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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

NEFERİN MOLEKÜLÜNÜN PROSTAT KANSER HÜCRELERİNİN KEMOTERAPİ DUYARLILIĞINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Talha BAYKUL

Referans no: 10177189

EDİRNE – 2018

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN

NEFERİN MOLEKÜLÜNÜN PROSTAT KANSER HÜCRELERİNİN KEMOTERAPİ DUYARLILIĞINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Talha BAYKUL

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2018/1

Tez No:

EDİRNE – 2018

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Suat ERDOĞAN danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Talha BAYKUL tarafından tez başlığı "Neferin Molekülünün Prostat Kanser Hücrelerinin Kemoterapi Duyarlılığına Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 24/12/2018 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR
ÜYE

İmza
Prof. Dr. Ayhan BİLİR
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tamam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim süresince bana emeklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Suat ERDOĞAN başta olmak üzere, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR, Doç. Dr. Zeynep B. DOĞANLAR ve Dr. Öğr. Üyesi Kıymet TABAKÇIOĞLU hocalarım ile doktora öğrencileri Kader TÜRKEKUL, Rıza SERTTAŞ, Mehmet D. ÖZDEMİR, bu çalışmayı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (TÜBAP 2018-1) ve maddi, manevi desteğini benden esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER 3
ANDROJENLER VE ÖSTROJENLER 5
KANSER VE KANSER GELİŞİMİ 6
PROSTAT KANSERİ 9
METASTAZ, SEKONDER TÜMÖR ODAKLARI VE İLİŞKİLİ HÜCRESEL OLAYLAR 10
EPİTELYAL MEZENŞİMAL GEÇİŞ (EMT) VE KANSERLE İLİŞKİSİ 11
HÜCRE ÖLÜMÜ: APOPTOZ, NEKROZ VE OTOFAJİ 11
DOKSORUBİSİN VE NEFERİN 13
GEREÇ VE YÖNTEMLER 17
BULGULAR 25
TARTIŞMA 55
SONUÇLAR 61
ÖZET 62
SUMMARY 64
KAYNAKLAR 67
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ 77
ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGE VE KISALTMALAR

Akt : Protein kinase B veya PKB
AMPK : AMP-activated protein kinase
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adenozin Tri Phosphat
AR : Androjen Reseptörü
Atg : Autophagy-related gene
BAK : BCL2 antagonist/killer
BAX : BCL2 associated X
Bcl-2 : B cell lymphoma 2
Bid : BH3 interacting domain death agonist
BMP : Bone Morphogenic Protein
cDNA : Complementary DNA
DMEM : Dulbecco's modification of eagle's medium
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik Asit
ECM : Extracellular Matrix
EGF : Epidermal Growth Factor
EDTA : Etilendiamin Tetraasetikasit
EMT : Epithelial Mesenchymal Transition
ER : Endoplazmik Retikulum
Erk : Extracellular signal-regulated kinase
FBS : Fetal Bovin Serum
FGF : Fibroblast Growth Factor

FOXO : Forkhead family of transcription factors

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

IC50 : İnhibition Concentiration 50

IGF : Insulin like Growth Factor

IL : Interlökin

JNK : c-Jun N-terminal kinases

LNCaP : Lymph Node Prostatic Cancer

PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphates

PKC : Protein kinase C

PLC : Phospholipase C

MAPK : Mitogen Active Protein Kinaz

MMP : Matriks Metallo Proteinase

mRNA : Messanger Ribonücleic Acid

mTOR : Mechanistic Target of Rapamycin

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NF-κβ : Nuclear Factor-κβ

PBS : Phosphate Buffered Saline

PC-3 : Prostate Cancer Cell

PCa : Prostate Cancer

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI : Phosphoinositide

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PI3P : Phosphoinositide -3-Phosphate

PIP : Phosphoinositide 4 Phosphate

PSA : Prostate Specific Antigen

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

RB : Retinoblastoma protein

RNA : Ribonucleic Acid

RNaz : Ribonuclease

RT-qPCR : Revrese transcriptase quantitative real time polymerase chain reaction

TGF-β : Transforming Growth Factor-Beta

RTK : Receptor tyrosine kinases

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TNF-α : Tumor Necrosis Factor-alpha

ULK **:** UNC-51-like kinase

Wnt **:**Wingless

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünya genelinde insanlarda ölüm nedenleri arasında ön sıralarda yer alan önemli bir halk sağlığı sorunudur. GLOBOCAN verilerine göre (2012) yılda 14 milyon yeni kanser teşhisi konulmakta ve bu hastalığa bağlı 8 milyon insan hayatını kaybetmektedir (1). Yapılan tahminlere göre kanser vakaları 2030 yılında en az % 70 oranında artmış olacaktır. Prostat kanseri ise erkeklerde kanserle ilişkili mortalitenin en sık ikinci sebebidir (2). Günümüzde tedavi yöntemleri arasında androjen ablasyon terapisi, girişimsel cerrahi müdahale, radyoterapi, immunoterapi ve kemoterapi bulunmaktadır (3). Kastrasyon dirençli prostat kanseri için gelişmiş bir tedavi seçeneği henüz yoktur. Prostat kanseri hastalarının çoğu tümör metastazından yaşamını yitirmektedir. Bu nedenle, tedavi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır.

