücre hattında ilgili doz aralıklarında hücre canlılığına bağlı olarak WST-1 analizinden elde edilen absorbans değerleri (OD) ve absorbans değerlerine karşılık gelen hücre canlılığı yüzdesi yaprak özütü için Tablo-16'da; meyve özütü için Tablo-17'de gösterilmiştir. PC-3 hücre hattında ilgili doz aralıklarında hücre canlılığına bağlı olarak WST-1 analizinden elde edilen absorbans değerleri (OD) ve absorbans değerlerine karşılık gelen hücre canlılığı yüzdesi ise yaprak özütü için Tablo-18'de; meyve özütü için Tablo-19'da gösterilmiştir.

**Tablo-16** *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde DU145 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	100 µg/ml	125 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml
OD 1	0,68	0,5	0,445	0,49	0,44	0,412
OD 2	0,58	0,615	0,531	0,555	0,524	0,422
OD 3	0,51	0,64	0,502	0,395	0,443	0,523
OD ortalama	0,59	0,585	0,49266667	0,48	0,469	0,45233333
Canlılık oranı 1	-	84,74576271	75,4237288	83,0508	74,57627	69,8305085
Canlılık oranı 2	-	104,2372881	90	94,0678	88,81356	71,5254237
Canlılık oranı 3	-	108,4745763	85,0847458	66,9492	75,08475	88,6440678
Canlılık oranı ortalama	100,00	99,15254237	83,5028249	81,3559	79,49153	76,6666667
48 saat	Kontrol	100 µg/ml	125 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml
OD 1	0,689	0,458	0,458	0,396	0,362	0,325
OD 2	0,438	0,519	0,395	0,334	0,358	0,303
OD 3	0,7	0,499	0,52	0,419	0,396	0,444
OD ortalama	0,609	0,492	0,45766667	0,383	0,372	0,35733333
Canlılık oranı 1	-	75,20525452	75,2052545	65,0246	59,44171	53,3661741
Canlılık oranı 2	-	85,22167488	64,8604269	54,844	58,78489	49,7536946
Canlılık oranı 3	-	81,93760263	85,3858785	68,8013	65,02463	72,9064039
Canlılık oranı ortalama	100,00	80,78817734	75,15052	62,89	61,08374	58,6754242
72 saat	Kontrol	100 µg/ml	125 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml
OD 1	0,624	0,489	0,33	0,379	0,222	0,2
OD 2	0,632	0,513	0,372	0,266	0,257	0,129
OD 3	0,7	0,416	0,285	0,299	0,279	0,3
OD ortalama	0,652	0,472666667	0,329	0,31467	0,252667	0,20966667
Canlılık oranı 1	-	75	50,6134969	58,1288	34,04908	30,6748466
Canlılık oranı 2	-	78,6809816	57,0552147	40,7975	39,41718	19,7852761
Canlılık oranı 3	-	63,80368098	43,7116564	45,8589	42,79141	46,0122699
Canlılık oranı ortalama	100,00	72,49488753	50,4601227	48,2618	38,75256	32,1574642

**Tablo-17** *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait meyve özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde DU145 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,579	0,472	0,458	0,449	0,412	0,399
OD 2	0,399	0,519	0,372	0,359	0,407	0,412
OD 3	0,54	0,448	0,578	0,514	0,384	0,365
OD ortalama	0,506	0,479667	0,469333	0,440667	0,401	0,392
Canlılık oranı 1	-	93,28063	90,51383	88,73518	81,42292	78,85375
Canlılık oranı 2	-	102,5692	73,51779	70,94862	80,43478	81,42292
Canlılık oranı 3	-	88,53755	114,2292	101,581	75,88933	72,13439
Canlılık oranı ortalama	100,00	94,79578	92,75362	87,08827	79,24901	77,47036
48 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,98	0,792	0,744	0,754	0,682	0,6
OD 2	0,982	0,811	0,9	0,729	0,741	0,573
OD 3	0,768	0,785	0,683	0,8	0,636	0,635
OD ortalama	0,91	0,796	0,775667	0,761	0,686333	0,602667
Canlılık oranı 1	-	87,03297	81,75824	82,85714	74,94505	65,93407
Canlılık oranı 2	-	89,12088	98,9011	80,10989	81,42857	62,96703
Canlılık oranı 3	-	86,26374	75,05495	87,91209	69,89011	69,78022
Canlılık oranı ortalama	100,00	87,47253	85,2381	83,62637	75,42125	66,22711
72 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,53	1,265	1,136	1,07	0,889	0,771
OD 2	1,919	1,384	1,157	0,921	0,902	0,598
OD 3	1,171	1,14	1,118	1,128	0,916	0,834
OD ortalama	1,54	1,263	1,137	1,039667	0,902333	0,734333
Canlılık oranı 1	-	82,14286	73,76623	69,48052	57,72727	50,06494
Canlılık oranı 2	-	89,87013	75,12987	59,80519	58,57143	38,83117
Canlılık oranı 3	-	74,02597	72,5974	73,24675	59,48052	54,15584
Canlılık oranı ortalama	100,00	82,01299	73,83117	67,51082	58,59307	47,68398



**Tablo-18** *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde PC-3 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

<b>24 saat</b>	<b>Kontrol</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>125 µg/ml</b>	<b>150 µg/ml</b>	<b>175 µg/ml</b>	<b>200 µg/ml</b>
<b>OD 1</b>	1,731	1,763	1,682	1,691	1,534	1,41
<b>OD 2</b>	1,99	1,724	1,547	1,734	1,6	1,45
<b>OD 3</b>	1,814	1,852	1,82	1,514	1,364	1,524
<b>OD ortalama</b>	1,845	1,779667	1,683	1,646333	1,499333	1,461333
<b>Canlılık oranı 1</b>	-	95,55556	91,16531	91,65312	83,14363	76,42276
<b>Canlılık oranı 2</b>	-	93,44173	83,84824	93,98374	86,72087	78,59079
<b>Canlılık oranı 3</b>	-	100,3794	98,64499	82,05962	73,92954	82,60163
<b>Canlılık oranı ortalama</b>	100,00	96,4589	91,21951	89,23216	81,26468	79,20506
<b>48 saat</b>	<b>Kontrol</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>125 µg/ml</b>	<b>150 µg/ml</b>	<b>175 µg/ml</b>	<b>200 µg/ml</b>
<b>OD 1</b>	0,985	0,841	0,806	0,688	0,555	0,512
<b>OD 2</b>	2,07	0,95	0,873	0,681	0,629	0,531
<b>OD 3</b>	0,91	0,749	0,724	0,708	0,521	0,444
<b>OD ortalama</b>	0,957	0,846667	0,801	0,692333	0,568333	0,495667
<b>Canlılık oranı 1</b>	-	87,87879	84,22153	71,89133	57,99373	53,50052
<b>Canlılık oranı 2</b>	-	99,26855	91,22257	71,15987	65,72623	55,48589
<b>Canlılık oranı 3</b>	-	78,26541	75,65308	73,98119	54,44096	46,39498
<b>Canlılık oranı ortalama</b>	100,00	88,47092	83,69906	72,34413	59,38697	51,7938
<b>72 saat</b>	<b>Kontrol</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>125 µg/ml</b>	<b>150 µg/ml</b>	<b>175 µg/ml</b>	<b>200 µg/ml</b>
<b>OD 1</b>	0,547	0,43	0,355	0,26	0,259	0,115
<b>OD 2</b>	0,538	0,345	0,382	0,294	0,167	0,114
<b>OD 3</b>	0,43	0,291	0,311	0,244	0,18	0,214
<b>OD ortalama</b>	0,505	0,355333	0,349333	0,266	0,202	0,147667
<b>Canlılık oranı 1</b>	-	77,42718	67,96117	76,94175	53,54369	35,18447
<b>Canlılık oranı 2</b>	-	81,5534	48,78641	60,43689	61,93204	45,74757
<b>Canlılık oranı 3</b>	-	66,99029	97,08738	58,25243	60,92233	38,97087
<b>Canlılık oranı ortalama</b>	100,00	70,36304	69,17492	52,67327	40	29,24092



**Tablo-19** *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait meyve özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde PC-3 hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,731	1,86	1,699	1,52	1,446	1,322
OD 2	1,99	1,779	1,501	1,703	1,365	1,352
OD 3	1,814	1,647	1,487	1,563	1,528	1,25
OD ortalama	1,845	1,762	1,562333	1,595333	1,446333	1,308
Canlılık oranı 1	-	100,813	92,08672	82,38482	78,37398	71,65312
Canlılık oranı 2	-	96,42276	81,35501	92,30352	73,98374	73,27913
Canlılık oranı 3	-	89,26829	80,59621	84,71545	82,81843	67,75068
Canlılık oranı ortalama	100,00	95,50136	84,67931	86,46793	78,39205	70,89431
48 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,985	0,845	0,888	0,775	0,707	0,666
OD 2	2,07	0,901	0,846	0,741	0,616	0,587
OD 3	0,91	0,78	0,755	0,823	0,8	0,69
OD ortalama	0,957	0,842	0,829667	0,779667	0,707667	0,647667
Canlılık oranı 1	-	88,29676	92,78997	80,98224	73,8767	69,59248
Canlılık oranı 2	-	94,14838	88,40125	77,42947	64,36782	61,33751
Canlılık oranı 3	-	81,5047	78,89237	85,99791	83,59457	72,10031
Canlılık oranı ortalama	100,00	87,98328	86,69453	81,46987	73,94636	67,67677
72 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	0,547	0,336	0,33	0,324	0,263	0,226
OD 2	0,538	0,428	0,41	0,23	0,244	0,147
OD 3	0,43	0,426	0,321	0,441	0,289	0,301
OD ortalama	0,505	0,396667	0,353667	0,331667	0,265333	0,224667
Canlılık oranı 1	-	66,53465	65,34653	64,15842	52,07921	44,75248
Canlılık oranı 2	-	84,75248	81,18812	45,54455	48,31683	29,10891
Canlılık oranı 3	-	84,35644	63,56436	87,32673	57,22772	59,60396
Canlılık oranı ortalama	100,00	78,54785	70,033	65,67657	52,54125	44,48845

WST-1 analizinde *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında maksimum sitotoksik etkisini gösterdiği zaman dilimi 72 saat olarak tespit edilmiştir. 72 saatlik süre sonunda yaprak özütü için 200 µg/ml olarak belirlenen en etkin dozun DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla %67,85 ( $p<0.0001$ ) ve %70,76 ( $p<0.0001$ ) oranlarında hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır. Meyve özütü için 250 µg/ml olarak belirlenen en etkin dozun ise DU145 hücre hattında %52,32 ( $p<0.0001$ ); PC-3 hücre hattında %55,52 ( $p<0.001$ ) oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Aynı dozlarda ve aynı zaman diliminde HUVEC normal hücre hattında yapılan uygulama sonucunda hücre canlılığında saptanan inhibisyon oranları ise yaprak özütü için %27,91 ( $p<0.001$ ); meyve özütü için %20,31 ( $p<0.01$ )'tir (Tablo-20 ve Tablo-21).

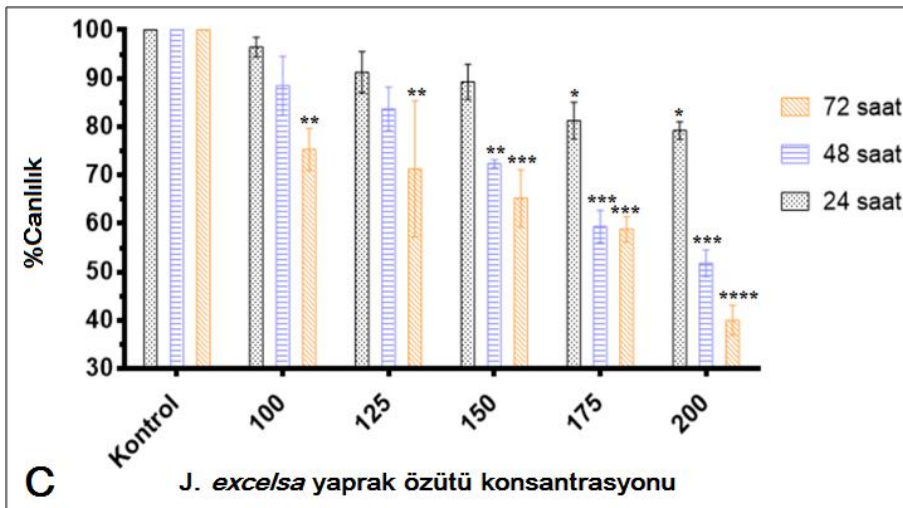
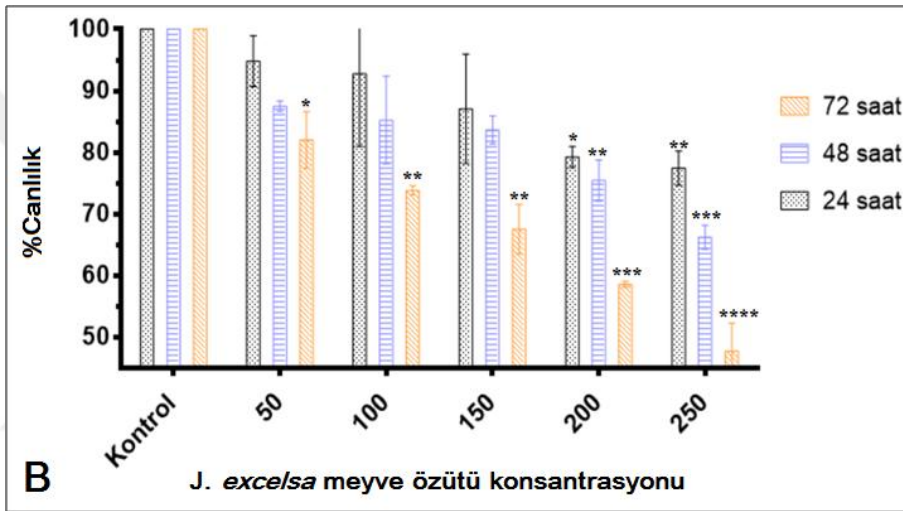
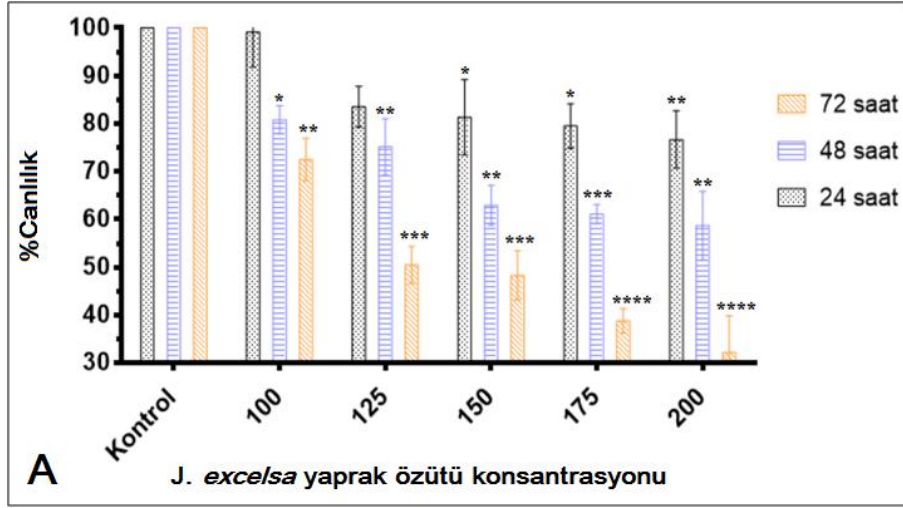
**Tablo-20** *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde HUVEC hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

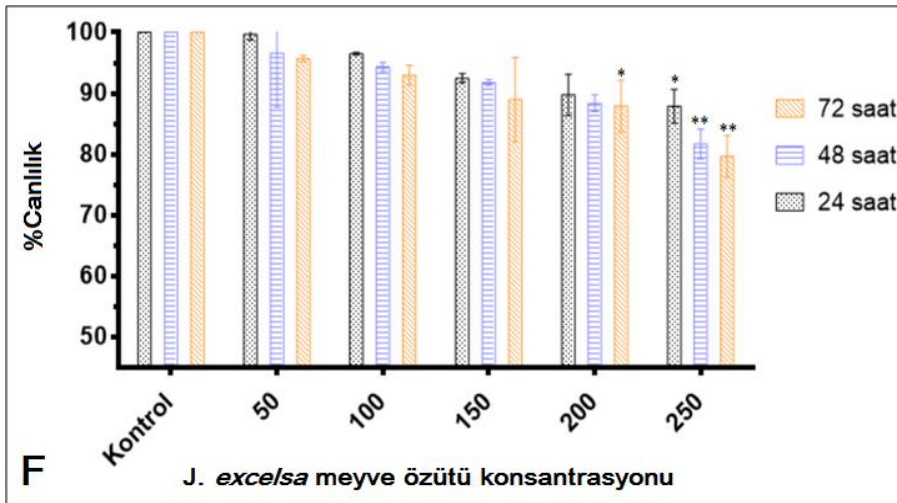
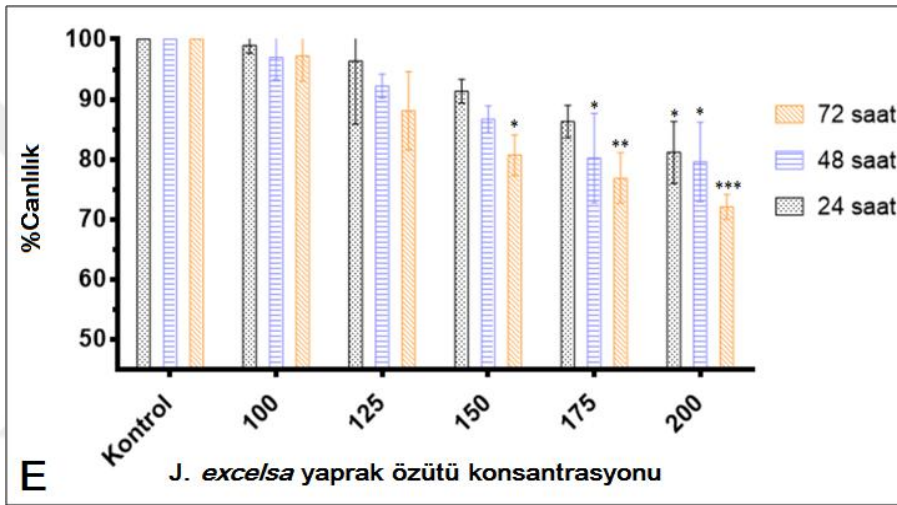
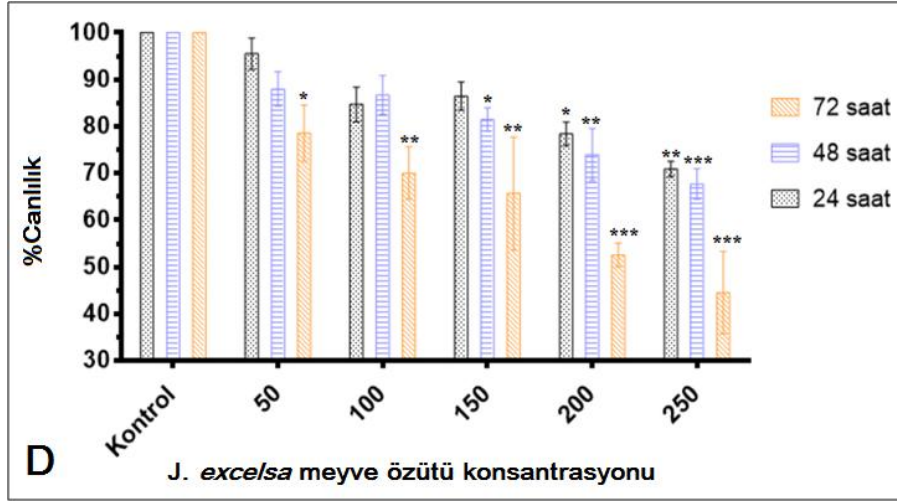
24 saat	Kontrol	100 µg/ml	125 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml
OD 1	1,222	1,226	1,116	1,159	1,006	0,983
OD 2	1,317	1,216	0,986	1,079	1,032	1,1
OD 3	1,115	1,175	1,42	1,1	1,115	0,883
OD ortalama	1,218	1,205667	1,174	1,112667	1,051	0,988667
Canlılık oranı 1	-	100,6568	91,62562	95,15599	82,59442	80,70608
Canlılık oranı 2	-	99,8358	80,95238	88,58785	84,72906	90,31199
Canlılık oranı 3	-	96,46962	116,5846	90,31199	91,54351	72,49589
Canlılık oranı ortalama	100,00	98,98741	96,38752	91,35194	86,289	81,17132
48 saat	Kontrol	100 µg/ml	125 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml
OD 1	1,296	1,211	1,214	1,11	1,036	0,889
OD 2	1,214	1,371	1,171	1,119	1,238	1,07
OD 3	1,447	1,256	1,263	1,201	0,9	1,19
OD ortalama	1,319	1,279333	1,216	1,143333	1,058	1,049667
Canlılık oranı 1	-	91,81198	92,03942	84,15466	78,54435	67,39955
Canlılık oranı 2	-	103,9424	88,77938	84,837	93,85898	81,12206
Canlılık oranı 3	-	95,22365	95,75436	91,05383	68,23351	90,21986
Canlılık oranı ortalama	100,00	96,99267	92,19105	86,68183	80,21228	79,58049
72 saat	Kontrol	100 µg/ml	125 µg/ml	150 µg/ml	175 µg/ml	200 µg/ml
OD 1	1,126	1,23	1,003	0,917	0,8	0,821
OD 2	1,238	1,065	0,911	1,019	0,95	0,814
OD 3	1,137	1,109	1,17	0,889	0,942	0,889
OD ortalama	1,167	1,134667	1,028	0,941667	0,897333	0,841333
Canlılık oranı 1	-	105,3985	85,94687	78,57755	68,55184	70,35133
Canlılık oranı 2	-	91,25964	78,06341	87,31791	81,40531	69,7515
Canlılık oranı 3	-	95,02999	100,2571	76,17823	80,71979	76,17823
Canlılık oranı ortalama	100,00	97,22936	88,08912	80,69123	76,89232	72,09369