Prostat kanseri tedavisinde paklitaksel/dozetaksel, sisplatin ve doksorubisin gibi kemoterapötik ilaçlar oligometastatik kemik kanserinin tedavisi için önemli bir stratejidir (4). DNA topoizomeraz 2 enziminin aktivasyonunu bloke ederek DNA sentezini ve hücre döngüsünü durdurarak hücre bölünmesini engelleyen ve apoptozu uyaran doksorubisin hidroklorür prostat kanseri tedavisinde en etkili ajanlardan biridir (5). Ancak tedaviden sonra ciddi yan etkiler ve metastaz gelişimi kullanımını kısıtlamaktadır. Bu gibi sorunların aşılabilmesi için doğal bileşikler ile kombine tedavi stratejileri günümüzde araştırma alanlarını oluşturmaktadır. Biyoaktif doğal bileşiklerin kemoterapötik ajanlar ile kombinasyonu sinerjik veya aditif etki sergileyebilir ve onların biyoyararlanımını önemli ölçüde arttırabilir (6, 7).

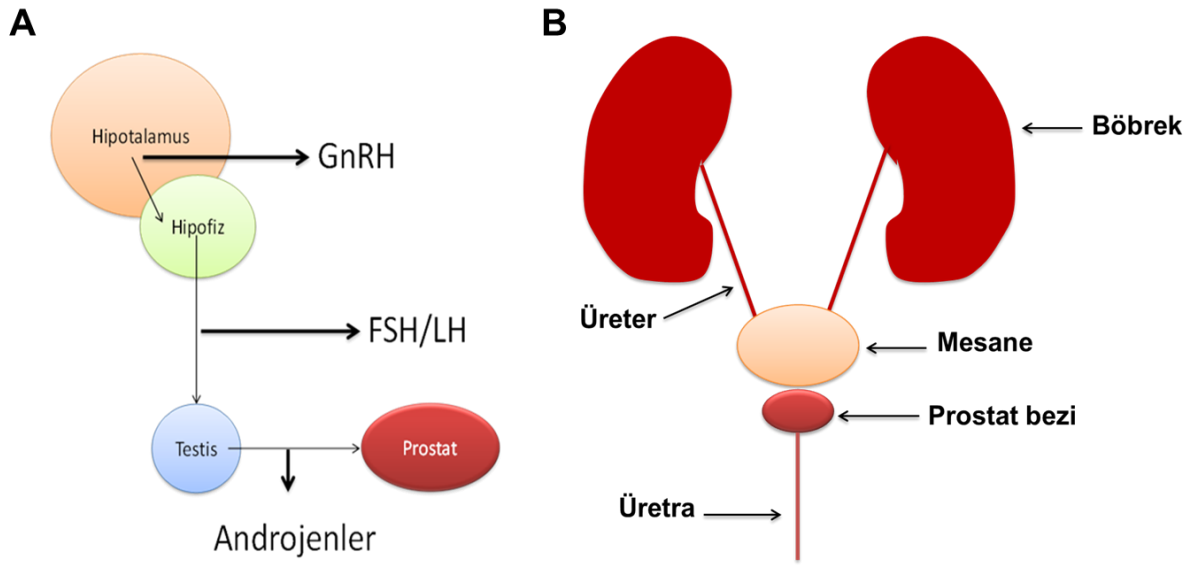
Hint lotusu bitkisinin tohumunda bulunan alkaloit yapıdaki neferin, anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve anti-kanser aktivite gösterir (8, 9). Neferin bazı kanser çeşitlerinde hücre proliferasyonu ve döngüsünün inhibe ettiği, apoptozu uyardığı ve migrasyonu baskıladığı rapor edilmiştir (10-12). Ancak prostat kanseri tedavisindeki etkinliği bilinmemektedir. Bu yüksek lisans tezinde androjen-dirençli prostat kanseri hücrelerine neferin tedavi etkinliği ve doksorubisin ile kombine kullanılabilme potansiyeli araştırıldı. Tek ve doksorubisin ile kombine uygulamanın hücre proliferasyonu, migrasyonuna etkisi ve moleküler mekanizmaları araştırıldı. Elde edilen verilere göre kombinasyon terapi, doksorubisinin tedavi etkinliğini artırabilecek potansiyeldedir, ancak ileri araştırmalar ile sonuçların desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

GENEL BİLGİLER

Prostat bezi erkeklerde abdomenin ventralinde bulunan, mesanenin altında seminal vezikül ve bulboüretral bez ile komşu, duktus deferense açılan, testisten salınan androjenler tarafından uyarılan, semenin oluşumundan sorumlu bir ekzokrin bezdir (Şekil 1B). Hipotalamus-hipofiz-testis uyarı aksı (GnRH-FSH/LH-testosteron) tarafından uyarılan bu bez ekzokrin salgısını gerçekleşir (Şekil 1A). İç yüzeyi yalancı çok tabakalı epitel doku ile örtülü olup, bezleri zengin fibromusküler stroma ile çevreler ve dışarıdan sağlam bir bağ dokudan oluşan düz kas lifleri bakımından zengin fibroelastik bir kapsülle sarılıdır (13). Dışarıdan ön yüzü facies anterior, arka yüzü facies posterior, sağ ve sol yan yüzeylerinde ise facies inferolateralis bulunan prostat bezi, androjenlerden aldığı sinyaller aracılığıyla ejekülat oluşturmasının yanında, yaş ile bağlantılı olarak ve/veya sinyallerde meydana gelebilecek değişikliklerden dolayı büyüme (hipertrofi veya hiperplazi) ve kanserleşme gösterebilmektedir(14) .