**Tablo-21** *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait meyve özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde HUVEC hücre hattı canlılığı üzerindeki etkisi

24 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,222	1,23	1,17	1,126	1,02	1,089
OD 2	1,317	1,193	1,176	1,142	1,096	1,005
OD 3	1,115	1,22	1,179	1,111	1,163	1,117
OD ortalama	1,218	1,214333	1,175	1,126333	1,093	1,070333
Canlılık oranı 1	-	100,9852	96,05911	92,44663	83,74384	89,40887
Canlılık oranı 2	-	97,94745	96,55172	93,76026	89,98358	82,51232
Canlılık oranı 3	-	100,1642	96,79803	91,21511	95,4844	91,70772
Canlılık oranı ortalama	100,00	99,69896	96,46962	92,474	89,73727	87,8763
48 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,296	1,267	1,25	1,213	1,167	1,082
OD 2	1,214	1,48	1,258	1,199	1,134	1,13
OD 3	1,447	1,075	1,226	1,22	1,196	1,02
OD ortalama	1,319	1,274	1,244667	1,210667	1,165667	1,077333
Canlılık oranı 1	-	96,05762	94,76876	91,96361	88,47612	82,03184
Canlılık oranı 2	-	112,2062	95,37528	90,9022	85,97422	85,67096
Canlılık oranı 3	-	81,50114	92,9492	92,49431	90,67475	77,33131
Canlılık oranı ortalama	100,00	96,58832	94,36442	91,78671	88,37503	81,67804
72 saat	Kontrol	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml
OD 1	1,126	1,119	1,12	1,029	1,027	0,932
OD 2	1,238	1,105	1,079	1,183	0,939	0,86
OD 3	1,137	1,126	1,056	0,903	1,111	0,998
OD ortalama	1,167	1,116667	1,085	1,038333	1,025667	0,93
Canlılık oranı 1	-	95,88689	95,97258	88,17481	88,00343	79,8629
Canlılık oranı 2	-	94,68723	92,4593	101,371	80,46272	73,69323
Canlılık oranı 3	-	96,48672	90,48843	77,37789	95,20137	85,51842
Canlılık oranı ortalama	100,00	95,68695	92,97344	88,97458	87,88917	79,69152

*J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatları ile HUVEC normal hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde ilgili doz aralıkları için belirlenen sitotoksik etkileri doza- bağılı hücre canlılığındaki % değişimler olarak Şekil-21'de gösterilmiştir.





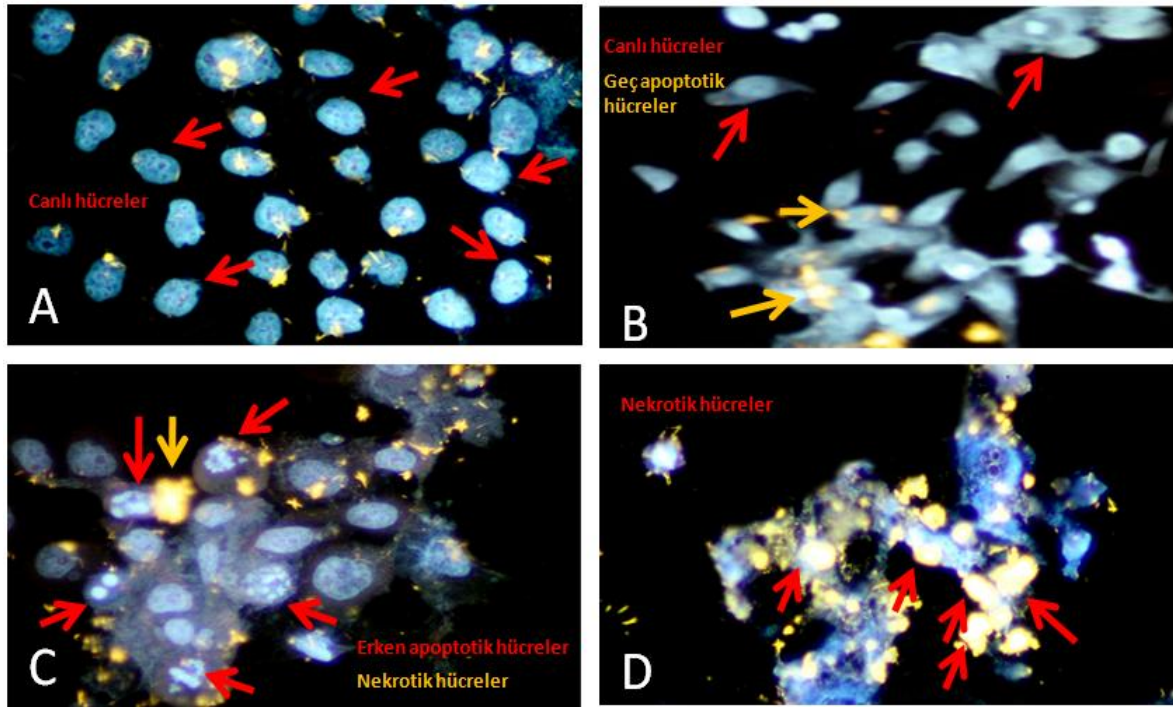
Şekil-21 *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak ve meyve özütlerinin sitotoksik etkileri (A)-(B) DU145 (C)-(D) PC-3 (E)-(F) HUVEC  
 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ve \*\*\*\*  $p < 0.0001$



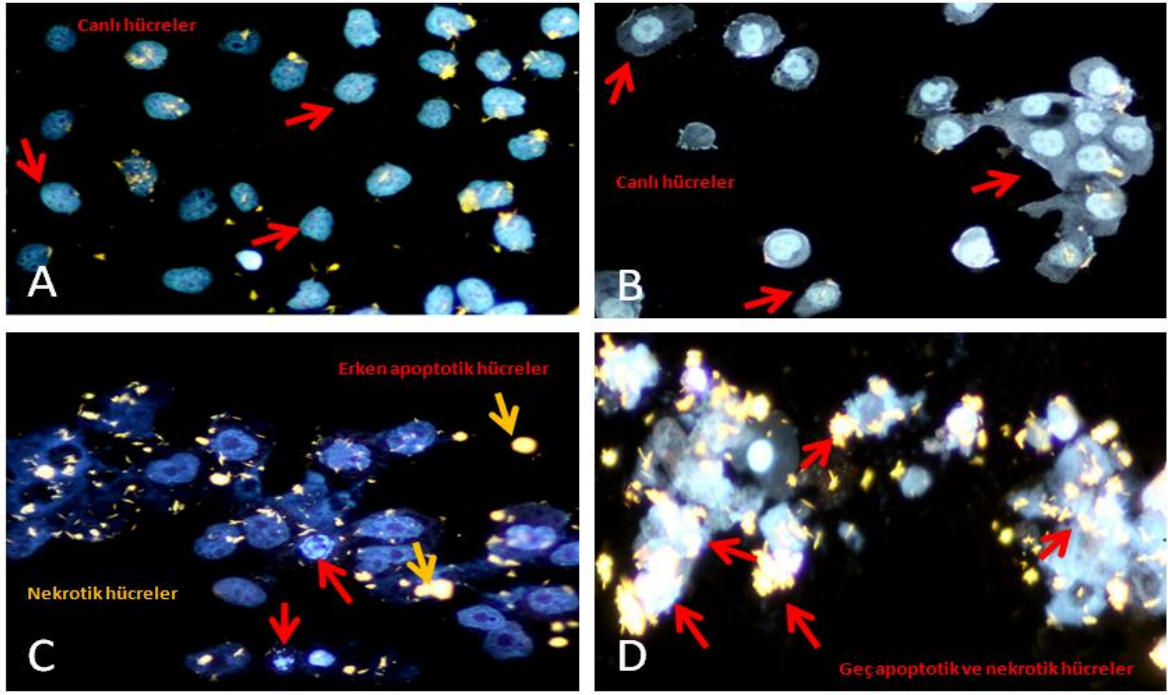
## 4.2. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türlerine Ait Yaprak ve Meyve Özütlerinin DU145 ve PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hatları ile HUVEC Normal Hücre Hattında Hücre Ölümü Üzerine Etkileri

### 4.2.1. Morfolojik Analiz

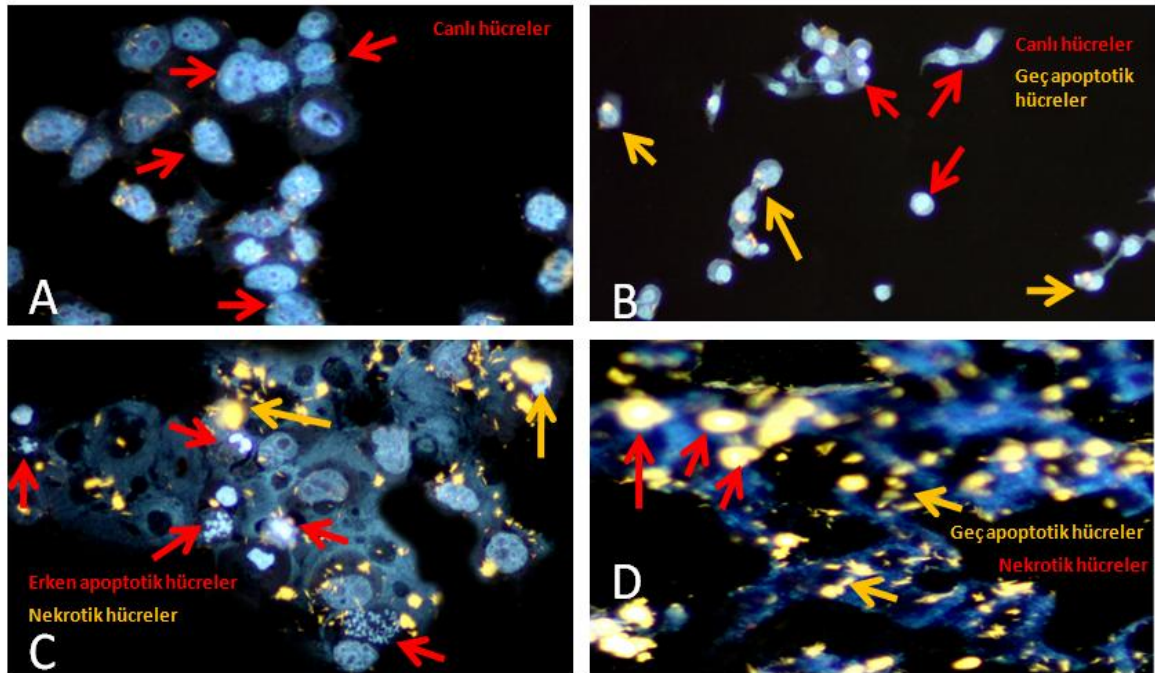
Sitotoksosite deneylerinden elde edilen veriler doğrultusunda, DU145 hücre hattında maksimum sitotoksik etki gösterdiği saptanan özüt dozlarının (*J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. yaprak özütü için 10 µg/ml, meyve özütü için 250 µg/ml; *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* yaprak özütü için 200 µg/ml, meyve özütü için 250 µg/ml) 24, 48 ve 72 saat uygulamaları sonrasında 24 saatlik preparatlarda hücre ölümü morfolojik olarak net şekilde belirlenemese de 48 saati takiben tüm uygulamalarda erken apoptotik ve nekrotik morfolojide belirgin artış saptanmıştır. 72 saatlik uygulamalarda ise 48 saatlik uygulamalara göre geç apoptotik ve nekrotik morfolojinin arttığı ve hücrelerin normal morfolojilerinden oldukça uzaklaştığı gözlenmiştir (Şekil-22, -23, -24 ve -25).



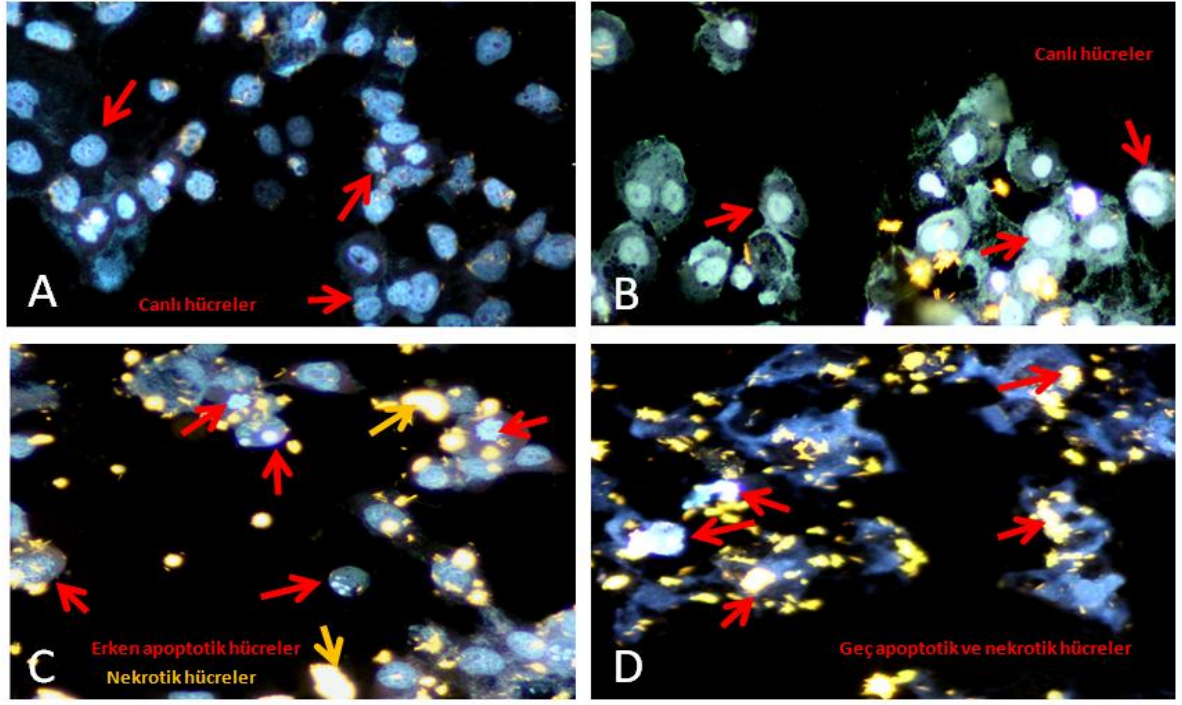
Şekil 22 DU145 hücre hattında 10 µg/ml *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. yaprak özütünün (B) 24, (C) 48 ve (D) 72 saatte hücre ölümü üzerindeki etkilerinin morfolojik analizi (A) Kontrol



**Şekil 23** DU145 hücre hattında 250 µg/ml *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. meyve özütünün (B) 24, (C) 48 ve (D) 72 saatte hücre ölümü üzerindeki etkilerinin morfolojik analizi (A) Kontrol



**Şekil 24** DU145 hücre hattında 200 µg/ml *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* yaprak özütünün (B) 24, (C) 48 ve (D) 72 saatte hücre ölümü üzerindeki etkilerinin morfolojik analizi (A) Kontrol