Ergenlik öncesine kadar testosteron etkisinde büyüyen bez, ergenlik çağında belirli bir büyüklüğe ulaşır ve büyümesi durur. Genellikle 50 yaşından sonra fibroadenoma görülebilen bez, benign olarak büyümeye devam edebilir (hipertrofi). Prenatal dönemde plasentadan salınan insan koryonik gonadotropin hormonu ile postnatal dönemde testosteron ile büyüyüp gelişen bezin 50 yaş sonrasında testosteron etkisiyle büyüdüğü düşünülmemektedir (13). Prostat bezi prostat sıvısını üretir ve ejekülasyon sırasında fırlatma gücünü sağlamak üzere bunu biriktirir. Tubuli

alveolar yapıda bir bez olan bu bez hacim bakımından ejakulatın en büyük kısmını oluşturur. İçinde spermin olarak isimlendirilen kendine özgü keskin bir kokusu olan maddeyi barındırır (13). Prostatın yapısı ve işlevi testosteron düzeyleriyle ilişkilidir. 50 yaşından sonra benign olarak en çok L. medius'u büyür ve sertleşir. Bundan dolayı içinden geçen üretranın pars prostatica'sını sıkıştırır, idrar yapmakta güçlük çektirir ve bu durum cerrahi yöntemlerle giderilebilir (13).



Şekil 1. Hipotalamus-hipofiz-testis aksı ve prostat bezinin konumu

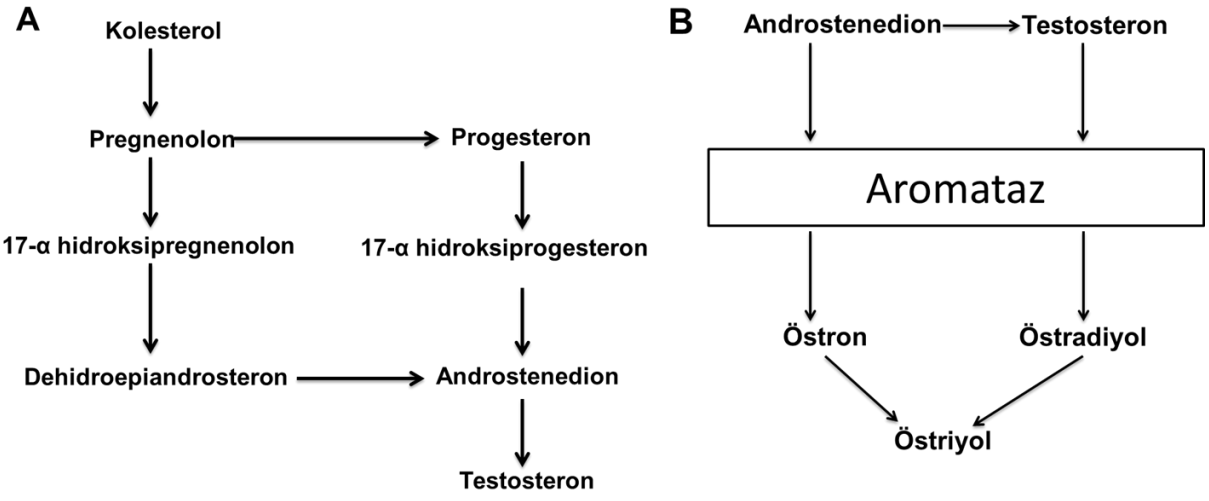
Prostat bezi histolojik olarak periferik, merkezi ve geçiş bölgesi olarak ayrılır, geçiş bölgesinde benign tipte hipertrofik veya hiperplazik büyümeler sonucu semptomlar meydana gelebilir. Periferik bölgede ise malign tipte büyüme olarak bilinen adenokarsinomalar meydana gelebilmektedirler. 50 yaş üzeri erkeklerin % 50'sinde 70 yaş üzeri erkeklerin ise % 95'inde benign prostat hipertrofisi görülürken malign prostat tümörü erkeklerde en sık görülen kanser türüdür (3). Erken evredeki adenokarsinomanın testosteron etkisiyle maling hale dönüştüğü bilinmektedir. Bu durumda kastrasyon ve östrojen tedavisi ile adenokarsinomanın ileri evreye geçişi engellenebilir(15) .

Prostat kanseri lenf düğümlerine metastaz yapan erken evre ile beyin ve kemiğe metastaz yapan ileri evre olarak ayrılabilmektedir. Lenf nodüllerine metastaz yapan neoplastik hücreler androjene duyarlı oldukları için bu evrede kastrasyon ve östrojen tedavisiyle hücrelere gelen androjen uyarılarına bir blokaj yapılabilmekte ve

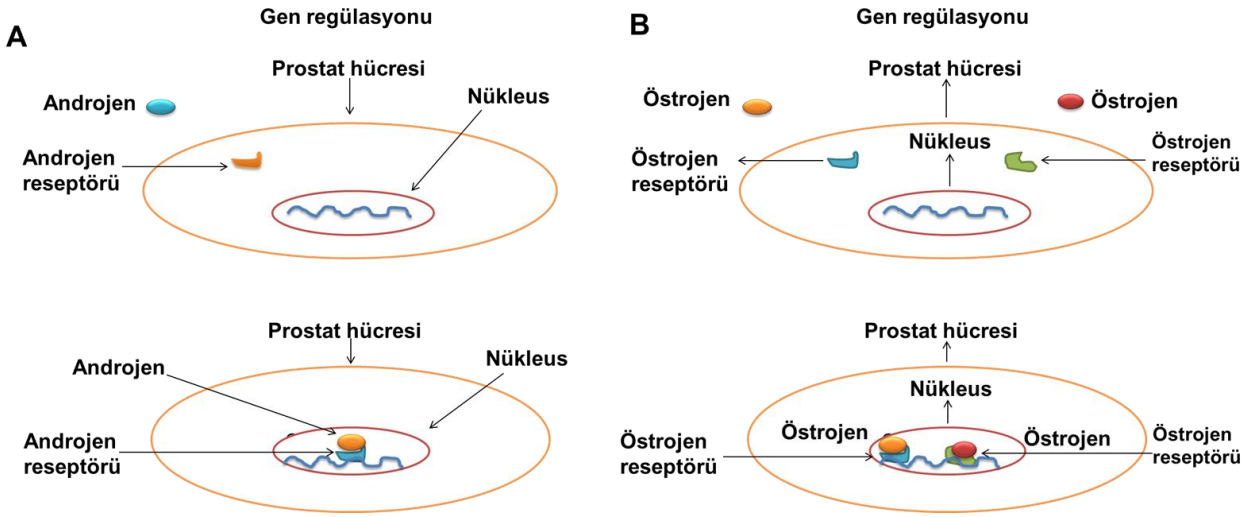
kanser gelişiminin ilerleyişi durdurulabilmektedir(15). Ancak beyine ve kemiğe metastaz yapan prostat kanser hücrelerinin kastrasyon ve hormon tedavisiyle ilerleyişinin durdurulması mümkün değildir. Teşhiste ise bu kanser türünde en iyi belirteç olan prostat spesifik antijeni analizi yapılmaktadır (15, 16).

ANDROJENLER VE ÖSTROJENLER

Steroid yapıdaki androjenler belirli düzeyde erkek ve kadınlarda bulunmaktadırlar. Lipofilik özelliklerinden dolayı hedef hücrelerin membranından kolayca geçebilir ve reseptörüne bağlanabilirler. Kolesterolden köken alan androjenler, kolesteronun pregnenolona ve progesterona dönüşmesi üzerinden farklılaşarak oluşturulur ve aromataz aracılığıyla östrojenleri verirler (15) (Şekil 2A-B). Androjenler testosteron, dihidrotestosteron ve androstenedion olarak bilinmektedirler. Fizyolojik koşullarda prostat bezinin gelişiminde ve fonksiyonunda rol alan androjenler, hücre içerisinde androjen reseptörüne (AR) bağlanarak gen anlatımının kontrolünde sorumludur (17, 18) (Şekil 3A). Prostat kanserinin erken evrelerinde kanser hücreleri çoğalabilmeleri için androjen sinyaline ihtiyaç duyarlar (5). Östrojenler ise prostat bezinin büyüyüp gelişmesi ve farklılaşmasında androjenlerin olduğu gibi hücre zarından geçerek sitozoldeki reseptörüne bağlanır ve gen anlatımını düzenlemektedirler. Östrojenler hücre içerisinde östrojen reseptörlerine (ER alfa ve ER beta) bağlanırlar ve prostat bezinde androjenler gibi önemli rol üstlenirler (19) (Şekil 3B).



Şekil 2. Testosteron ve östrojenin biyosentezi



Şekil 3. Androjen ve östrojenlerin prostat epitel hücrelerindeki rolü

KANSER VE KANSER GELİŞİMİ

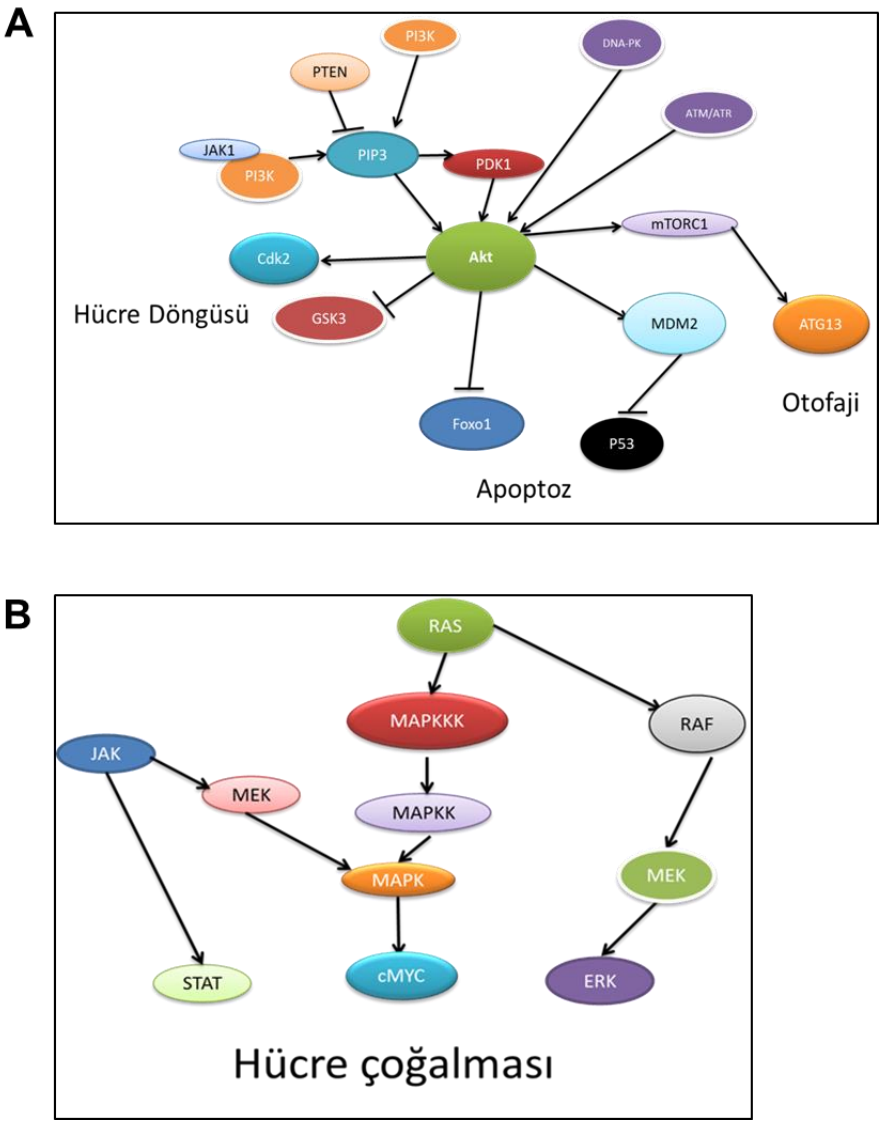
Hücreler bulundukları dokuya göre bölünür, farklılaşır, bölünmesini durdurur veya doku bütünlüğünü sağlamak için ölebilirler. Tümör baskılayıcı genler ve proto-onkojenler, fizyolojik şartlarda hücresel büyüme ve bölünme için gereklidir (20). Ancak, bazı genlerdeki ardışık mutasyonlar tümör baskılayıcı genlerde inaktifleşme, proto-onkogenlerde aktifleşme ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozulmalar sonucu hücre döngüsü kontrolden çıkarak kanser gelişebilmektedir (14, 21). Örneğin genom koruyucusu olan *p53* genindeki bir mutasyon hücre döngüsü, hücresel farklılaşma, DNA onarımı ve apoptoz mekanizmaları bozulur (22). Farklı anjiyojenik, invaziv ve metastatik özelliklere sahip kanser hücreleri heterojen hücre topluluklarını meydana getirebilmektedirler (23). Bu hücrelerin tümör oluşturduktan sonra metastaz yapabilmeleri için, tümör hücrelerinin büyüme, invazyon, dolaşımda ya da immün sistemden kaçma ve saklanma, ekstravazasyon ve hedef organda yerleşme gibi zorlu basamakları geçmesi gerekmektedir (14).