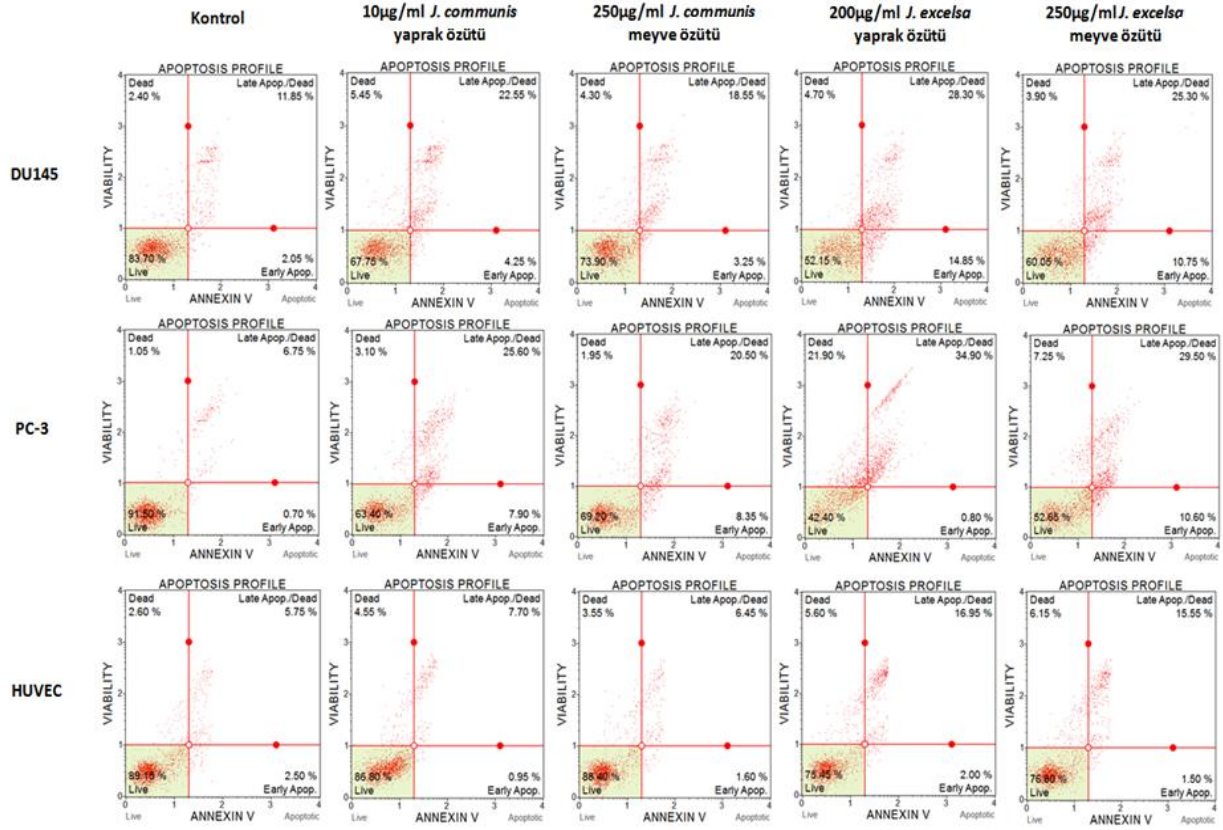


**Şekil 25** DU145 hücre hattında 250 µg/ml *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* meyve özütünün (B) 24, (C) 48 ve (D) 72 saatte hücre ölümü üzerindeki etkilerinin morfolojik analizi (A) Kontrol

#### 4.2.2. İmmünohistokimyasal Analiz

*Juniperus* L. türlerinin yaprak ve meyve özütlerine ait belirlenen en etkin dozlar ile 72 saatlik en etkin süre diliminde gerçekleştirilen Annexin V analizine göre 10 µg/ml *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. türüne ait yaprak özütünün DU145 hücrelerinde %26,8 apoptotik, %5,45 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %33,5 apoptotik, %3,10 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %8,65 apoptotik, %4,55 nekrotik ölüme yol açtığı ve aynı türe ait 250 µg/ml meyve özütünün DU145 hücrelerinde %21,8 apoptotik, %4,30 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %28,85 apoptotik, %1,95 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %8,05 apoptotik, %3,55 nekrotik ölüme yol açtığı saptanmıştır. Aynı inkübasyon süresinde 200 µg/ml *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak özütünün ise DU145 hücrelerinde %43,15 apoptotik, %4,70 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %35,7 apoptotik, %21,90 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %18,95 apoptotik, %5,60 nekrotik ölüme yol açtığı ve aynı türe ait 250 µg/ml meyve özütünün DU145 hücrelerinde %36,05 apoptotik, %3,90 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %40,1 apoptotik, %7,25 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %17,05 apoptotik, %6,15 nekrotik ölüme yol açtığı belirlenmiştir (Şekil-26).





**Şekil-26** *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türlerine ait yaprak ve meyve özütlerinin hücre ölümü üzerindeki etkilerinin immünohistokimyasal analizi. Kontrol: muamelesiz hücre

#### 4.3. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türlerinin Yaprak ve Meyvelerine Ait Özütlerin DU145 ve PC-3 Hücre Hatlarında *MMP-2* ve *MMP-9* Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

Elde edilen RT-qPCR verilerine göre maksimum sitotoksik etki gösterdiği belirlenen *Juniperus* L. özüt dozlarının 72 saatlik uygulamaları sonrasında, DU145 (Şekil-27 ve Şekil-28) ve PC-3 (Şekil-29 ve Şekil-30) hücre hatlarında, invaziv süreçlerde önemli roller üstlenen *MMP2* ve *MMP9* genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalma (sırasıyla  $p < 0.01$  ve  $p < 0.05$ ) olduğu saptanmıştır. Uygulama yapılmayan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. yaprak özütü 10 µg/ml dozda *MMP2* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 26,17 ve 21,50 kat, *MMP9* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 59,99 ve 67,64 kat; meyve özütü 250 µg/ml dozda *MMP2* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 22,52 ve 18,93 kat,

*MMP9* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 47,17 ve 64,89 kat; *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* yaprak özütü 200 µg/ml dozda *MMP2* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 23,26 ve 22,52 kat, *MMP9* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 97,23 kat ve 125,07 kat; meyve özütü 250 µg/ml dozda *MMP2* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 16,91 ve 11,44 kat, *MMP9* geninde DU145 ve PC-3 hücre hatlarında sırasıyla 39,12 ve 51,50 kat azalışa yol açmıştır (Tablo-22). İki farklı türün yaprak ve meyve özüt dozlarının ilgili genlerde neden olduğu ekspresyon değişimlerinin deney grupları arasında yapılan karşılaştırma sonuçları ise Tablo-23, -24 ve -25'de gösterilmiş olup deney grupları arasında anlamlı olduğu belirlenen gen ekspresyon farklılıklarının *p* değerleri DU145 hücre hattında *MMP-2* için Şekil-27 ve *MMP-9* için Şekil-28; PC-3 hücre hattında *MMP-2* için Şekil-29 ve *MMP-9* için Şekil-30 üzerinde gösterilmiştir.

**Tablo-22** DU145 ve PC-3 hücre hatlarında 72 saatlik özüt muamelesi sonrasında *MMP-2* ve *MMP-9* genlerindeki ekspresyon değişimlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

	<b>DU145</b>		<b>PC-3</b>	
	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
<b>Kontrol</b>				
2 <sup>Δ</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,123279	0,01354	0,176369	0,01599
<b>10 µg/ml J. communis yaprak özütü</b>				
2 <sup>Δ</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,00471	0,000226	0,008201	0,000236
Kat Değişim	0,0382	0,0167	0,0465	0,0148
%95 CI	( 0.03, 0.05 )	( 0.01, 0.02 )	( 0.04, 0.06 )	( 0.01, 0.02 )
Kat Regülasyon	-26,1729	-59,9907	-21,506	-67,6492
p değeri	0.002811	0.0377	0.00104	0.0216
<b>250 µg/ml J. communis meyve özütü</b>				
2 <sup>Δ</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,005473	0,000287	0,009312	0,000246
Kat Değişim	0,0444	0,0212	0,0528	0,0154
%95 CI	( 0.03, 0.06 )	( 0.01, 0.02 )	( 0.04, 0.07 )	( 0.01, 0.02 )
Kat Regülasyon	-22,5231	-47,1766	-18,9396	-64,8934
p değeri	0.00288	0.03672	0.001067	0.02037
<b>200 µg/ml J. excelsa yaprak özütü</b>				
2 <sup>Δ</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,005299	0,000139	0,007831	0,000128
Kat Değişim	0,043	0,0103	0,0444	0,008
%95 CI	( 0.03, 0.05 )	( 0.01, 0.02 )	( 0.03, 0.05 )	( 0.01, 0.01 )
Kat Regülasyon	-23,2636	-97,2303	-22,5231	-125,0765
p değeri	0.002861	0.0479	0.001031	0.02079
<b>250 µg/ml J. excelsa meyve özütü</b>				
2 <sup>Δ</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,007289	0,000346	0,01541	0,00031
Kat Değişim	0,0591	0,0256	0,0874	0,0194
%95 CI	( 0.04, 0.08 )	( 0.02, 0.03 )	( 0.07, 0.11 )	( 0.01, 0.02 )
Kat Regülasyon	-16,9123	-39,1245	-11,4452	-51,5059
p değeri	0.003049	0.03713	0.001227	0.02716

**Tablo-23** DU145 ve PC-3 hücre hatlarında 72 saatlik 10 µg/ml *J. communis* yaprak özütü uygulaması sonrasında *MMP-2* ve *MMP-9* genlerindeki ekspresyon değişimlerinin diğer uygulamalar ile karşılaştırılması

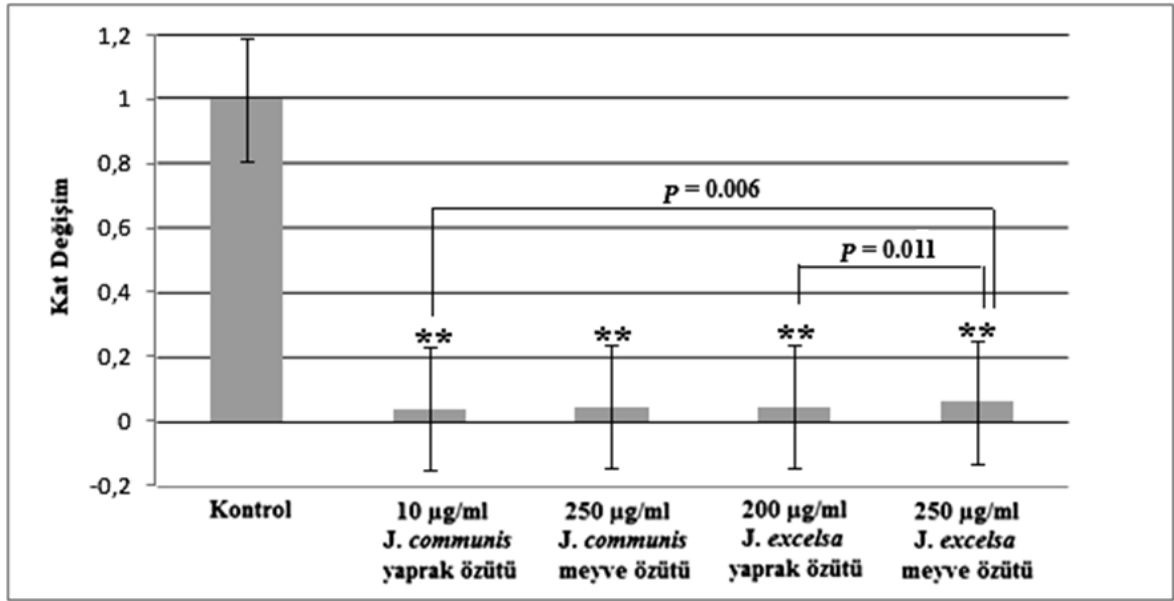
	<b>DU145</b>		<b>PC-3</b>	
	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
<b>10 µg/ml <i>J. communis</i> yaprak özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,00471	0,000226	0,008201	0,000236
<b>250 µg/ml <i>J. communis</i> meyve özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,005473	0,000287	0,009312	0,000246
Kat Değişim	1,162	1,2716	1,1355	1,0425
%95 CI	( 0.98, 1.34 )	( 1.13, 1.42 )	( 1.01, 1.26 )	( 0.84, 1.25 )
Kat Regülasyon	1,162	1,2716	1,1355	1,0425
<i>p</i> değeri	0.135665	0.015371	0.09814	0.714987
<b>200 µg/ml <i>J. excelsa</i> yaprak özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,005299	0,000139	0,007831	0,000128
Kat Değişim	1,1251	0,617	0,9548	0,5409
%95 CI	( 1.02, 1.23 )	( 0.57, 0.66 )	( 0.90, 1.01 )	( 0.45, 0.63 )
Kat Regülasyon	1,1251	-1,6208	-1,0473	-1,8489
<i>p</i> değeri	0.071107	0.0408	0.196493	0.004253
<b>250 µg/ml <i>J. excelsa</i> meyve özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,007289	0,000346	0,01541	0,00031
Kat Değişim	1,5476	1,5333	1,879	1,3134
%95 CI	( 1.31, 1.78 )	( 0.41, 1.66 )	( 1.75, 2.00 )	( 1.07, 1.56 )
Kat Regülasyon	1,5476	1,5333	1,879	1,3134
<i>p</i> değeri	0.006446	0.00512	0.329914	0.045986

**Tablo-24** DU145 ve PC-3 hücre hatlarında 72 saatlik 250 µg/ml *J. communis* meyve özütü uygulaması sonrasında *MMP-2* ve *MMP-9* genlerindeki ekspresyon değişimlerinin diğer uygulamalar ile karşılaştırılması

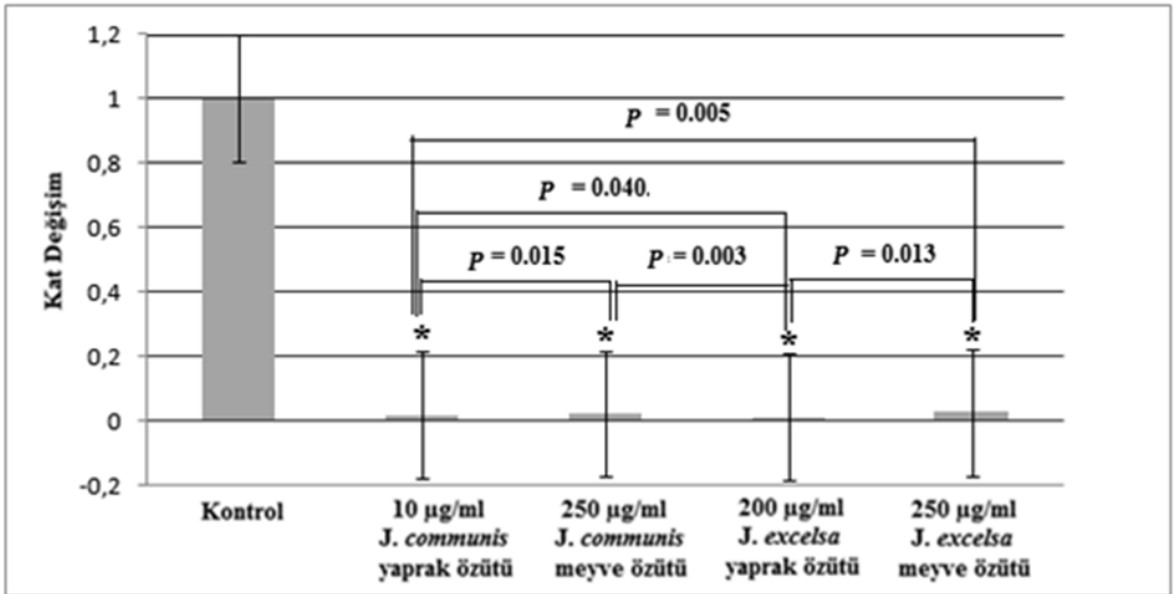
	<b>DU145</b>		<b>PC-3</b>	
	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
<b>250 µg/ml <i>J. communis</i> meyve özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,005473	0,000287	0,009312	0,000246
<b>200 µg/ml <i>J. excelsa</i> yaprak özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,005299	0,000139	0,007831	0,000128
Kat Değişim	0,9682	0,4852	0,8409	0,5188
%95 CI	( 0.84, 1.09 )	( 0.44, 0.53 )	( 0.75, 0.93 )	( 0.44, 0.60 )
Kat Regülasyon	-1,0329	-2,061	-1,1892	-1,9274
<i>p</i> değeri	0.622446	0.0035	0.040444	0.02436
<b>250 µg/ml <i>J. excelsa</i> meyve özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,007289	0,000346	0,01541	0,0031
Kat Değişim	1,3318	1,2058	1,6548	1,2599
%95 CI	( 1.10, 1.56 )	( 1.08, 1.33 )	( 0.47, 1.84 )	( 1.04, 1.48 )
Kat Regülasyon	1,1674	1,2058	1,6548	1,2599
<i>p</i> değeri	0.056323	0.181526	0.17529	0.062474

**Tablo-25** DU145 ve PC-3 hücre hatlarında 72 saatlik 200 µg/ml *J. excelsa* yaprak özütü uygulaması sonrasında *MMP-2* ve *MMP-9* genlerindeki ekspresyon değişimlerinin diğer uygulamalar ile karşılaştırılması

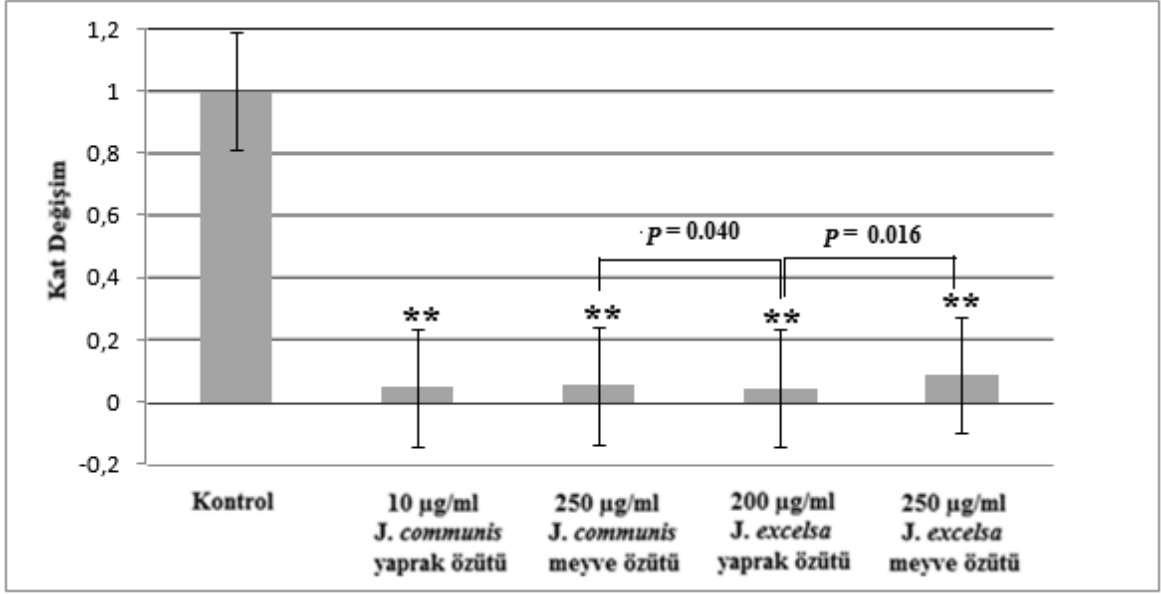
	DU145		PC-3	
	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
<b>200 µg/ml <i>J. excelsa</i> yaprak özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,005299	0,000139	0,007831	0,000128
<b>250 µg/ml <i>J. excelsa</i> yaprak özütü</b>				
2 <sup>-</sup> (-Avg.(Delta(Ct)))	0,007289	0,000346	0,01541	0,0031
Kat Değişim	1,3755	2,4852	1,9679	2,4284
%95 CI	( 1.20, 1.55 )	( 2.36, 2.61 )	( 0.86, 2.08 )	( 2.12, 2.74 )
Kat Regülasyon	1,3755	2,4852	1,9679	2,4284
<i>p</i> değeri	0.011085	0.0135	0.016678	0.00597