Hücre döngüsü, bölünmeye hazırlık G1, S, G2 (interfaz) ve M (mitoz) fazlarından meydana gelmektedir (24). Hücre döngüsü, hücrenin bir fazdan diğerine geçişi için çeşitli faktörlerin uygunluğunun kontrol noktaları ile denetlendiği bir süreçtir. Hücrenin bir sonraki faza geçişi için koşulların uygun olup olmadığını, içerisinde bulunduğu fazın tamamlanıp tamamlanmadığı bu noktalarda kontrol edilir. G1 fazındaki kontrol noktası hücrenin bölünmeye devam edebilmek için S fazına geçip geçmeyeceğine karar verdiği nokta olan CDK4 (siklin bağımlı kinaz 4) ve siklin

D proteinlerinin oluşturduğu kompleks bölünmeye devam sinyalini uyarır (25). CDK inhibitörü p16 ya da p21 proteinleri ise CDK4'ü inhibe ederek hücresin S fazına geçişini engeller ve böylece hücreler yaşam döngüsünün G1 fazında duraksatılmış olur (24, 25). Ayrıca hücre bu noktada G0 dinlenme fazına geçişi de uyarabilir. G2 fazındaki kontrol noktasında ise hücrenin mitoza geçiş için uygunluğu kontrol edilir (26). Eğer hücrenin DNA'sı hasarlanmış ise siklin bağımlı kinazları aktifleştiren mitoz başlatıcı faktör inhibe edilir ve böylece hücre döngüsü G2 fazında duraksar (27). Benzer şekilde p21 proteini de G1 fazında olduğu gibi G2 fazında da p53 üzerinden DNA hasarı ile uyarılarak siklin/CDK kompleksini inhibe eder ve hücre döngüsünü duraklatır (28). Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozun kontrol mekanizmalarında bulunan p53 gibi, hücre büyümesi ve çoğalmasından sorumlu PTEN gibi hücre membranın da bulunan reseptör tirozin kinazlar, sitokin reseptörleri, integrinler, hücre yüzey belirteçleri gibi yapılardan sinyal alıp ileten PI3K gibi önemli sinyal moleküllerini kodlayan genlerin anlatımlarında meydana gelen değişimler sonucunda hücrelerdeki kontrol mekanizmaları bozulup hücreler kontrolden çıkabilmektedirler (Şekil 5).

Wnt, TGF-β, FGF, EGF, BMP sinyal yolakları embriyonik gelişim sırasında hücre proliferasyonu, büyümesi ve farklılaşmasında önemli rol oynar (29, 30). Ancak, ileri yaşlarda bu yolaklarda olası değişim ve mutasyonlar kanser gelişiminin temelinde yatan mekanizmaları oluşturabilir (31). Önemli sinyal yolaklarının reseptör tirozin kinaz (RTK) aracılı veya sitokin reseptörlerinin uyarılması sonucu janus kinas'lar (JAK) çapraz fosforillenerek signal tranducer acivator tanscription'ları, (STAT) da nukleusa transloke olarak gen anlatımını düzenler (32). Böylece hücresel farklılaşma, hayatta kalma, büyüme ve patojenlere karşı direnç düzenlenir. Örneğin IL-6, B lenfositlerde JAK-STAT yolağını tetikleyerek çoğalma ve farklılaşmayı düzenler (33). RTK aracılı uyarılan RAS, RAF aktivasyonu sonucu MAP kinaz yolağını etkinleştirir. Bu sinyal *Myc* gibi proliferasyonla ilgili genlerin anlatımına neden olur (34). Doğrudan reseptörlerde meydana gelen mutasyonlar veya RAS, RAF, MAPK gibi reseptör tirozin kinazdan aldığı sinyali hücre çekirdeğine ileten sinyal moleküllerinde olabilecek mutasyonlar, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olarak kanserleşmeye neden olabilmektedir (35). ERK sinyal yolağı ise tirozin kinaz reseptörünün uyarılmasıyla MEK tarafından fosforile edilerek transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açan bir kinazdır (Şekil 4B) (2, 28).

PI3K/AKT/PTEN (36, 37), MAPK (38) ve NF-κB (39) sinyal yolakları kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gelişmesi, hücre büyümesi, sağkalımı ve göçünde önemli rol oynar. Wortmanin ile PI3K/AKT sinyal yolunun inhibisyonu, hücre proliferasyonunu baskılar ve apoptozu uyarır (40). Tümör baskılayıcı PTEN geni ise PI3K/AKT sinyal yolunu negatif düzenleyici role sahiptir (41). PTEN'in derin silinme veya mutasyonla inaktivasyonu, prostat kanseri hastalarının yaklaşık % 30'unda tanımlanmıştır (Şekil 4A) (42).



Şekil 4. Kanser ile ilişkili sinyal ileti yolları. A: PIK3/AKT aracılı kontrol mekanizmaları, B: JAK-STAT, MAPK, ERK aracılı kontrol mekanizmaları.

PROSTAT KANSERİ

Prostat kanseri, özellikle gelişmiş ülkelerde yaşayan 70 yaşın üzerindeki erkeklerde çok yaygın görülen ciddi ve ölümcül bir sağlık sorunudur (43). Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen ikinci kanser çeşididir ve toplam erkek kanser mortalitesinin % 6.6'sını oluşturur. 2030 yılına kadar yılda yaklaşık 1.7 milyon PCa vakası ve buna bağlı olarak 499 bin ölümün gerçekleşeceği öngörülmektedir (44). Prostat kanserinin ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak ortaya çıkarılamamıştır, ancak genetik yatkınlık, yaşlanma ve batılı diyetin majör risk faktörleri olduğu bilinmektedir (45).

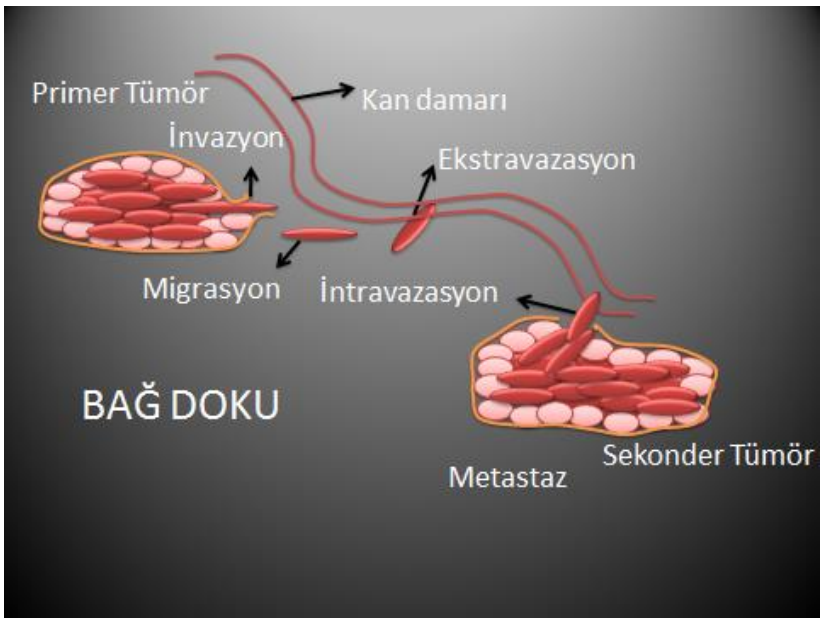
Hastalığın erken dönemlerinde, çoğu hasta prostatektomi, hormonal tedavi, radyoterapi ve kemoterapi gibi mevcut tedavi stratejilerine yanıt vermektedir. Her ne kadar metastatik prostat kanseri hastasının çoğu başlangıçta androjen deprivasyon tedavisine yanıt verse de, hastaların çoğunda androjen reseptörünün (AR) farklı mutasyonları ortaya çıkarak kastrasyona dirençli prostat kanseri (KDPK) gelişmektedir. Öte yandan, KDPK için terapi seçenekleri sınırlı kalmaktadır. Enzalutamid (Xtandi®) prostat kanseri tedavisi için geliştirilmiş bir AR inhibitörüdür (46). Enzalutamid, androjenlerin AR'ye bağlanmasını, AR'nin nükleer translokasyonunu ve AR-aracılı DNA bağlanmasını bloke eder. Böylece KDPK'nin ilerlemesini engeller ve tedavi sonrası hasta ömrünü plaseboya göre ortalama 4.8 ay artırır (47). Ancak, androjen deprivasyon tedavisinin sonunda enzalutamid veya diğer anti-androjen ajanlarına karşı direnç gelişir (18). Malignitenin agresif ve metastatik evresi olan androjen-bağımsız hastaları tedavi etmek güçtür (48).