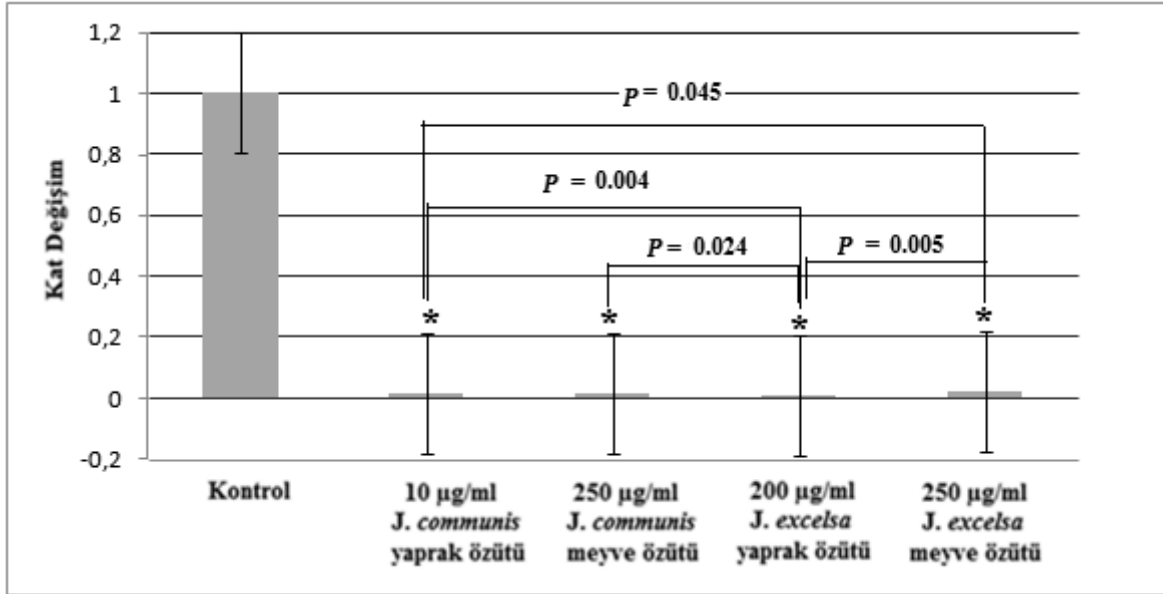
Şekil-27 *Juniperus L.* yaprak ve meyve özütlerinin DU145 hücre hattında 72 saatlik uygulama sonrasında yol açtığı *MMP-2* gen ekspresyonundaki değişimlerin karşılaştırılması. Kontrol: muamelesiz hücre hattı, \*\* kontrole göre  $p < 0.01$



Şekil-28 *Juniperus L.* yaprak ve meyve özütlerinin DU145 hücre hattında 72 saatlik uygulama sonrasında yol açtığı *MMP-9* gen ekspresyonundaki değişimlerin karşılaştırılması. Kontrol: muamelesiz hücre hattı, \* kontrole göre  $p < 0.05$



**Şekil-29** *Juniperus* L. yaprak ve meyve özütlerinin PC-3 hücre hattında 72 saatlik uygulama sonrasında yol açtığı *MMP-2* gen ekspresyonundaki değişimlerin karşılaştırılması. Kontrol: muamelesiz hücre hattı, \*\* kontrole göre  $p < 0.01$



**Şekil-30** *Juniperus* L. yaprak ve meyve özütlerinin PC-3 hücre hattında 72 saatlik uygulama sonrasında yol açtığı *MMP-9* gen ekspresyonundaki değişimlerin karşılaştırılması. Kontrol: muamelesiz hücre hattı, \* kontrole göre  $p < 0.05$



#### 4.4. *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. ve *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* Türlerinin Yaprak ve Meyvelerinden Hazırlanan Özütlerin Fenolik İçeriklerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Analizi

Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Saliha Şahin tarafından gerçekleştirilen analizde, özütlerin fenolik içeriklerinin HPLC-DAD cihazında belirlenebilmesi için her bir fenolik bileşiğe ait standartlar ile farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Özütlerin tümü (+)- kateşin, mirisetin, kuercetin, kaempferol, vanilik asit, rosmarinik asit, 2-hidroksibenzoik asit, ellajik asit, p-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, protokatekuik asit, kafeik asit, epikateşin, luteolin, siyanidin, şiringik asit, izokuercitrin, malvidin, hesperidin, resveratrol, apigenin, pelargonidin, naringin, genistein, delphinidin, karvakrol, epigallokateşin, gallik asit, klorojenik asit, rutin, ferulik asit, t-cinnamik asit ve kaempferol-3-glikozit olmak üzere toplam 33 farklı fenolik için analiz edilmiş olup özütlerde gallik asit, t- cinnamik asit, klorojenik asit, ferulik asit, kamferol-3-glikozit ve rutin olmak üzere 6 farklı fenolik bileşik saptanmıştır. Saptanan fenolik bileşikler için hazırlanan standart çözelti konsantrasyonları, konsantrasyona karşılık gelen kalibrasyon grafiklerine ait doğru denklemleri ve regresyon katsayıları ile ilgili fenolik bileşiklerin saptandığı dalgaboyları Tablo-26'da gösterilmiştir.

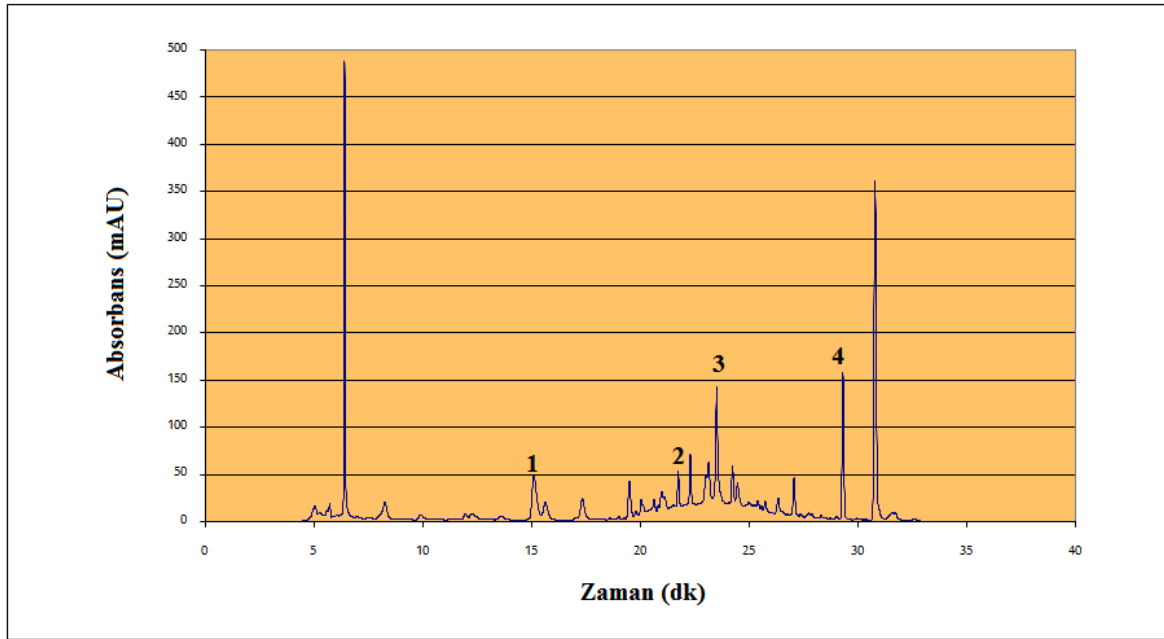
**Tablo-26** Standart fenolik maddeler için HPLC-DAD kalibrasyon grafikleri

Fenolik Bileşik	Hazırlanan standart çözelti konsantrasyonları (mg/l)	Kalibrasyon grafiği	Regresyon katsayısı	Dalgaboyu (nm)
Gallik asit	20, 30, 40	$y = 55.49x - 159.5$	0,999	280
t- cinnamik asit	2, 4, 6, 8, 10	$y = 413,9x - 212,0$	0,992	280
Klorojenik asit	5, 20, 50, 100, 250	$y = 8,458x - 44,15$	0,994	320
Ferulik asit	0.5, 2.5, 5, 10, 15, 20	$y = 27,00x + 140,7$	0,992	320
Kaempferol-3-glikozit	5, 8, 10, 15, 20	$y = 7,648x - 18,58$	0,994	360
Rutin	2, 5, 10, 20, 30	$y = 49,08x - 30,24$	0,999	360

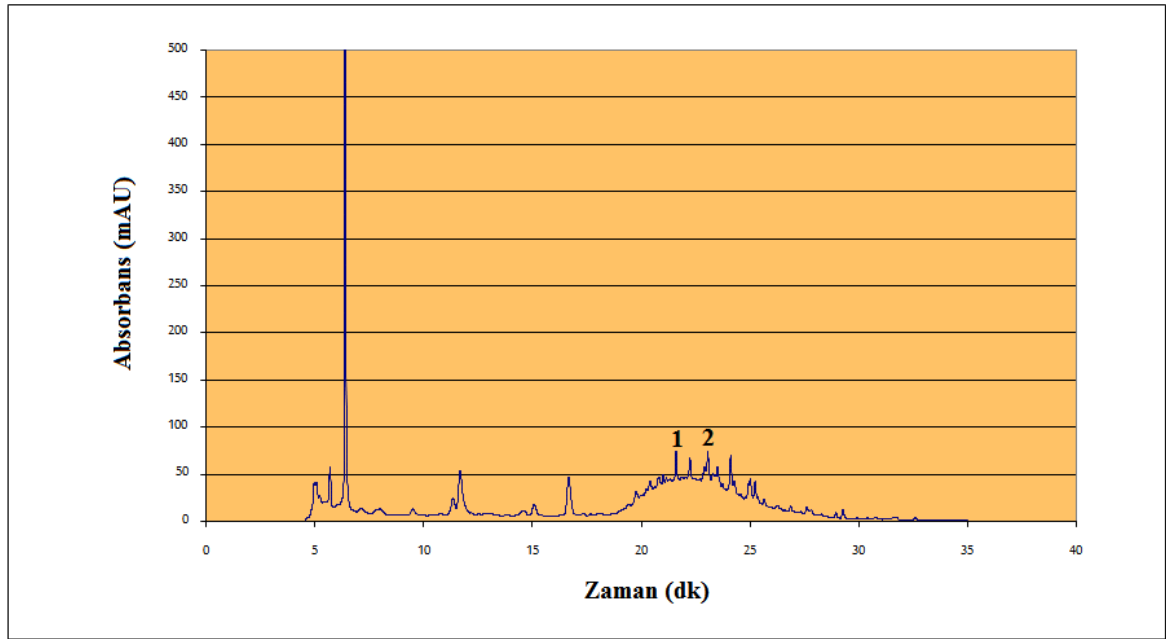
Fenolik bileşiklerin saptandığı özüte göre gram örnek başına miktarları Tablo-27'de; özütlerin kromatogram görüntüleri ise Şekil-31, -32, -33 ve -34'de gösterilmiştir.

**Tablo-27** *Juniperus L.* özütlerinde saptanan fenolik bileşikler ve miktarları

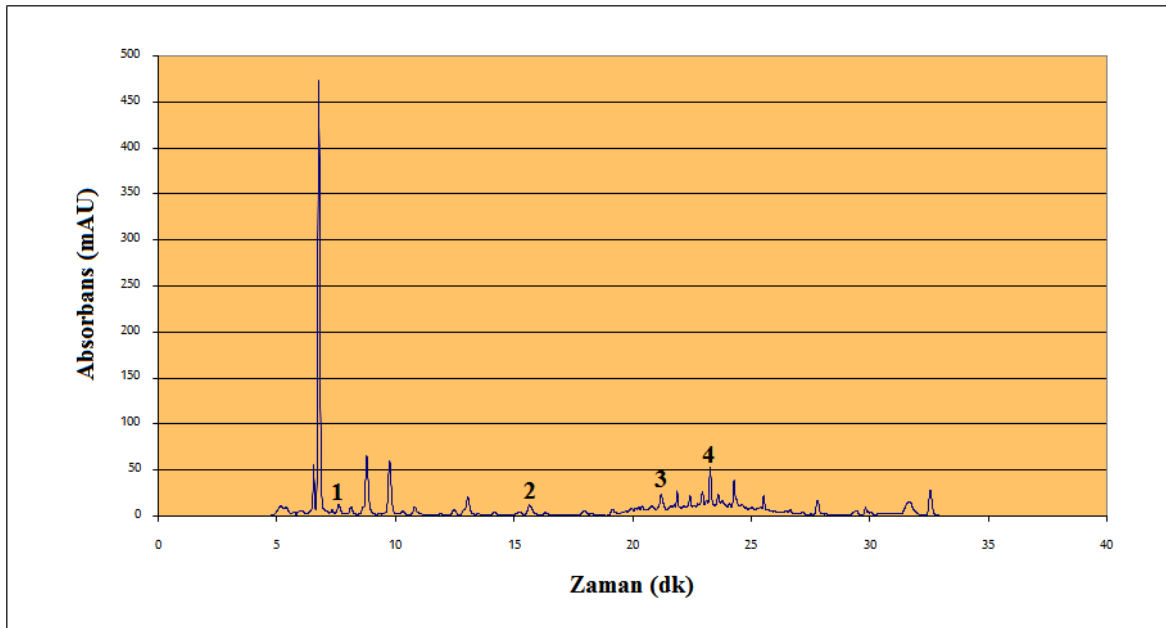
Özüt	Fenolik Bileşik	Miktar ( $\mu\text{g/g}$ örnek)
<i>J. communis L. var. saxatilis</i> Pall. yaprak özütü	Klorojenik asit	1322,9
	t- cinnamik asit	28,3
	Rutin	119,9
	Ferulik asit	127,9
<i>J. communis L. var. saxatilis</i> Pall. meyve özütü	Ferulik asit	169,7
	Kaempferol-3-glikozit	350,5
<i>J. excelsa M. Bieb. subsp.</i> <i>excelsa</i> yaprak özütü	Gallik asit	562
	Klorojenik asit	320,8
	Rutin	31
	Ferulik asit	22,7
<i>J. excelsa M. Bieb. subsp.</i> <i>excelsa</i> meyve özütü	Klorojenik asit	103,5
	Ferulik asit	97



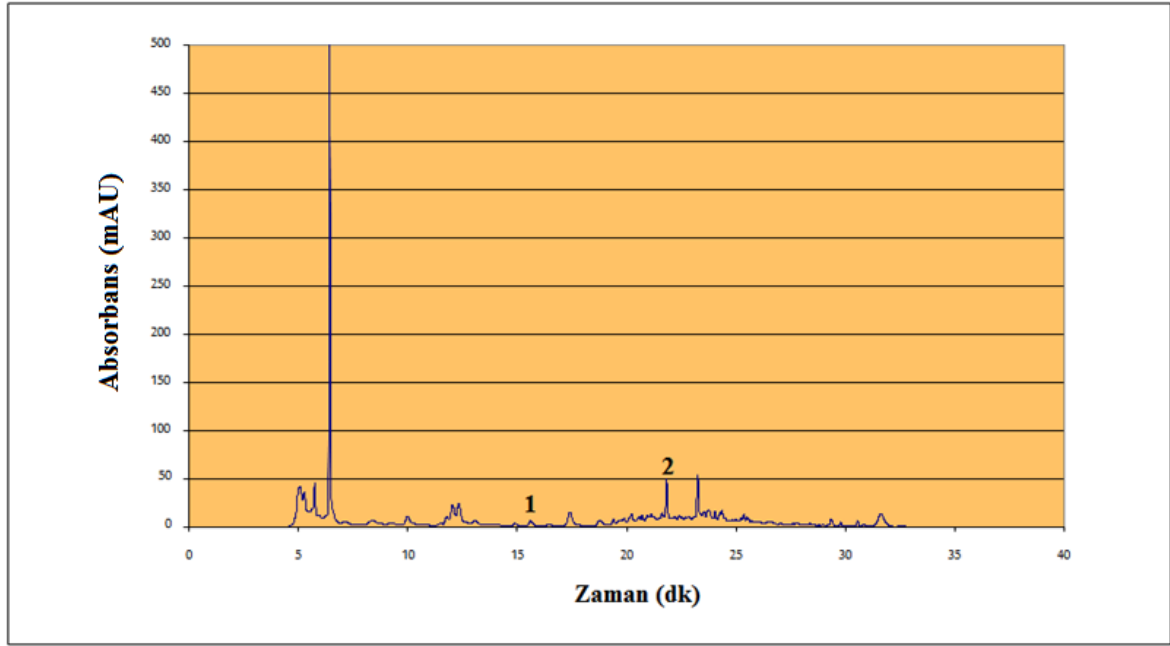
**Şekil-31** *J. communis L. var. saxatilis* Pall. yaprak özütünde saptanan fenolik bileşiklerin kromatogram görüntüsü 1) klorojenik asit 2) rutin 3) ferulik asit 4) t-cinnamik asit



Şekil-32 *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. meyve özütünde saptanan fenolik bileşiklerin kromatogram görüntüsü 1) kamferol-3-glikozit 2) ferulik asit



Şekil-33 *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* yaprak özütünde saptanan fenolik bileşiklerin kromatogram görüntüsü 1) gallik asit 2) klorojenik asit 3) rutin 4) ferulik asit



**Şekil-34** *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* meyve özütünde saptanan fenolik bileşiklerin kromatogram görüntüsü 1) klorojenik asit 2) ferulik asit

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Gelişmiş ülkelerde en sık rastlanan solid doku kanseri olan prostat kanseri erkek bireylerin yaşamını tehdit eden ciddi bir sağlık problemidir (1). Oldukça heterojen formda ortaya çıkabilen bu hastalığın tümör hücrelerinin prostat bezi ile sınırlı olduğu lokalize tipinde radikal prostatektomi ve/veya radyoterapi yeterli olurken lokal ileri (metastatik) prostat kanserinde mevcut tedaviler küratif seçenek oluşturmamaktadır. Günümüzde hastalığın bu formunun tedavisinde altın standart olarak cerrahi yolla ya da kimyasal ajanlar ile vücutta androjen üretimini veya androjen reseptör sinyalizasyonunu baskılamayı hedefleyen androjen ablasyon terapi kullanılmaktadır (3). Anti-androjenik ya da endokrin terapi olarak isimlendirilen bu tedavi, başlangıçta kanserli bölge hacminin küçülmesinde ve PSA düzeyinin düşmesinde oldukça etkili sonuçlar verse de lokal ileri prostat kanserli hastaların çok büyük bir kısmında değişen sürelerde mevcut tedaviye direnç gelişmekte ve rekürrens ile karşılaşılmaktadır (43). Edinilmiş direnç ile ortaya çıkan, klinikte hormon terapi direnci (kastrasyon yaklaşımlarına direnç) olarak tanımlanan ve moleküler temelleri henüz aydınlatılmayan kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK), prostat kanserinin ölümcül formudur. KDPK tedavisinde günümüz tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır (48). Prostat kanseri ilişkili ölümler, büyük oranda metastaz ve kastrasyona direnç kaynaklıdır (2). Günümüzde KDPK'lı hastalarda hormon terapinin yanında KDPK tedavisinde kullanımı uygun bulunan kemoterapi ilaçları ile yaşam süresi ortalama 5-8 aydır (4). Mevcut tedavi yöntemlerine katkı sağlayabilmesi ya da daha etkin tedavi seçeneklerinin oluşturulabilmesi açısından morbidite ve mortalite oranı yüksek olan KDPK tedavisinde kullanılmak üzere yeni terapötik aday moleküllere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılan mevcut kemoterapötik ajanların büyük bir bölümü bitkisel kökenlidir. Kamptotesin ve yarı sentetik türevi olan irinotekan alkaloid bileşikler grubuna, paklitaksel ile KDPK'nın mevcut tedavisinde kullanılan dosetaksel ve kabazitaksel taksan grubuna, etoposid ve teniposid podofilotoksin grubuna, daha yeni bileşik olarak resveratrol flavonoid grubuna dahil mevcut bitkisel kemoterapi ajanlarından (125). Günümüzde kanser tedavisinde mevcut kemoterapi ajanları ile uzun süreli etkin sonuçlar alınmaması çok çeşitli biyoaktif bileşiklerin zengin kaynakları olarak bitkilere olan ilginin daha da artmasına yol açmıştır. Farklı farmakolojik özelliklere ve medikal değere sahip bileşiklerin zengin bir kaynağı olarak *Juniperus* L. türleri de bu anlamda ilgi çeken bitkiler arasında yer almaktadır. Antiinflamatuar, antimikrobiyal, antioksidatif, antiseptik ve analjezik etkileri ile geleneksel tıpta kullanımları oldukça

yaygın olan *Juniperus* L. türlerine ait özütlerin antitümöral etkilerine yönelik bulgular son yıllarda artış göstermiştir (162-168). Yapılan çalışmalarda farklı *Juniperus* L. türlerinden elde edilen özütlerin pek çok kanser türünde sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiş olmasına rağmen prostat kanseri hücre hatlarında olası etki henüz değerlendirilmemiş ve mevcut çalışmaların büyük bir bölümünde hücre ölümüne ve antitümöral etkilere yönelik ileri analizler gerçekleştirilmemiştir. Mevcut tez çalışması kapsamında Türkiye florasında doğal olarak yetişen iki farklı *Juniperus* L. türüne ait yaprak ve meyvelerden elde edilen sulu özütlerin endokrin terapi dirençli iki farklı KDPK hücre hattı ve bir normal hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri, sitotoksitenin hangi hücre ölüm tipi ile uyarıldığı ve invazyonda görevli önemli genler olan *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyonlarında herhangi bir değişime yol açıp açmadığı araştırılarak değerlendirilmiştir.