Preklinik çalışmalardan elde edilen verilere göre, tümör supresör genlerden PTEN kaybının prostat kanserinin KDPK'ye geçişi ile pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (49). Buna göre PTEN mutasyonun hastaların sağkalım yüzdesinin düşmesine ve abirateron tedavi aşamasının kısalmasına neden olmaktadır (50). Ayrıca, p53 tümör süpresör genindeki mutasyonların KDPK'ye geçişte AR-dışı değişikliklerde yüksek oranda ilişkili bulunmuştur (51). PI3K/AKT/mTOR yolu, tümör baskılayıcı PTEN kaybına bağlı olarak ileri prostat kanserinde sıklıkla aktive olur (52). Bununla birlikte, PI3K yolunun tek başına inhibe edilmesi, geri besleme döngülerinin varlığından ve Ras/Raf/MEK/ERK (53, 54) ve androjen de dahil olmak üzere diğer yolaklarla çapraz etkileşimden dolayı prostat kanserinin tedavisi için yetersiz

olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle, PI3K/AKT/mTOR ve Ras/MEK/ERK yollarının kombine hedeflenmesi, multipl miyelom, melanom ve prostat kanseri dahil olmak üzere bir dizi farklı kanserde alternatif bir yaklaşım olarak önerilmiştir.

METASTAZ, SEKONDER TÜMÖR ODAKLARI VE İLİŞKİLİ HÜCRESEL OLAYLAR

Migrasyon, invazyon, ekstravazasyon ve metastaz kanser gelişimi ve dokulara yayılımında önemli rol oynayan hücresel hareketlerdir (28). Kanser hücrelerinin çoğalıp yayılabilmeleri için öncelikle bulunduğu dokunun hücre dışı matriksini (ECM) yıkımlayıp kendine alan açması gerekmektedir. Bunun için kanser hücreleri matriksi yıkımlayıcı enzimlerin (MMP, matriks-metallo proteinazlar) aktivasyonunu artırırlar. Böylece hücreler bulundukları dokudaki bazal membranı ve hücre dışı matriksi parçalayıp invazyon ve migrasyon yapabilirler (26). Daha sonra en yakın kan damarına girerek (ekstravazasyon) dolaşım sistemine katılıp bulundukları dokudan çok farklı ve uzak dokulara sıçrayabilirler (metastaz) (Şekil 5) (28).



Şekil 5. İnvazyon, migrasyon, ekstravazasyon ve metastaz süreçleri

EPİTELYAL MEZENŞİMAL GEÇİŞ (EMT) VE KANSERLE İLİŞKİSİ

Epitelyal mezenşimal geçiş, epitel kökenli hücrelerin embriyonik kök hücre gibi davranmasına neden olan başkalaşım, bunun sonucunda bu hücrelerin yayılıp metastaz yapmasıyla kanserleşmeye neden olan hücresel olaylardan biridir. Kanser gelişiminde EMT etkisi olduğu kadar mezenşimal epitelyal (MET) geçişinde önemi vardır (55).

Embriyonik kök hücre özelliği kazanan hücreler metastaz yaptıktan sonra yerleştikleri dokuda epitelyal hücrelere dönüşerek burada kontrolsüz çoğalmaya devam ederler. Bu transformasyonlar kanserin gelişmesinde, nüks etmesinde ve ilaca karşı direnç kazanmada kilit önem taşımaktadırlar (56). Gelişim sürecinin bir parçası olan organizasyon, hücrelerin farklılaşması, göç etmesi, çoğalması, apoptoza uğraması gibi temel olaylar ile meydana gelirken; kanserleşmede ise bu temel olaylarda bozukluklar meydana gelir.

EMT'ye neden olan *Snail, Slug, Twist* genlerinin anlatımlarının artması epitel hücresini embriyonik kök hücre benzeri yapar. Sonrasında bazal membranı delip geçerek göç etmeye başlar. Ya bulunduğu dokuda mezenşimal kök hücreye dönüşüp metastaz yaparak sıçradığı bölgede çoğalır ya da mezenşimal kök hücre haline gelip çoğalır sonra metastaz yapar ve sıçradığı bölgede çoğalır (57).

HÜCRE ÖLÜMÜ: APOPTOZ, NEKROZ VE OTOFAJİ

Apoptoz, nekroz ve otofaji organizma bütünlüğünün korunması ve homeostazda önemli rol oynayan olaylardan bazılarıdır. Apoptoz hücre büyümesinin kontrolünde rol alan, özel bir sinyal sonucu hücrenin programlı bir şekilde ölmesini sağlayan bir hücre ölüm şeklidir (58). Apoptoz kromatin yoğunlaşması, nükleus parçalanması gibi morfolojik değişimlerle ve kaspazların aktivasyonu, DNA ve proteinlerin yıkımlanması ve hücrenin fagositler tarafından yutulmasını sağlayan zar yüzey modifikasyonları gibi kimyasal değişimlerle karakterize, genlerle kontrol edilen bir mekanizmadır (59).

Apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar hücrenin yaşam ve ölümü arasındaki dengeyi bozup kanserleşmeye neden olabilmektedir. Apoptoz, ölüm sinyallerinin ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla gerçekleşen dışsal ve hücre içi toksisitenin neden olduğu içsel yolak olmak üzere başlıca iki yolakla tetiklenmektedir. Ayrıca apoptoz

genetik olarak düzenlenmiş ve çok hücreli organizmaların embriyogenez, gelişim ve doku homeostazı aşamalarında büyük öneme sahip olan bir hücresel bir süreçtir.