Mevcut tez çalışması kapsamında ilk gerçekleştirilen WST-1 analizinde *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall ve *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türlerine ait yaprak ve meyve özütlerinin DU145 ve PC-3 KDPK hücre hatlarında zamana ve doza bağlı ölüme yol açtığı saptanmıştır. Her iki hücre hattında özütlerin maksimum sitotoksik etki gösterdiği zaman dilimi 72 saat olarak belirlenmiştir. *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall meyve özütünde 72 saatte hücre canlılığındaki inhibisyon oranı %50'yi geçmediği için hiçbir özütün IC<sub>50</sub> dozu hesaplanmamış; her bir özüt için en etkin doz, 72 saatte maksimum sitotoksik etki belirlenen doz olarak tanımlanmıştır. Elde edilen bulgular, aynı tür içinde yaprak özütlerinin, türler arası değerlendirme yapıldığında ise *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türünün daha sitotoksik olduğunu göstermektedir. 72 saatlik zaman diliminde 4 özüt için belirlenen maksimum sitotoksik dozların, *J. communis* yaprak özütü için 10 µg/ml olduğu ve DU145 hücre hattında %52,25; PC-3 hücre hattında %59,8; HUVEC hücre hattında %18,52 oranında hücre ölümüne yol açtığı; *J. communis* meyve özütü için 250µg/ml olduğu ve DU145 hücre hattında %41,75; PC-3 hücre hattında %46,36; HUVEC hücre hattında %21,25 oranında hücre ölümüne yol açtığı; *J. excelsa* yaprak özütü için 200 µg/ml olduğu ve DU145 hücre hattında %67,85; PC-3 hücre hattında %70,76; HUVEC hücre hattında %27,91 oranında hücre ölümüne yol açtığı; *J. excelsa* meyve özütü için 250 µg/ml olduğu ve DU145 hücre hattında %52,32; PC-3 hücre hattında %55,52; HUVEC hücre hattında %20,31 oranında hücre ölümüne yol açtığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 4 farklı özüt için kanser hücre hatlarında saptanan hücre canlılığındaki inhibisyon oranı, normal hücre hattındaki inhibisyon oranından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ).

WST-1 analizinde belirlenen 4 farklı *Juniperus* özütüne ait en etkin dozların sitotoksik etkisinin zamana bağlı arttığı, DU145 hücre hattında Hoechst-PI floresan boyama yöntemi kullanılarak 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde gerçekleştirilen hücre ölümünün morfolojik analizi ile doğrulanmıştır. İlk 24 saatlik preparatlarda hücre ölümü morfolojik olarak net şekilde belirlenemese de yalnızca yaprak özütlerinde az oranda geç apoptotik morfolojiye rastlanmıştır. 48 saatlik tüm özüt uygulamalarında, 24 saatlik uygulamalara göre belirgin artış gösteren apoptotik morfoloji net olarak ayırt edilmiş olup, ilgili zaman dilimindeki hücre ölümü erken apoptoz ve nekroz olarak belirlenmiştir. Özütlerin 72 saatlik uygulamalarında ise tüm preparatlarda geç apoptotik ve nekrotik morfolojideki artışa paralel hücrelerin normal morfolojilerinden oldukça uzaklaştığı görülmüştür. Morfolojik analiz sonuçlarımız, özütlerin doz etkinliği zamana bağlı artış gösterdiği için WST-1 analiz sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Kanser hücrelerinde ve normal hücre hattında en etkin dozlar ile 72 saatlik en etkin zaman diliminde uyarılan hücre ölüm tipinin belirlenmesi için gerçekleştirilen Annexin V analizine göre ise 10 µg/ml *J. communis* yaprak özütünün DU145 hücrelerinde %26,8 apoptotik, %5,45 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %33,5 apoptotik, %3,10 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %8,65 apoptotik, %4,55 nekrotik ölüme ve aynı türe ait 250 µg/ml meyve özütünün DU145 hücrelerinde %21,8 apoptotik, %4,30 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %28,85 apoptotik, %1,95 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %8,05 apoptotik, %3,55 nekrotik ölüme yol açtığı saptanmıştır. Aynı inkübasyon süresinde 200 µg/ml *J. excelsa* yaprak özütünün ise DU145 hücrelerinde %43,15 apoptotik, %4,70 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %35,7 apoptotik, %21,90 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %18,95 apoptotik, %5,60 nekrotik ölüme ve aynı türe ait 250 µg/ml meyve özütünün DU145 hücrelerinde %36,05 apoptotik, %3,90 nekrotik; PC-3 hücrelerinde %40,1 apoptotik, %7,25 nekrotik; HUVEC hücrelerinde %17,05 apoptotik, %6,15 nekrotik ölüme yol açtığı belirlenmiştir. Mevcut analiz sonuçlarımıza göre, kanser hücre hatlarında yüksek oranda uyarılan hücre ölüm tipi apoptoz olarak belirlenmiştir. Annexin V analizinin histogram sonuçları, morfolojik analiz bulgularımız ile uyumlu olarak 72 saatte geç apoptoza ve nekroza işaret etmektedir. Ayrıca WST-1 analizini destekler nitelikte yaprak özütlerinin daha sitotoksik olduğunu ve HUVEC normal hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkinin tüm özütlerde kanser hücrelerindeki etkiye göre çok daha düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Ek olarak bu analiz ile en güçlü sitotoksik etkiye sahip özütün *J. excelsa* yaprak özütü ve en az sitotoksik etkiye sahip özütün ise *J. communis* meyve özütü olduğu da doğrulanmıştır.

Literatürde aynı *Juniperus* L. türlerinin kanser hücrelerinde sitotoksik etkisinin değerlendirildiği birkaç çalışma mevcuttur. Benzina ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen oldukça yeni bir çalışmada 12 farklı bitki türünden hazırlanan metanol özütlerinin MB231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmış olup, *J. communis* dal ve yaprak özütü 10 µg/ml dozda 1, 3 ve 5 gün periyotlarında hücre canlılığında anlamlı inhibisyona yol açarak ilgili özütler içerisinde en güçlü sitotoksik etkiye sahip özüt olarak belirlenmiştir (168). Mevcut çalışma sitotoksik etkisi belirlenen *J. communis* özütünün içeriği hakkında veri bulundurma da maksimum sitotoksik etki belirlediğimiz dozun aynı özüt için aynı konsantrasyonda olması yönünden bulgularımızı destekler niteliktedir. Ek olarak bu çalışmada sitotoksik etkisi belirlenen *J. communis* yaprak özütünün MB231 kanser ve MCF10A normal meme hücrelerinde apoptotik etkileri değerlendirilmiş, 3 zaman periyodunda özüt muamelesi sonrasında kaspas3/7 aktivitesinin malign hücrelerde anlamlı düzeyde artarken normal hücrelerde bazal seviyede olduğu bulunmuştur. Mevcut bulgu, 10 µg/ml *J. communis* yaprak özütünün 72 saatte DU145 kanser hücrelerinde %26,8 apoptotik, %5,45 nekrotik; PC-3 kanser hücrelerinde %33,5 apoptotik, %3,10 nekrotik; HUVEC normal hücrelerinde %8,65 apoptotik, %4,55 nekrotik ölüme yol açtığını saptadığımız bulgumuz ile uyumludur. Benzer şekilde Shokrzadeh ve arkadaşları *J. sabina* hidroalkolik özütünün sitotoksik etkisini cisplatine göre karşılaştırdıkları çalışmalarında HepG2 ve SKOV3 kanser, CHO (insan normal over hücresi) ve fare fibroblast normal hücre hatlarında 72 saatlik kolonjenik analiz sonuçlarına göre saptadıkları IC<sub>50</sub> dozunda etkinin CHO < Fibroblast < HepG2 < SKOV3 şeklinde olduğunu bulmuşlardır (179).

Slambrouck ve arkadaşları *J. communis* sulu meyve özütünün MCF-7/AZ meme kanseri hücre hattındaki sitotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 96 saatlik özüt muamelesi boyunca 50 µg/ml dozda %30 oranında olmak üzere 50- 180 µg/ml aralığındaki tüm dozlarda hücre canlılığında artan oranlarda anlamlı inhibisyon saptamışlardır (163). Mevcut çalışmamızda *J. communis* sulu meyve özütünü daha yüksek dozda uygulamamıza rağmen hücre canlılığındaki inhibisyon oranı iki hücre hattında da %50'yi geçmemiş, %30 inhibisyon ise 100 µg/ml'nin üzerinde saptanmıştır. İki çalışmada aynı türe ait meyvelerden hazırlanan sulu özütler kullanılmasına rağmen toplanan *J. communis* meyve olgunluklarının, özüt hazırlamada sürecinde kullanılan kuru bitki materyali ağırlığının ve materyalin su ile ekstraksiyon süresinin farklı olması gibi nedenlerin bu farklılığa yol açmış olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca literatürde endokrin terapi direnci yüksek



KDPK hücre hatlarında kemoterapi direncinde de artış olduğu bildirilmiştir. Bu durum, mevcut farklılığın iki çalışmada kullanılan hücre hatlarındaki terapi direncinin farklı olmasından kaynaklanan bir sonuç olduğunu da düşündürmektedir. Ek olarak Slambrouck ve arkadaşlarının çalışmalarında kullanılan *J. communis* özütünün içerik analizlerinin gerçekleştirilmemiş olması iki farklı sonucun olası nedenlerini değerlendirmek açısından da sınır oluşturmaktadır.

*J. excelsa* subsp. *excelsa* türünün de yer aldığı iki *J. excelsa* alt türüne ait yaprak ve meyvelerinden elde edilen hidroalkolik özütlerin HeLa, KB, MDA-MB-468 hücre hatlarında 72 saatlik sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sitotoksik etkinin hücre hattına bağlı olarak farklı dozlarda tespit edildiği belirtilmiş ve *J. excelsa* subsp. *excelsa* türüne ait özütlerin 20 µg/ml'den yüksek dozlarda daha sitotoksik oldukları belirlenmiştir (166). Nitekim, Azar ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada *J. excelsa* yapraklarından hazırlanmış hidroalkolik özütlerin HepG2 karaciğer kanseri hücre hattında IC<sub>50</sub> dozu 48 saatte 540 µg/ml olarak belirlenmiştir (167). Özüt hazırlama aşamasında hidroalkolik ekstraksiyon işlemi kullanmamış olsak da DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında 72 saatte 200 ve 250 µg/ml dozlar ile hücre canlılığında maksimum inhibisyon elde ettiğimiz sonuçlarımız, *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* özütlerinin yüksek dozlarda sitotoksik etki gösterdiğini doğrulamaktadır. Farklı dozlarda saptadığımız sitotoksik etkinin kullanılan hücre hatlarından ve özüt hazırlama işleminde kullandığımız kuru bitki materyal ağırlığı ve çözücü farkından kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz.

*Juniperus* L. türleri fenolik bileşikler, flavonoidler, esansiyel yağlar, lignanlar ve terpenoidler yönünden çok zengin bitkilerdir. *Juniperus* L. türlerine ait yaprak, dal ya da meyvelerin farklı tipte ve sayıda çözücüler ile fraksiyonlamalarından farklı bileşikler izole edilmekte ve tanımlanan yeni bileşiklerin anti-tümöral etkileri güncel çalışmalar ile analiz edilmektedir. Hekzan ve diklorometan kullanılarak hazırlanan *Juniperus* L. özütlerinden izole edilmiş deokspodofilotoksin molekülünün güçlü bir apoptoz uyarıcısı olduğu bilinmektedir (168) ancak Muto ve arkadaşları *J. taxifolia* kloroform özütünden izole ettikleri yeni molekül olan 7- $\alpha$ -hidroksisandaropimarik asitin aynı sürede daha az dozda, deokspodofilotoksin molekülünden daha güçlü bir apoptoz uyarıcısı olduğunu bildirmişlerdir (161). Benzer şekilde Moujir ve arkadaşları *J. brevifolia* yaprağının hekzan, aseton ve etanol ile hazırlanan fraksiyonlarından elde ettikleri ve yeni spiro bileşik olarak tanımladıkları 18- hidroksidehidroabietan molekülünün HeLa hücre canlılığında 48 saatte

düşük dozda anlamlı inhibisyona yol açtığını (164), Marino ve arkadaşları ise *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* meyvelerinden metanol ve butanol kullanarak gerçekleştirdikleri fraksiyonlama sonucunda elde ettikleri yeni monoterpen glukozid molekülünün üç farklı kanser hücre hattı üzerinde hücre canlılığında anlamlı inhibisyona neden olduğunu ve vasküler endotelial büyüme faktörü düzeyinde azalmaya yol açtığını bulmuşlardır (12). Güçlü çözücüler kullanılarak hazırlanan *Juniperus* L. özütleri dışında su, etanol, metanol ya da su ve alkol karışımı (hidroalkolik) kullanılarak hazırlanan *Juniperus* L. özütlerinin fenolik asitler yönünden zengin fraksiyonlara sahip olduğu ve bu çözücüler ile hazırlanan *Juniperus* L. özütlerinin antitümöral etkilerinin fenolik fraksiyonlardan kaynaklandığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (14, 15, 162).

Fenolik bileşikler, kapalı halka yapısında polihidroksil grubu taşıyan, kanser dahil olmak üzere çok çeşitli hastalık grubunda eşsiz farmakolojik özellikleri nedeniyle güncel çalışmalarda yoğun ilgi çeken ve yaklaşık 8000 üyesi olduğu tahmin edilen bitkisel fitokimyasal bileşik grubudur (180). Yapısal farklılıklara bağlı olarak fenolik bileşikler dört ana gruba ayrılmasına rağmen ilk iki grupta yer alan tek halka yapısına sahip fenolik asitler ve çift halka yapısına sahip flavonoidler tüm fenolik bileşiklerin sırasıyla %30 ve %60'ını oluşturmaktadır (181, 182). Mevcut tez çalışmasında da iki farklı *Juniperus* L. türüne ait yaprak ve meyvelerin sulu özütleri hazırlandığı için özütlerde bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD analizi ile karakterize edilmiştir. Çalışmamızda tüm özütler (+)-kateşin, mirisetin, kuercetin, kaempferol, vanilik asit, rosmarinik asit, 2-hidroksibenzoik asit, ellajik asit, p- hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, protokatekuik asit, kafeik asit, epikateşin, luteolin, siyanidin, şiringik asit, izokuercitrin, malvidin, hesperidin, resveratrol, apigenin, pelargonidin, naringin, genistein, delphinidin, karvakrol, epigallokateşin, gallik asit, klorojenik asit, rutin, ferulik asit, t-cinnamik asit ve kaempferol-3-glikozit olmak üzere 33 farklı fenolik bileşik için analiz edilmiş olup özütlerde 4'ü fenolik asit ve 2'si flavonoid grubuna dahil olmak üzere farklı miktarlarda toplam 6 farklı fenolik bileşik saptanmıştır. Özütlerdeki fenolik bileşikler miktarlarına göre *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. yaprak özütü için klorojenik asit (1322,9 µg/g) > ferulik asit (127,9 µg/g) > rutin (119,9 µg/g) > t-cinnamik asit (28,3 µg/g); *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. meyve özütü için kaempferol-3-glikozit (350,5 µg/g) > ferulik asit (169,7 µg/g); *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* yaprak özütü için gallik asit (562 µg/g) > klorojenik asit (320,8 µg/g) > rutin (31 µg/g) > ferulik asit (22,7 µg/g) ve *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* meyve özütü için klorojenik asit (103,5 µg/g) > ferulik asit (97 µg/g) şeklinde saptanmıştır.

Literatürde alkol ya da su ile hazırlanan aynı *Juniperus L.* özütlerinin fenolik içeriklerine dair herhangi bir veri bulunmasa da 3 çalışmada farklı *Juniperus L.* türlerinin alkol ya da alkol ve su ile hazırlanmış özütlerinin antitümöral etkileri ve fenolik içerikleri yönünden bulgular yer almaktadır. Tavares ve arkadaşları Portekiz'de yetişen 4 farklı *Juniperus L.* türüne (*J. navicularis*, *J. oxycedrus*, *J. phoenicea* ve *J. turbinata*) ait su ve etanol kullanarak hazırladıkları yaprak özütlerinden izole ettikleri fenolik fraksiyonların nöroblastom hücreleri üzerinde 24 saatte 100 µg/ml düşük dozda hücre canlılığında anlamlı inhibisyona yol açtığını bulmuşlardır (15). Bu çalışmada saptanan 22 fenolik bileşikten hiçbirinin çalışmamızda saptanamamasını iki çalışmada kullanılan *Juniperus L.* türlerinin farklı bölgelerde yetişen türler olmasıyla ve ilgili çalışmada yapılan içerik validasyonunda fenolik bileşiklere ait piklerden yalnızca major piklerin karakterize edilmiş olması ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Miceli ve arkadaşlarının çalışmasında *J. drupacea* meyvesine ait metanol özütünün HepG2 hücre hattında IC<sub>50</sub> dozu 24 saat için 10 µg/ml olarak belirlenmiş olup özütte HPLC-DAD analizi ile 14 farklı fenolik bileşik saptanmıştır (162). Bu çalışma ile çalışmamızda saptadığımız ortak fenolik bileşikler klorojenik asit, rutin ve gallik asittir. Taviano ve arkadaşları *J. oxycedrus* türüne ait meyvelerinin metanol özütünü kullandıkları çalışmalarında ise biri ortak olarak saptadığımız rutin olmak üzere 7 farklı fenolik bileşik tespit etmiş olsalar da bu çalışmada HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saatte sitotoksik etki belirleyemediklerini ve bu sonucu düşük fenolik içerik ile ilişkilendirdiklerini bildirmişlerdir (14). Mevcut üç çalışmada saptanan fenolik bileşiklerin sayısı ve miktarca çalışmamızda saptadığımız fenolik bileşiklerden fazla olmasının, özüt hazırlama sürecinde yalnızca su kullanmış olmamız ile ilgili bir sonuç olabileceği kanısındayız. Fenolik bileşiklerin alkol çözünlüklerinin su çözünlüklerinden çok daha yüksek olması ve çalışmalarda *Juniperus L.* türlerinin alkol ile hazırlanmış özütlerinde sitotoksik etkinin daha erken sürede ve daha düşük dozda saptanması da bu sonucu destekler niteliktedir. Yine de iki farklı *Juniperus L.* türüne ait yaprak ve meyve sulu özütleri ile prostat kanseri hücre hatlarında 72 saatte belirlediğimiz sitotoksik etkinin yaprak özütlerinde daha güçlü olması, kullandığımız özütlerin fenolik bileşik profilleri ile uyumludur. Yaprak sulu özütlerinde belirlediğimiz fenolik bileşikler sayısı ve miktar bakımından meyve özütlerine göre daha fazladır. Ek olarak *J. communis L. var. saxatilis* Pall. yaprak özütündeki fenolik bileşiklerin diğer türe ait yaprak özütünde saptanan fenolik bileşiklerden miktar olarak daha fazla olması bu özütteki sitotoksik etkinin daha düşük dozda saptandığı ile uyumlu bir bulgudur.

Çalışmamızda saptadığımız fenolik bileşikler, mevcut çalışmalarda saptanan fenolik bileşiklerden sayı bakımından az olsa da miktar bakımından belirgin bir fark söz konusu değildir. Aksine Lesjak ve arkadaşlarının (183) *J. foetidissima* türüne ait yaprak ve meyvelerden su ve metanol özütü hazırladıkları çalışmalarında saptadıkları toplam 25 fenolik bileşik içerisinde saptadığımız 6 fenolik bileşiğin tümü bulunmasına rağmen *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* yaprak özütünde saptadığımız gallik asit miktarı *J. foetidissima* türünün yaprak özütünde saptanan gallik asit miktarından 2 kat; *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. yaprak ve meyve özütünde saptadığımız ferulik asit miktarı ise *J. foetidissima* türünün yaprak özütünde saptanan ferulik asit miktarından yaklaşık 1,5 kat fazladır. Çalışmamızda tüm özütlerde saptadığımız ferulik asit, *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* türüne ait yaprak ve meyve özütlerinde ise daha düşük miktarda saptanmıştır. Klorojenik asit, *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall. meyve özütü dışında çalışmamızdaki tüm özütlerde ortak olarak saptadığımız ikinci fenolik bileşiktir. Özellikle yaprak özütlerinde saptadığımız klorojenik asitin miktarı ise mevcut çalışmada saptanan miktardan yaklaşık 4 kat fazladır. Bu çalışmada *J. foetidissima* türünde saptanan rutin miktarı oldukça fazla olmasına rağmen belirlenen kaempferol-3-glikozit miktarlarında belirgin bir fark yoktur. *J. foetidissima* özütlerinde cinnamik asit ise belirlenememiştir. İlgili çalışmada hazırlanan özütlerin olası antitümöral etkilerine ait herhangi bir veri bulunmamaktadır (183).

Sitotoksik etkisini değerlendirdiğimiz *Juniperus* L. özütlerinde flavonoid yapıdaki kuersetin ve apigenin bileşiklerini analiz etmiş olmamıza rağmen saptamamış olsak da mevcut çalışmamızda analiz edebildiğimiz 33 farklı fenolik bileşik dışında kalan ve tarayamadığımız flavonoidlerden özellikle flavon grubuna dahil cupressoflavone, biflavone, metilbiflavone ve hinokiflavone moleküllerinin de meyve özütlerinde bulunabileceğini düşünüyoruz. Nitekim 72 saatlik Annexin V analizinden elde ettiğimiz veriler, *J. excelsa* meyve özütünün *J. communis* yaprak özütüne göre özellikle PC-3 hücre hattında daha güçlü apoptotik etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Her iki özütte klorojenik asit ve ferulik asit bulunması ve hatta *J. communis* yaprak özütünde her iki fenolik bileşiğin daha yüksek miktarda bulunuyor olması meyve özütünde olası flavonoid moleküllerin bulunma olasılığını güçlendirmektedir. Çünkü *J. communis* yaprak özütünde yüksek saptanan klorojenik asit ve ferulik asit miktarları özütün aynı sürede daha düşük dozda etkinliğini açıklarken, *J. excelsa* meyve özütünde aynı fenolik bileşiklerin az miktardaki varlığı güçlü apoptotik etkiyi açıklamakta tek başına yetersiz kalmaktadır.

Ayrıca çeşitli çalışmalarda (14, 162) *Juniperus* L. meyvelerine ait metanol özütlerinde saptandığı bildirilen bu flavonoid grubu bileşiklerden kuersetin ve apigeninin özütlerimizde taranmasına rağmen saptanmamış olması, özütlerin yalnızca sulu ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanmış olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde *Juniperus* L. türlerine ait özütlerin kanser hücreleri üzerindeki doz ve zaman bağımlı sitotoksik etkisinin kullanılan *Juniperus* L. türüne, özüt hazırlama sürecindeki kuru bitki ağırlığına, kullanılan çözücü türüne ve buna bağlı olarak fenolik bileşik içeriğine dayalı olarak değiştiği söylenebilir.

Kanser hücrelerinde invaziv süreçler ve metastaz çok basamaklı kompleks bir süreçtir. Bu süreçte kanser hücrelerinin primer tümör bölgesinden kan dolaşımına geçişi, uzak organa göçün başlaması, kan damarlarını kaplayan endotel hücrelere adhezyonu ve hedef bölgeye ulaştıklarında kan dolaşımından çıkıp ilgili dokuda yeniden koloni oluşturması basamakları birbirini takip etmektedir (91). Her bir basamakta hedef bölgede yeniden adhezyon sağlanmadan önce hücre migrasyonunun kolaylaştırılması için ekstrasellüler matriks (ECM) ve bazal membran yapılar gibi çevresel bariyerlerin spesifik proteolitik enzimler tarafından yıkımı gerekmektedir (98). Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve -9 (MMP-9) bu süreçlerde görev aldığı bilinen ve pek çok kanser tipinde invaziv özellikler ile ilişkili olarak yüksek düzeyde eksprese edilen matriks metalloproteinaz ailesinin iki önemli üyesidir (100). Tip IV kollajeni yıkma yeteneğine sahip bu proteinlerin kanser hücrelerinde invaziv süreçlerdeki önemli rolleri pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (122-124). Fonksiyonel öneme sahip olmalarından dolayı MMP-2 ve -9, kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni terapötik adayların geliştirilmesinde önemli hedeflerdir (100). Prostat kanserinde de kanser ilişkili ölümlerin tümünün metastaz kaynaklı olması yeni terapötik yaklaşımların hedefi olarak araştırmacıları ilgili genler ve protein ürünleri üzerine yoğunlaştırmıştır.

Mevcut çalışmada iki farklı *Juniperus* L. yaprak ve meyvelerine ait sulu özütlerin *MMP-2* ve *MMP-9* genlerinin ekspresyon düzeylerine olan etkisi RT-qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm özütlerin DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında 72 saatlik maksimum sitotoksik etki saptanan dozlarındaki uygulamaları sonrasında, özütlere bağlı olarak değişen farklı kat değişimleri ile (Tablo-22) *MMP-2* ve *MMP-9* genlerinin ekspresyon düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*MMP-2* ve *MMP-9* için sırasıyla  $p < 0.01$  ve  $p < 0.05$ ). Özüt uygulamaları sonrasında *MMP-9* geninde belirlediğimiz ekspresyon kat değişimleri istatistiksel anlamı daha düşük olmasına rağmen

*MMP-2* geninde belirlediğimiz kat değişimlerine göre daha fazladır. Bu durum, DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında endojen *MMP-9* ekspresyon düzeylerinin hücrelerin invaziv özelliklerine bağlı şekilde (PC-3 > DU145) daha yüksek olduğu bilgisi ile açıklanabilir (121). Literatürde *Juniperus* L. türlerine ait özütlerin kanser hücrelerinde *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyon düzeyleri ya da protein düzeyinde aktiviteleri üzerindeki etkilerini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır ancak özütlerde saptadığımız fenolik bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki antitümöral etkileri, ilgili genlerin ekspresyonu azaltmaları veya protein düzeyinde aktivitelerini baskılamaları yönünden farklı çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Bu nedenle gen ekspresyon düzeyinde elde ettiğimiz anlamlı verilerin özütlerin fenolik bileşik içerikleri ile ilişkili olabileceği görüşündeyiz. Elde ettiğimiz ekspresyon bulgularına göre her iki gende saptanan azalma yönündeki ekspresyon kat değişimlerinin yaprak özütü uygulamalarında meyve özütlerine göre daha fazla olması da bu görüşümüzü destekler niteliktedir.

DU145 hücre hattında 72 saatlik *J. communis* yaprak özütü uygulaması *MMP-2* ekspresyonunda *J. excelsa* meyve özütüne göre 1,54 kat ( $p=0.006$ ), *J. excelsa* yaprak özütü ise aynı türe ait meyve özütüne göre 1,37 kat ( $p=0.011$ ) anlamlı azalışa yol açmıştır. PC-3 hücre hattında ise benzer şekilde 72 saatlik *J. excelsa* yaprak özütü uygulamasının, *MMP-2* ekspresyonunda *J. communis* meyve özütü uygulamasına göre 1,18 kat ( $p=0.04$ ) ve *J. excelsa* meyve özütü uygulamasına göre ise 1,96 kat ( $p=0.016$ ) anlamlı azalışa yol açtığı belirlenmiştir (Şekil-27 ve Şekil-29).

Özüt muameleleri sonrasında *MMP-9* ekspresyon düzeyindeki değişimler incelendiğinde ise 72 saatlik *J. communis* yaprak özütü uygulaması DU145 hücre hattında, aynı türe ait meyve özütü uygulamasına göre 1,27 kat ( $p=0.015$ ), *J. excelsa* meyve özütü uygulamasına göre 1,53 kat ( $p=0.005$ ); *J. excelsa* yaprak özütü uygulaması ise aynı türe ait meyve özütü uygulamasına göre 2,48 kat ( $p=0.013$ ), *J. communis* meyve özütü uygulamasına göre 2,06 kat ( $p=0.003$ ) anlamlı azalışa yol açmıştır. PC-3 hücre hattında ise 72 saatlik *J. communis* yaprak özütü uygulaması *J. excelsa* meyve özütü uygulamasına göre 1,31 kat ( $p=0.045$ ); *J. excelsa* yaprak özütü uygulaması aynı türe ait meyve özütü uygulamasına göre 2,42 kat ( $p=0.005$ ), *J. communis* meyve özütü uygulamasına göre 1,92 kat ( $p=0.024$ ) anlamlı azalışa yol açmıştır. 72 saatlik özüt muamelesi sonrasında *MMP-9* ekspresyon düzeyindeki değişimler iki hücre hattında yaprak özütleri arasında da anlamlı bulunmuştur. *J. excelsa* yaprak özütü *J. communis* yaprak özütüne göre *MMP-9*

ekspresyonunda DU145 hücre hattında 1,62 kat ( $p=0.04$ ) ve PC-3 hücre hattında 1,84 kat ( $p=0.004$ ) anlamlı azalışa neden olmuştur (Şekil-28 ve Şekil-30).

Klorojenik asitin yaprak özütlerinde miktar bakımından fazla olmasının, her iki hücre hattında da 72 saatlik yaprak özütü uygulamaları sonrasında tespit ettiğimiz *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarındaki anlamlı azalma ile ilişkilendirilebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca tüm özütler içerisinde ilgili genlerin ekspresyon düzeylerinde en fazla azalmaya neden olduğu belirlenen *J. excelsa* yaprak özütünde klorojenik asitten daha bol miktarda gallik asit tespit edilmiş olması da prostat kanseri hücre hatlarında en güçlü sitotoksik etkiye sahip olan bu özütte iki molekülün sinerjistik etki gösteriyor olabileceğini akla getirmektedir. Nitekim Jin ve arkadaşları *E. alatus* bitkisi metanol özütünden izole ettikleri fenolik bileşiğin klorojenik asit olduğunu ve Hep3B karaciğer kanseri hücrelerinde *MMP-9* protein aktivitesi üzerinde güçlü inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir (184). Tseng ve arkadaşları içerisinde gallik asitin de bulunduğu *P. urinaria* L. özütünün A549 ve LCC akciğer kanseri hücre hatlarında invazyon yeteneğini anlamlı düzeyde azalttığını, RT-PCR ile *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarında anlamlı düzeyde ( $p<0.001$ ) azalma saptadıklarını ve bu özütün antimetastatik potansiyele sahip olabileceğini göstermişlerdir (185). Gallik asitin *MMP-2* ve *MMP-9* ekspresyonunda azalmaya yol açarak kanser hücrelerinde invazyon yeteneğini azaltabileceği *Bcr/Abl* eksprese eden insan lösemi hücrelerinde (186) ve SCC-4 insan oral kanser hücrelerinde (187) de gösterilmiştir. Mevcut bulgular cinnamik asit, klorojenik asit ve ferulik asit için A549 hücre hattında Tsai ve arkadaşlarının çalışmaları ile de desteklenmiştir (188). Yine özütlerimizde saptadığımız ferulik asitin hücre canlılığı inhibisyonundaki apoptotik etkisi prostat kanseri hücre hatlarında Eroğlu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada doğrulanmıştır (189). Ek olarak Li ve arkadaşları yeni bir çalışmada kaempferol molekülünün insan meme kanseri hücrelerinde *MMP-9* ekspresyonunu ve protein düzeyinde *MMP-9* aktivitesini baskıladığını bildirmişlerdir (190). Bu çalışma Lin ve arkadaşlarının kaempferolün SCC-4 hücre hattında *MMP-2* ekspresyonunu baskıladığı yönündeki bulgularını desteklemiştir (191). Santoz ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çok yeni bir çalışmada ise flavonoid grubundaki pek çok molekülün ekstrasellüler matriks metalloproteinazları düzenleme yolu ile etki gösterdikleri gen ekspresyonu ve protein aktivitesi analizleri ile gösterilmiştir (192). Elde ettiğimiz ekspresyon verileri, mevcut literatür bulguları ile uyumludur. Bu anlamda iki farklı KDPK hücre hattında sitotoksik etkisini belirlediğimiz *Juniperus* L. özütlerinin içerdikleri fenolik bileşikler sayesinde invazyondaki önemli rolleri

olduğu bilinen *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarını dzenleme yolu ile antitümöral etki gösteriyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Mevcut tez çalışması ile *Juniperus L.* türlerinden elde edilen özütlerin KDPK hücre hatlarında sitotoksik etkileri literatürde ilk kez değerlendirilmiştir. Yapılan analizler ile özütlerin seçici olarak kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi bulunduğu, DU145 ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde saptanan sitotoksitenin daha yüksek oranda geç apoptozu ve nekrozu uyurarak etkili olduğu ve ilgili hücre hatlarında özüt muamelesi sonrasında *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonlarında azalma olduğu gösterilmiştir. Bulgularımız doğrultusunda *Juniperus L.* özütlerinin kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni terapötik moleküllerin kaynağı olarak bundan sonra bu alanda gerçekleştirilecek araştırmalar için önemli olabileceğini ve ileri ilaç araştırmalarında *Juniperus L.* türlerinde bulunan küçük moleküllerin umut vaat eden bileşikler olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



## KAYNAKLAR

1. FERLAY J, SOERJOMATARAM I, ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available at <http://globocan.iarc.fr>, 2013.
2. BUBENDORF L, SCHOPFER A, WAGNER U, SAUTER G, MOCH H, WILLI N, GASSER TC, MIHATSCH MJ. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*, 31: 578-83, 2000.
3. MOTTET N, BELLMUNT J, BOLLA M, JONIAU S, MASON M, MATVEEV V, SCMID HP, VAN DER KWAST T, WIEGEL T, ZATTONI F, HEIDENREICH A. EAU Guidelines on prostate cancer. Part II. Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration Resistant prostate cancer. *European Urology*, 35: 565-579, 2011.
4. SARAON P, JARVI K, DIAMANDIS EP. Molecular Alterations during Progression of Prostate Cancer to Androgen Independence. *Clinical Chemistry*, 57 (10): 1366-1375, 2011.
5. BASCH E, LOBLAW DA, OLIVER TK, CARDUCCI M, CHEN RC, FRAME JN, GARRELS K, HOTTE S, KATTAN MW, RAGHAVAN D, SAAD F, TAPLIN ME, WALKER DILKS C, WILLIAMS J, WINQUIST E, BENNETT CL, WOOTTON T, RUMBLE RB, DUSETZINA SB, VIRGO KS. Systemic therapy in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: American Society of Clinical Oncology and Cancer Care Ontario clinical practice guideline. *J Clin Oncol*, 32 (30): 3436, 2014.
6. BROKER LE, GIACCONE G. The role of new agents in the treatment of non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 38 (18): 2347-2361, 2002.
7. LIANG HLM, XUE CCL, ZHOU DH, LI CG. Chinese herbal medicine for lung cancer: a critical literature review. *Chinese Journal of Integrated Medicine*, 9: 157-160, 2011.
8. YANG NS, SHYUR LF, CHEN CH, WANG SY, TZENG CM. Medicinal herb extract and a single-compound drug confer similar complex pharmacogenomic activities in MCF-7 cells. *Journal of Biomedical Science*, 11 (3): 418-422, 2004.
9. TEZCAN G, TUNCA B, BEKAR A, YALCIN M, SAHIN S, BUDAK F, CECENER G, EGELI U, DEMIR C, GUVENC G, YILMAZ G, ERKAN LG, MALYER H, TASKAPILIOGLU MO, EVRENSEL T, BILIR A. *Ficus carica* latex prevents invasion through induction of let-7d expression in GBM cell lines. *Cell Mol Neurobiol*, 35 (2): 175-187, 2015.

10. TEZCAN G, TUNCA B, BEKAR A, BUDAK F, SAHİN S, CECENER G, EGELİ U, TASKAPILIOGLU MO, KOCAELI H, TOLUNAY S, MALYER H, DEMİR C, TUMEN G. *Olea europaea* leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression. *Am J Cancer Res*, 4(5): 572-590, 2014.
11. KOÇ T. Bitkilerle sağlıklı yaşam. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Sayfa 102-104, 2002.
12. SIMONA DE MARINO A, CARMEN FESTA A, FRANCO ZOLLO A, FABİOLA RUSOLO B, FRANCESCA CAPONE B, ELIANA GUERRIERO B, SUSAN COSTANTINI B, VINCENZO DE FELICE C, MARIA IORIZZI C. Phytochemical profile of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* berries: A new monoterpene glucoside and evaluation of the effects on cancer cell lines. *Phytochemistry Letters*, 10: 152-159, 2014.
13. DE MARINO S, CATTANEO F, FESTA C, ZOLLO F, IACCIO A, AMMENDOLA R, INCOLLINGO F, IORIZZI M. Imbricatolic acid from *Juniperus communis* L. prevents cell cycle progression in CaLu-6 cells. *Planta Med*, 77 (16): 1822-1828, 2011.
14. TAVIANO MF, MARINO A, TROVATO A, BELLINGHIERI V, MELCHINI A, DUGO P, CACCIOLA F, DONATO P, MONDELLO L, GUVENC A, DE PASQUALE R, MICELI N. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29, 2013.
15. TAVARES L, MCDUGALL GJ, FORTALEZAS S, STEWART D, FERREIRA RB, SANTOS CN. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chemistry*, 135: 562-570, 2012.
16. ANAFARTA K. Ürogenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı. Editörler ANAFARTA K, BEDÜK Y, ARIKAN N, Temel Üroloji, 3. baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, sayfa 14, 2007.
17. PRESTI JR. Neoplasm of the prostate gland. Editors: TANAGHO EA, MCANINCH JW. 15th edition. The McGraw-Hill Companies, San Francisco, page 399-421, 2000.
18. CHRISTIAN N. Prostate Cancer: Causes, Symptoms and Treatments. *Medical News Today*. Available at <http://www.medicalnewstoday.com/articles/150086.php>. 2015.
19. SIGMAN M, JAROW JP. Male Infertility. *Campbell's Urology*. Editors: WALSH PC, RETIK AB, VAUGHAN ED. 8th edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Volume 2, page 1475, 2002.

20. SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A, Cancer Statistics 2013. *CA Cancer J Clin*, 63 (1): 11-30, 2013.
21. GÜLTEKİN M, BOZTAŞ G. Türkiye Kanser İstatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 43, 2014.
22. GANN PH. Risk factors for prostate cancer. *Reviews in Urology*, 4: 3-10, 2002.
23. REITER RE, DEKERNION JB. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. *Campbell's Urology*. Editors: WALSH PC, RETIK AB, VAUGHAN ED. 8th edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Volume 4, page 3003, 2002.
24. MAZARIS E, TSIOTRAS A. Molecular Pathways in Prostate Cancer. *Nephro Urol Mon*, 5: 792-800, 2013.
25. NAROD SA, DUPONT A, CUSAN L, DIAMOND P, GOMEZ JL, SUBURU R, LABRIE F. The impact of family history on early detection of prostate cancer. *Nat Med*, 1 (2): 99-101, 1995.
26. STEINBERG GD, CARTER BS, BEATY TH, CHILDS B, WALSH PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*, 17 (4): 337-347, 1990.
27. BRATT O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol*, 168 (3): 906-913, 2002.
28. CARTER BS, BOVA GS, BEATY TH, STEINBERG GD, CHILDS B, ISAACS WB, WALSH PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*, 150: 797-802, 1993.
29. SMITH JR, FREIJE D, CARPTEN JD, GRONBERG H, XU J, ISAACS SD, BROWNSTEIN MJ, BOVA GS, GUO H, BUJNOVSZKY P, NUSSKERN DR, DAMBER JE, BERGH A, EMANUELSSON M, KALLIONIEMI OP, WALKER DANIELS J, BAILEY WILSON JE, BEATY TH, MEYERS DA, WALSH PC, COLLINS FS, TRENT JM, ISAACS WB. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science*, 274 (5291): 1371-1374, 1996.
30. REBBECK TR, WALKER AH, ZEIGLER JOHNSON C, WEISBURG S, MARTIN AM, NATHANSON KL, WEIN AJ, MALKOWICZ SB. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am J Hum Genet*, 67 (4): 1014-1019, 2000.

31. XU J, MEYERS D, FREIJE D, ISAACS S, WILEY K, NUSSKERN D, EWING C, WILKENS E, BUJNOVSZKY P, BOVA GS, WALSH P, ISAACS W, SCHLEUTKER J, MATIKAINEN M, TAMMELA T, VISAKORPI T, KALLIONIEMI OP, BERRY R, SCHAID D, FRENCH A, MCDONNELL S, SCHROEDER J, BLUTE M, THIBODEAU S, GRONBERG H, EMANUELSSON M, DAMBER JE, BERGH A, JONSSON BA, SMITH J, BAILEY-WILSON J, CARPTEN J, STEPHAN D, GILLANDERS E, AMUNDSON I, KAINU T, FREAS LUTZ D, BAFFOE BONNIE A, VAN AUCKEN A, SOOD R, COLLINS F, BROWNSTEIN M, TRENT J. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet*, 20 (2): 175-179, 1998.
32. ZHENG SL, XU J, ISAACS SD, WILEY K, CHANG B, BLEECKER ER, WALSH PC, TRENT JM, MEYERS DA, ISAACS WB. Evidence for a prostate cancer linkage to chromosome 20 in 159 hereditary prostate cancer families. *Hum Genet*, 108 (5): 430-435, 2001.
33. XU J, ZHENG SL, KOMIYA A, MYCHALECKYJ JC, ISAACS SD, HU JJ, STERLING D, LANGE EM, HAWKINS GA, TURNER A, EWING CM, FAITH DA, JOHNSON JR, SUZUKI H, BUJNOVSZKY P, WILEY KE, DEMARZO AM, BOVA GS, CHANG B, HALL MC, MCCULLOUGH DL, PARTIN AW, KASSABIAN VS, CARPTEN JD, BAILEY WILSON JE, TRENT JM, OHAR J, BLEECKER ER, WALSH PC, ISAACS WB, MEYERS DA. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet*, 32 (2): 321-315, 2002.
34. BREYER JP, AVRITT TG, MCREYNOLDS KM, DUPONT WD, SMITH JR. Confirmation of the HOXB13 G84E Germline Mutation in Familial Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21 (8): 1348–1353, 2012.
35. CYBULSKI C, GÓRSKI B, DEBNIAK T, GLINIEWICZ B, MIERZEJEWSKI M, MASOJĆ B, JAKUBOWSKA A, MATYJASIK J, ZŁOWOCKA E, SIKORSKI A, NAROD SA, LUBIŃSKI J. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res*, 64 (4): 1215-1219, 2004.
36. LILJA H, ULMERT D, VICKERS AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: Prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer*, 8: 268-278, 2008.
37. EPSTEIN JI. An update of the Gleason grading system. *Journal of Urology*, 183: 433-440, 2010.
38. HUMPHREY P. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology*, 17: 292-306, 2004.
39. HARNDEN P, SHELLEY MD, COLES B, STAFFURTH J, MASON MD. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 8: 411-419, 2007.

40. HEIDENREICH A, BELLMUNT J, BOLLA M, JONIAU S, MASON M, MATVEEV V, MOTTET N, SCHMID HP, VAN DER KWAST T, WIEGEL T, ZATTONI F. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localized disease. *European Association of Urology European Urology*, 59: 61-71, 2011.
41. TERESE WINSLOW, U.S. Govt, 2010.
42. KLOTZ L. Active surveillance for prostate cancer. *Current Urology Reports*, 11: 165-171, 2010.
43. HALABI S, VOGELZANG NJ, OU SS, OWZAR K, ARCHER L, SMALL EJ. Progression-free survival as predictor of overall survival in men with castrate-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27: 2766-2771, 2009.
44. ATTARD G, SARKER D, REID A, MOLIFE R, PARKER C, DE BONO JS. Improving the outcome of patients with castration-resistant prostate cancer through rational drug development. *British Journal of Cancer*, 95: 767-774, 2002.
45. AYHAN H, İYİĞÜN E, GÖKTAŞ S, HATİPOĞLU S. Problems encountered by male patients after radical prostatectomy. *Gulhane Med J*, 50 (3): 180-189, 2008.
46. HUGGINS CS, HODGES RE. Studies of prostate cancer II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Archives of Surgery*, 2: 209-223, 1941.
47. FITZPATRICK JM, ANDERSON J, STERNBERG CN, FLESHNER N, FIZAZI K, RÉBILLARD X, DOGLIOTTI L, CONTI G, TURESSON I, JAMES N, HEIDENREICH A, SOLSONA E, GUILLEM V, HERCHENHORN D, MOUL J, VAN MOORSELAAR J, COETZEE LJ, WILSON A, BAMIAS A, DE WIT R, CHRISOFOU M. Optimizing treatment for men with advanced prostate cancer: expert recommendations and the multidisciplinary approach. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 68: 9-22, 2008.
48. NIGHTINGALE G, RYU J. Cabazitaxel (Jevtana) A Novel Agent for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer, *P&T*, 37 (8): 440-448, 2012.
49. LABRIE F. Gonadotropin releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 26: 361-373, 2005.
50. SIMARD J, DUMONT M, LABUDA D, SINNETT D, MELOCHE C, ELALFY M, BERGER L, LEES E, LABRIE F, TAVTIGIAN SV. Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocrine-Related Cancer*, 10: 225-259, 2003.
51. DEVGAN SA, HENDERSON BE, YU MC, SHI CY, PIKE MC, ROSS RK, REICHARDT JKV. Genetic Variation of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type II in Three Racial/Ethnic Groups: Implications for Prostate Cancer Risk. *The Prostate*, 33: 9-12, 1997.

52. SEENUNDUN S, ROBAIRE B. Cloning and characterization of the 5 $\alpha$ -reductase type 2 promoter in the rat epididymis. *Biology of Reproduction*, 72: 851-861, 2005.
53. CHEN WY, BAYLIN SB, Inactivation of tumor suppressor genes: choice between genetic and epigenetic routes. *Cell Cycle*, 4 (1): 10-2, 2005.
54. NAVONE NM, LABATE ME, TRONCOSO P, PISTERS LL, CONTI CJ, VON ESCHENBACH AC, LOGOTHETIS CJ. p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. *J Urol*, 161 (1): 304-308, 1999.
55. HARDEN SV, GUO Z, EPSTEIN JI, SIDRANSKY D. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol*, 169 (3): 1138-1142, 2003.
56. FEILOTTER HE, NAGAI MA, BOAG AH, ENG C, MULLIGAN LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene*, 16 (13): 1743-1748, 1998.
57. BOWEN C, BUBENDORF L, VOELLER HJ, SLACK R, WILLI N, SAUTER G, GASSER TC, KOIVISTO P, LACK EE, KONONEN J, KALLIONIEMI OP, GELMANN EP. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res*, 60 (21): 6111-6115, 2000.
58. KIBEL AS, FAITH DA, BOVA GS, ISAACS WB. Loss of heterozygosity at 12p12-13 in primary and metastatic prostate adenocarcinoma. *J Urol*, 164 (1): 192-196, 2000.
59. CROCE CM. Molecular origins of cancer, *Oncogenes and Cancer*. The New England Journal of Medicine, 358: 502-511, 2008.
60. SATO K, QIAN J, SLEZAK JM, LIEBER MM, BOSTWICK DG, BERGSTRALH EJ, JENKINS RB. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 91 (18): 1574-1580, 1999.
61. CATZ SD, JOHNSON JL. BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis*, 8 (1): 29-37, 2003.
62. GU Z, THOMAS G, YAMASHIRO J, SHINTAKU IP, DOREY F, RAITANO A, WITTE ON, SAID JW, LODA M, REITER RE. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*, 19 (10): 1288-1296, 2000.
63. VELONAS VM, HENRY H, CRISTOBAL G, DOS REMEDIOS, STEPHEN JA. Current Status of Biomarkers for Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*, 14: 11034-11060, 2013.

64. SOLLER MJ, ISAKSSON M, ELFVING P, SOLLER W, LUNDGREN R, PANAGOPOULOS I. Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 45: 717-719, 2006.
65. NAROD SA, SETH A, NAM R. Fusion in the ETS gene family and prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 99: 847-851, 2008.
66. DEMICHELIS F, FALL K, PERNER S, ANDRÉN O, SCHMIDT F, SETLUR SR, HOSHIDA Y, MOSQUERA JM, PAWITAN Y, LEE C, ADAMI HO, MUCCI LA, KANTOFF PW, ANDERSSON SO, CHINNAIYAN AM, JOHANSSON JE, RUBIN MA. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*, 26: 4596-4599, 2007.
67. GOPALAN A, LEVERSHA MA, SATAGOPAN JM, ZHOU Q, AL-AHMADIE HA, FINE SW. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res*, 69 (4): 1400-1406, 2009.
68. RUBIN MA, ZHOU M, DHANASEKARAN SM, VARAMBALLY S, BARRETTE TR, SANDA MG, PIENTA KJ, GHOSH D, CHINNAIYAN AM. Alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *Jama*, 287 (13): 1662-1670, 2002.
69. STEKETEE K, TIMMERMAN L, ZIELVAN DER MADE AC, DOESBURG P, BRINKMANN AO, TRAPMAN J. Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int J Cancer*, 100 (3): 30917, 2002.
70. TAPLIN ME, RAJESHKUMAR B, HALABI S, WERNER CP, WODA BA, PICUS J, STADLER W, HAYES DF, KANTOFF PW, VOGELZANG NJ, SMALL EJ. Androgen receptor mutations in androgenindependent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol*, 21 (14): 26738, 2003.
71. HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674, 2011.
72. AMELIO I, MELINO G, KNIGHT RA. Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochem Biophys Res Commun*, 414, 277-281, 2011.
73. GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS JM, ALNEMRI S, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, DAWSON TM, DAWSON WL, EL-DEIRY WL, FULDA S, GOTTLIEB E, GREEN DR, HENGARTNER HO, KEPP O, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON A, LU X, MADEO F, MALORNI W, MEHLEN P, NUÑEZ G, PETER ME, PIACENTINI M, RUBINSZTEIN DC, SHI Y, SIMON HU, VANDENABEELE P, WHITE E, YUAN J, ZHIVOTOVSKY, MELINO B, KROEMER G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19 (1): 107-120, 2012.

74. BIALIK S, ZALCKVAR E, BER Y, RUBINSTEIN AD, KIMCHI A. Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem Sci*, 35: 556-564, 2010.
75. KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
76. MARTIN SJ, GREEN DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82: 349-352, 1995.
77. COHEN GM, SUN XM, FEARNHEAD H, MACFARLANE M, BROWN DG, SNOWDEN RT. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol*, 153: 507-516, 1994.
78. EUM KH, LEE M. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-rastransformed fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 348: 61-68, 2011.
79. LUTHI AU, MARTIN SJ. The Casbah: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14: 641-650, 2007.
80. FESUS L, DAVIES PJ, PIACENTINI M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol*, 56: 170-177, 1991.
81. JOZA N, SUSIN SA, DAUGAS E, STANFORD WL, CHO SK, LI CY, SASAKI T, ELIA AJ, CHENG HY, RAVAGNAN L, FERRI KF, ZAMZAMI N, WAKEHAM A, HAKEM R, YOSHIDA R, KONG YY, MAK TW, ZUNIGA PFLUCKER PC, KROEMER G, PENNINGER JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410: 549-554, 2001.
82. CORY S, ADAMS JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2: 647-656, 2002.
83. ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-1308, 1998.
84. HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776, 2000.
85. FAVALORO B, ALLOCATI N, GRAZIANO V, DI ILIO C, DE LAURENZI V. Role of Apoptosis in disease, *Aging*, 4 (5): 330-349, 2012.
86. WHITE E, Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12: 401-410, 2012.
87. KUNDU M, THOMPSON CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol*, 3: 427-455, 2008.



88. GALLUZZI L, KROEMER G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135: 1161-1163, 2008.
89. GOLSTEIN P, KROEMER G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32: 37-43, 2007.
90. ZONG WX, DITSWORTH D, BAUER DE, WANG ZQ, THOMPSON CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*, 18: 1272-1282, 2004.
91. NGUYEN DX, MASSAGUE J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*, 8: 341-352, 2008.
92. ECCLES SA, WELCH DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*, 369: 1742-1757, 2007.
93. JIN JK, DAYYANI F, GALLICK GE. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int J Cancer*, 128: 2545-2561, 2011.
94. CLARKE NW, HART CA, BROWN MD. Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian J Androl*, 11: 57-67, 2009.
95. HUDSON BD, KULP KS, LOOTS GG. Prostate cancer invasion and metastasis: insights from mining genomic data, *Briefings in Functional Genomics*, 12 (5): 397-410, 2013.
96. CHEN CL, MAHALINGAM D, OSMULSKI P, JADHAV RR, WANG CM, LEACH RJ, CHANG TC, WEITMAN SD, KUMAR AP, SUN L, GACZYNSKA ME, THOMPSON IM, HUANG TH. Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate*, 73: 813-826, 2013.
97. WANG J, LEVENSON AS, SATCHER RL. Identification of a unique set of genes altered during cell-cell contact in an in vitro model of prostate cancer bone metastasis. *Int J Mol Med*, 17: 849-856, 2006.
98. OVERALL CM, LOPEZ OTIN C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2: 657-672, 2002.
99. STOCKER W, GRAMS F, BAUMANN U, REINEMER P, GOMIS RUTH FX, MCKAY DB, BODE W. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc peptidases. *Protein Sci*, 4: 823-840, 1995.
100. GONG Y, CHIPPAVA VENKATA UD, WILLIAM KOH. Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors in Prostate Cancer Progression. *Cancers*, 6: 1298-1327, 2014.
101. YAN C, BOYD DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*, 211: 19-26, 2007.

102. MURPHY G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*, 12: 233, 2011.
103. MORGIA G, FALSAPERLA M, MALAPONTE G, MADONIA M, INDELICATO M, TRAVALI S, MAZZARINO MC. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res*, 33: 44-50, 2005.
104. STEARNS ME, STEARNS M. Immunohistochemical studies of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression in human prostate cancer. *Oncol Res*, 8: 63-67, 1996.
105. OZDEN F, SAYGIN C, UZUNASLAN D, ONAL B, DURAK H, AKI H. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139: 1373-1382, 2013.
106. JUNG K, NOWAK L, LEIN M, PRIEM F, SCHNORR D, LOENING SA. Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. *Int J Cancer*, 74: 220-223, 1997.
107. STEARNS ME, WANG M. Type IV Collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: Benign and malignant tissue. *Cancer Res*, 53: 878-883, 1993.
108. GOHJI K, FUJIMOTO N, HARA I, FUJII A, GOTOH A, OKADA H, ARAKAWA S, KITAZAWA S, MIYAKE H, KAMIDONO S. Serum matrix metalloproteinase-2 and its density in men with prostate cancer as a new predictor of disease extension. *Int J Cancer*, 79: 96-101, 1998.
109. HAMDY FC, FADLON EJ, COTTAM D, LAWRY J, THURRELL W, SILCOCKS PB, ANDERSON JB, WILLIAMS JL, REES RC. Matrix metalloproteinase 9 expression in primary human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer*, 69: 177-182, 1994.
110. REIS ST, PONTES JUNIOR J, ANTUNES AA, DE SOUSA CANAVEZ JM, DALL'OGGIO MF, PASSEROTTI CC, ABE DK, CRIPPA A, DA CRUZ JA, TIMOSZCZUK LM. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Mark*, 26: 255-261, 2011.
111. MIYAKE H, MURAMAKI M, KURAHASHI T, TAKENAKA A, FUJISAWA M. Expression of potential molecular markers in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urol Oncol*, 28: 145-151, 2010.
112. TRUDEL D, FRADET Y, MEYER F, HAREL F, TÊTU B. Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: An immunohistochemical study. *Cancer Res*, 63: 8511-8515, 2003.

113. CHAMBERS AF, MATRISIAN LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Instit*, 89: 1260-1270, 1997.
114. FRIDMAN R, TOTH M, PEÑA D, MOBASHERY S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res*, 55: 2548-2555, 1995.
115. KUNIASU H, TRONCOSO P, JOHNSTON D, BUCANA CD, TAHARA E, FIDLER IJ, PETTAWAY CA. Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers. *Clin Cancer Res*, 6: 2295-2308, 2000.
116. ROSS JS, KAUR P, SHEEHAN CE, FISHER HA, KAUFMAN RA, KALLAKURY BV. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol*, 16: 198-205, 2003.
117. MURRAY NP, REYES E, TAPIA P, BADÍNEZ L, ORELLANA N. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 expression in disseminated tumor cells and micrometastasis in bone marrow of patients with nonmetastatic and metastatic prostate cancer: Theoretical considerations and clinical implications: An immunocytochemical study. *Bone Marrow Res*, 2012: 9, 2012.
118. TOTH M, CHVYRKOVA I, BERNARDO MM, HERNANDEZ BARRANTES S, FRIDMAN R. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: Role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 308: 386-395, 2003.
119. TRUDEL D, FRADET Y, MEYER F, TÊTU B. Matrix metalloproteinase 9 is associated with Gleason score in prostate cancer but not with prognosis. *Hum Pathol* 41: 1694-1701, 2010.
120. VARANI J, HATTORI Y, DAME MK, SCHMIDT T, MURPHY HS, JOHNSON KJ, WOJNO KJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in fresh human prostate tumour tissue and organ-cultured prostate tissue: Levels of collagenolytic and gelatinolytic MMPs are low, variable and different in fresh tissue vs. organ-cultured tissue. *Br J Cancer* 84, 1076-1083, 2001.
121. AALINKEEL R, NAIR MP, SUFRIN G, MAHAJAN SD, CHADHA KC, CHAWDA RP, SCHWARTZ SA. Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64: 5311-5321, 2004.
122. MAÑES S, LLORENTE M, LACALLE RA, GÓMEZ MOUTÓN C, KREMER L, MIRA E, MARTÍNEZ AC. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem*, 274: 6935-6945, 1999.
123. NALLA AK, GORANTLA B, GONDI CS, LAKKA SS, RAO JS. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 17: 599-613, 2010.

124. AALINKEEL R, NAIR BB, REYNOLDS JL, SYKES DE, MAHAJAN SD, CHADHA KC, SCHWARTZ SA. Overexpression of MMP-9 contributes to invasiveness of prostate cancer cell line LNCaP. *Immunol Invest*, 40: 447-464, 2011.
125. SONG YY, SUN H, ZHANG A, YAN G, HAN Y, WANG X. Plant-derived natural products as leads to anti-cancer drugs. *JMPHTR*, 2: 6-15, 2014.
126. NAKANISHI T, LIDA N, INATOMI Y, MURATA H, INADA A, MURATA J, LANG FA, IINUMA M, TANAKA T. Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*. *Phytochemistry*, 65: 207-213, 2004.
127. BAYTOP T. Türkçe bitki adları sözlüğü. Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dil Kurumu Yayınları No 578, 508 sayfa, Ankara, sayfa 33, 1994.
128. COODE MJE, CULLEN J. *Juniperus* L. Editor: DAVIS PH, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol 1, Edinburgh University Press, Edinburgh, page 78-84, 1965.
129. FARJON A. *Juniperus* L. Editors: GÜNER A, ÖZHATAY N, EKİM T, BAŞER KHC. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl 2), vol 11, Edinburgh University Press, Edinburgh, page 8-10, 2000.
130. ANŞİN R, ÖZKAN ZC. Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta) Odunsu Taksonlar. KTÜ Orman Fakültesi Yayınları, 167/19, 1.baskı 1993, Trabzon, sayfa 512, 1993.
131. GÜRKAN E. Bitkisel tedavi. Marmara Üniversitesi Yayınları, No:699, Fakülte yayın No:19, 2003.
132. ALLEN DE, HATFIELD G. Medicinal plants in folk tradition. An ethnobotany of Britain & Ireland. Cambridge: Timber Press, 2004.
133. AKKOL KE, GÜVENÇ A, YEŞİLADA E. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J Ethnopharmacol*, 125: 330-336, 2009.
134. LESJAK MM, BEARA IN, ORCIC DZ, ANACKOV GT, BALOG KJ, FRANCISKOVIC, MM. *Juniperus sibirica* Burgsdorf as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chemistry*, 124 (3): 850-856, 2011.
135. CAVALEIRO C, PINTO E, GONCALVES MJ, SALGUEIRO L. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 100 (6): 1333-1338, 2006.
136. ENNAJAR M, BOUJILA J, LEBRIHI A, MATHIEU F, ABDERRABA M, RAIES A. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *Journal of Food Science*, 74 (7): 364-371, 2009.

137. KOUR A, SHAWL AS, REHMAN S, SULTAN P, QAZI PH, SUDEN P. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24 (7): 1115-1121, 2008.
138. KUSARI S, LAMSHOFT M, SPITELLER M. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (3): 1019-1030, 2009.
139. MICELI N, TROVATO A, DUGO P, CACCIOLA F, DONATO P, MARINO A. Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15): 6570-6577, 2009.
140. KOZAN E, KUPELI E, YESILADA E. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their *in vivo* anthelmintic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 108 (2): 211-216, 2006.
141. JU JB, KIM JS, CHOI CW, LEE HK, OH TK, KIM SC. Comparison between ethanolic and aqueous extracts from Chinese juniper berries for hypoglycaemic and hypolipidemic effects in alloxan- induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 110-115, 2008.
142. SECA AML, SILVA AMS. The chemical composition of the *Juniperus* genus (1970- 2004). Editors: GOVIL JN, SINGH VK, BHARDWAY R. *Recent Progress in Medicinal Plants Source*, vol 16, Studium Press LLC, Houston, page 401-522, 2007.
143. MICELI N, TROVATO A, MARINO A, BELLINGHIER V, MELCHINI A, DUGO P, CACCIOLA F, DONATO P, MONDELLO L, GUVENC A, DE PASQUALE R, TAVIANO MF. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2600-2608, 2011.
144. PEPELJNJAK S, KOSALEC I, KALODERA Z, SLAZEVIC N. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm*, 55: 417-422, 2005.
145. ÜNLÜ M, VARDAR ÜNLÜ G, VURAL N, DÖNMEZ E, ÇAKMAK O. Composition and antimicrobial activity of *Juniperus exelsa* essential oil. *Chem Nat Comp*, 44: 129-131, 2008.
146. SASSI AB, HARZALLAH SKHIRI F, BOURGOUGNON N, AOUNI M. Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against herpes simplex virus type 1. *Natural Product Research*, 22 (1): 53-65, 2008.

147. ORHAN N, BERKCAN A, DELİORMAN ORHAN D, ASLAN M, ERGUN F. Effects of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (2): 759-764, 2011.
148. ORHAN N, ORHAN IE, ERGUN F. Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (9): 2305-2312, 2011.
149. OZTURK M, TUMEN I, UGUR A, AYDOGMUS OZTURK F, TOPCU G. Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (5): 867-876, 2011.
150. MORENO L, BELLO R, BELTRAN B, CALATAYUD S, PRIMO YUFERA E, ESPLUGUES J. Pharmacological screening of different *Juniperus oxycedrus* L. extracts. *Pharmacology & Toxicology*, 82 (2): 108-112, 1998.
151. KOERFGEN G. On the treatment of psoriasis. *Zeitschrift fur Haut- und Geschlechtskrankheiten*, 36: 254-255, 1964.
152. JONKOV S, NAIDENOV G. Juniper bath treatment of the neurasthenic neurosis. *Folia Medica (Plovdiv)*, 16 (5-6): 291-296, 1974.
153. ACARTÜRK R, Şifalı bitkiler flora ve sağlığımız, OGM Mensupları Yardımlaşma Vakfı Yayınları, No:1 Ankara, 1996.
154. ERENLER R, Yüksek Ardiç (*Juniperus excelsa* Bieb.)'ın Meyvelerindeki Bileşiklerin İzolasyonu, Yapı Tayini ve Aktivite Testleri, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tokat, 1997.
155. WEGENER T, SCHMIDT GP, Juniper berry oil-an aquareticum. *Biologische-Medizin*, 24 (2): 111-113, 1995.
156. FUJITA T, SEZİK E, TABATA M, YEŞİLADA E, HONDA G, TAKEDA Y, TAANKA T, TAKAISHI Y. Traditional medicine in Turkey VII. Folk Medicine in Middle and West Black Sea Regions, *Econ Bot*, 49: 406-422, 1995.
157. BOUKEF K, SOUSSI HR, Balansard G. Contribution to the Study on Plants Used in Traditional Medicine in Tunisia. *Fitoterapia-Elsevier Science Publisher* 16: 260-279, 1982.
158. KHALIL S. A Survey of Plants Used in Jordanian Traditional Medicine. *Int.J.Pharmacognosy*, 33: 317-323, 1995.
159. ÖZHATAY N, KOYUNCU M, ATAY S, BYFIELD A. Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma. *Doğal Hayatı Koruma Derneği*, İstanbul, 1997.

160. YEŞİLADA E, HONDA G, SEZİK E, TABATA M, GOTO K, IKESHIRO Y, Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *J Ethnopharmacol*, 39: 31-38, 1993.
161. MUTO N, TOMOKUNI T, HARAMOTO M, TATEMOTO H, NAKANISHI T, INATOMI Y, MURATA H, INADA A. Isolation of Apoptosis- and Differentiation-Inducing Substances toward Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells from Leaves of *Juniperus taxifolia*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72 (2): 477-484, 2008.
162. MICELI N, TROVATO A, MARINO A, BELLINGHERI V, MELCHINI A, DUGO P, CACCIOLA F, DONATO P, MONDELLO L, GUVENC A, DE PASQUALE R, TAVIANO MF. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. *Food Chem Toxicol*, 49: 2600-2608, 2011.
163. SLAMBROUCK SV, DANIELS AL, HOOTEN CJ, BROCK SL, JENKINS AR, OGASAWARA MA, BAKER JM, ADKINS G, ELIAS EE, AGUSTIN VJ, CONSTANTINE SR, PULLIN MJ, SHORS ST, KORNIENKO A, STEELANT WFA. Effects of crude aqueous medicinal plant extracts on growth and invasion of breast cancer cells. *Oncology Reports*, 17: 1487-1492, 2007.
164. MOUJIR LM, SECA AML, ARAUJO L, ARTUR MS, CARMO BARRETO SM. A new natural spiro heterocyclic compound and the cytotoxic activity of the secondary metabolites from *Juniperus brevifolia* leaves. *Fitoterapia*, 82: 225-229, 2011.
165. SADEGHI ALIABADI H, EMAMI A, SAIDI M, SADEGHI B, JAFARIAN A. Evaluation of In Vitro Cytotoxic Effects of *Juniperus foetidissima* and *Juniperus sabina* Extracts Against a Panel of Cancer Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (4): 281-286, 2009.
166. SADEGHI ALIABADI H, EMAMI A, SAIDI M, SADEGHI B, JAFARIAN A. In Vitro Cytotoxicity of Two Subspecies of *Juniperus excelsa* on Cancer Cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 11 (4): 250-253, 2009.
167. AZAR SK, MOEENA MR, NIKNAHADA H. Cytotoxicity of *Juniperus excelsa* and *Salvia mirzayanii* Extracts against HepG2 Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8 (4): 241-247, 2012.
168. BENZINA S, JASON HARQUAIL J, JEAN S, BEAUREGARD AP, CAITLYN D. COLQUHOUN CD, CARROLL M, BOS A, GRAY CA, ROBICHAUD GA. Deoxypodophyllotoxin Isolated from *Juniperus communis* Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 15: 79-88, 2015.
169. WOO KE, CHOI SU, PARK JC, LEE KR. A New Lignan Glycoside from *Juniperus rigida*. *Arch Pharm Res*, 34 (12): 2043-2049, 2011.

170. JANAR J, NUGROHO AE, WONG CP, HIRASAWA Y, KANEDA T, SHIROTA O, MORITA H. Sabiperones A-F, New Diterpenoids from *Juniperus sabina*. *Chem Pharm Bull*, 60 (1): 154-159, 2012.
171. RAFIEIAN KOPAEI M, DEHKORDI IS, GHANADIAN M, SHOKROLLAHI A, AGHAEI M, MAID S, CHOUDHARY MI. Bioactivity-guided isolation of new antiproliferative compounds from *Juniperus foetidissima* Willd. *Nat Prod Res*, 27: 1-7, 2015.
172. MARSHALL NJ, GOODWIN CJ, HOLT SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation*, 5: 69-84, 1995.
173. ULUKAYA E, ACILAN C, ARI F, IKITIMUR E, YILMAZ Y. A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turk J Biochem*, 36 (3): 261-269, 2011.
174. VERMES I, HAANEN C, STEFFENS NAKKEN H, REUTELINGSBERGER C. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184 (1): 39-51, 1995.
175. GÜLEŞ Ö, EREN Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2: 73-78, 2008.
176. GÜNEL T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *J Med Sci*, 27: 763-767, 2007.
177. GUT M, LEUTENEGGER CM, HUDER JB, PEDERSEN NC, LUTZ H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods*, 77: 37-46, 1999.
178. KOZERA B, RAPACZ M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*, 54 (4): 391-406, 2013.
179. SHOKRZADEH M, AZADBAKHT M, AHANGAR N, NADERI H, SAEEDI SARAVI SS. Comparison of the cytotoxic effects of *Juniperus sabina* and *Zataria multiflora* extracts with *Taxus baccata* extract and Cisplatin on normal and cancer cell lines. *Pharmacogn Mag*, 6: 102-105, 2010.
180. FRAGA CG, GALLEANO M, VERSTRAETEN SV, OTEIZA PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Asp Med*, 31: 435-445, 2010.
181. BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56: 317-333, 1998.
182. RAMOS S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem*, 18: 427-442, 2007.



183. LESJAK MM, BEARA IN, ORCI DZ, RISTI JD, ANACKOV GT, BOZIN BN, MIMICA DUKIC NM. Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd 1806. *Food Science and Technology*, 53: 530-539, 2013.
184. JIN UH, LEE JY, KANG SK, KIM JK, PARK WH, KIM JG, MOON SK, KIM CH. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences*, 77: 2760-2769, 2005.
185. TSENG HH, CHEN PN, KUO WH, WANG JW, CHU SC, HSIEH YS. Antimetastatic Potentials of *Phyllanthus urinaria* L on A549 and Lewis Lung Carcinoma Cells via Repression of Matrix-Degrading Proteases. *Integrative Cancer Therapies*, 11 (3): 267-278, 2012.
186. CHEN YJ, CHANG LS. Gallic acid downregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in human leukemia cells with expressed Bcr/Abl. *Mol Nutr Food Res*, 56 (9): 1398-1412, 2012.
187. KUO CL, LAI KC, MA YS, WENG SW, LIN JP, CHUNG JG. Gallic acid inhibits migration and invasion of SCC-4 human oral cancer cells through actions of NF- $\kappa$ B, Ras and matrix metalloproteinase-2 and -9, *Oncology Reports*, 32: 355-361, 2014.
188. TSAI CM, YEN GC, SUN FM, YANG SF, WENG CJ. Assessment of the Anti-invasion Potential and Mechanism of Select Cinnamic Acid Derivatives on Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Mol Pharmaceutics*, 10: 1890-1900, 2013.
189. EROĞLU C, SEÇME M, BAĞCI G, DODURGA Y. Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines. *Tumor Biol*, doi: 10.1007/s13277-015-3689-3.
190. LI C, ZHAO Y, YANG D, YU Y, GUO H, ZHAO Z, ZHANG B, YIN X. Inhibitory effects of kaempferol on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-9. *Biochemistry and Cell Biology*, 93 (1): 16-27, 2015.
191. LIN CW, CHEN PN, CHEN MK, YANG WE, TANG CH, YANG SF, HSIEH YS. Kaempferol Reduces Matrix Metalloproteinase-2 Expression by Down-Regulating ERK1/2 and the Activator Protein-1 Signaling Pathways in Oral Cancer Cells. *Plos One*, 8 (11): e80883, 2013.
192. SANTOS BL, MONA N. OLIVEIRA MN, COELHO PLC, BRUNO PS, PITANGA BPS, SILVA AB, ADELITA T, SILVA VDA, COSTA MFD, RAMON S. EL-BACH RS, TARDY M, CHNEIWEISS H, JUNIER MP, MOURA-NETO V, COSTA SL. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chemico-Biological Interactions*, 242: 123-138, 2015.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren her konuda bana olan güvenini hissetmekten çok büyük mutluluk ve gurur duyduğum, beni hücre kültürü çalışmalarına yönlendiren ve deneyim kazanmamı sağlayan, bu süreçte fikirlerini benden hiç esirgemeyen ve manevi desteği ile motivasyonumu sürekli yüksek tutan danışman hocam Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanı Prof. Dr. Ünal EGELİ' ye,

Gerek ders aşamasında gerekse tez çalışmalarım boyunca zorlandığım her noktada, kafama takılan her soruda fikirlerini, tecrübelerini, değerli zamanlarını ve emeklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Berrin TUNCA' ya ve Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER' e

Taksonomik çalışmalardaki emeklerinden dolayı Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik AD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hulusi Malyer' e ve Araş. Gör. Dr. Aycan TOSUNOĞLU' na; HPLC-DAD analizindeki emeklerinden dolayı Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Analitik Kimya AD Öğretim Üyesi Doç. Dr. Saliha ŞAHİN' e; hücre hatlarının temin edilmesindeki emeklerinden dolayı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM' e

Tez sürecinde yardımlarından dolayı Dr. Gülçin TEZCAN ve Arş. Gör. Gamze GÜNEY ESKİLER' e, hoşgörülerinden dolayı tüm Tıbbi Biyoloji AD çalışanlarına,

Hayatın her anında desteklerinden dolayı varlığına, anlayışına ve sabrına hep şükrettiğim değerli eşim Erhan ERYILMAZ' a; akademik hayata olan ilgimin ve isteğimin en zor günlerde bile hep taze kalmasını sağlayan ve bugün bu işi bir meslek olarak yapıyor olmamda en az benim kadar emekleri bulunan, ANNEM ve BABAM başta olmak üzere çok değerli aileme,

Moral ve motivasyonları için arkadaşlarım Araş. Gör. Duygu GÖK YURTSEVEN ve Araş. Gör. Seçil AK' a

sonsuz teşekkürlerimi sunuyor ve tezimi Mart 2015'de sessiz sedasız kapanan yeşil gözlerle, DEDEM'e ithaf ediyorum.

Işıl Ezgi ERYILMAZ

Bursa, 2016

## ÖZGEÇMİŞ

18 Haziran 1988 yılında Eskişehir'de doğdum. İlköğretimi İzmir Yavuz Selim İlköğretim Okulu'nda, ortaöğretimimi İzmir Kız Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2006 yılında Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne yerleştim. 2007 yılında bölüm ikincisi olarak İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne yatay geçiş yaptım ve 2010 yılında lisans derecesi ile bu bölümden mezun oldum. 2014 yılında Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'na ÖYP kapsamında araştırma görevlisi olarak atandığımdan dolayı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD ve Bilecik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümlerinde devam ettirmekte olduğum yüksek lisans eğitimlerimi bırakmak zorunda kaldım. Aynı yıl, Tıbbi Biyoloji AD'nda yüksek lisans eğitimi almak üzere Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne görevlendirildim. 2014 Şubat ayından beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'nda yüksek lisans eğitimimi devam ettirmekte ve aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.