Mitokondriyal hasar apoptozu aktive eder veya reseptör aracılı apoptotik yolakları arttırabilir. Mitokondri kaspaz kofaktörlerin, prokaspaz 2-3 ve 9, sitokrom c ve endonükleaz G (Endo G) ve AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınımı, apoptozom oluşumu ve apoptoz için hücrenin garantilenmesi ile sonuçlanan içsel apoptoz yolağının kontrol noktasıdır (60). Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom c gibi proteinler ve mitokondriler rol oynar (61).

Nekroz, fiziksel veya kimyasal stres sonucunda hücrelerin parçalanarak, eriyerek ölmesidir. Bu ölüm esnasında ölen hücrelerin etraflarındaki sağlıklı hücrelerinde hasar görmesi sonucunda doku kaybı meydana gelebilmektedir. Bu ölüm şekli hücrelerin bulunduğu dokuda bir iltihaplanmaya veya inflamasyona neden olabilmekle beraber hücrelerin bulunduğu dokuda ağır tahribat meydana getirebilir (62). İnflamasyon durumunda salınan sitokinler nekroz veya apoptoz sonucu bir inflamasyonun olabileceği sinyalini vermektedirler.

Otofaji ise hücrelerde stres oluşması, ATP yoksunluğu, hücre bütünlüğünün korunması ve nekrozdan kaçınmak gibi zorlu koşullarda hücrenin kendi yapılarını ve hatta kendisi de yıkımlaması olayıdır (63). Otofaji, apoptoza ve nekroza alternatif bir hücre ölüm yolağı olarak görülmektedir. Hücreler kendi lizozomlarını kullanarak organellerini, kendi yapısındaki bileşenlerini bir vakuol ile sararak kendi kendini yemesi olarak tanımlanabilir.

Otofaji, embriyonik gelişimde, apoptotik hücrelerin ve organellerin sindirilmesinde, antijen işlenmesinde, toksinlere karşı korunmada, çökmeye meyilli proteinlerin ve bulaşıcı ajanların yıkılmasında, hücresel bileşenlerden enerji elde edilmesinde ve hücresel açlığa karşı tampon gibi rol oynadığı bilinen hücresel bir mekanizmadır. En çok bilinen otofaji genleri arasında *Atg7, Beklin1, ULK1/2, ATG13* ve *LC1-3* sayılabilir (28).

DOKSORUBİSİN VE NEFERİN

Antrasiklin antineoplastik doğal bir antibiyotik olan doksorubisin (Şekil 7A), kanser tedavilerinde kemoterapi amaçlı yaygın kullanılmaktadır. Doksorubisin prostat, meme, karaciğer ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, gastrik karsinoma, osteokarsinoma, lösemi ve lenfoma gibi kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (64).

Etkilerini topoizomeraz 2 inhibisyonu, hücre içi anti-oksidan kaybı ve reaktif oksijen türlerinin artışıyla tetiklenen oksidatif stres aracılı gerçekleştirir. Bu etkileri ile mitokondri membran bütünlüğü bozulur ve apoptoz tetiklenerek sitotoksite gelişir (65). Doksorubisin TNF-α, bazı sitokinler ve interferon gibi inflamatuvar ajanları etkinleştirir (66).

Doksorubisin PC3 prostat kanser hücrelerinde c-FLIP gibi anti-apoptotik proteinleri baskılayıp Apo2L/TRAIL gibi ölüm reseptörlerini aktive ederek kaspaz 3, -6, -8 aracılı apoptozu uyarır (67). CDC25C, CDC2 inhibisyonu Chk1 ve Chk2 aktivasyonu aracılığıyla DU145 hücrelerinin de büyümesini bloke ettiği bildirilmiştir (68).

Doksorubisin prostat kanseri ve osteosarkoma hücrelerinde katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri inhibe ederek ROS düzeylerini artırır (69). Hücrelerde DNA kırıkları, apoptotik cisimciklerin oluşumu, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı, ferritin ve metallotionin birikimi sonucunda JNK, p38 MAPK, ERK sinyal yolakları aracılı apoptoz tetiklenir (65). Bununla birlikte, doksorubisinin primer hücre ölüm mekanizmalarını içsel ve dışsal apoptoz yolakları ile otofajiyi de tetikleyerek kardiyotoksisiteye neden olarak istenmeyen yan etkiler de oluşturur.

Uzun yıllar farklı kanser türlerinin tedavisi için doğal bitkiler de alternatif olarak kullanılmakta ve araştırmalara konu olmaktadır (70). Son yıllarda artan kanıtlar, fitokimyasalların ihmal edilebilir yan etkileri olan önemli birer terapötik aktivite sergilediğini göstermiştir.

Neferin (Şekil 7B), lotus (*Nelumbo nucifera*) bitkisinin tohumunda bulunan anti-hipertansif, anti-aritmik, anti-koagülan, antioksidan, anti-inflamatuvar, vasküler düz kas gevşetici, anti-diyabetik ve anti-kanser etkili bisbenzilisoqunolin alkoloid bir biyoaktif bileşendir (71). Güney Asya ülkelerinde sinirsel hastalıklarda, uykusuzluk, kardiyovasküler ve KOAH gibi hastalıklarda kullanılmaktadır (72).

Neferin ile liensinin, isoliensinin, daurisin, tetrandrin kimyasal yapıları birbirlerine çok benzemektedir. Bu bileşenlerin yapılarındaki iki benzilisoqunolin ünitesi bir veya daha fazla karbon-karbon zinciri ile birbirlerine bağlanabilmekte ve genellikle bu alt üniteler yapısında hidroksil ve metoksil aromatik halkalı gruplar taşımaktadırlar (73, 74).

Neferin, sisplatin gibi kemoterapi ajanlarıyla birlikte kullanıldığında böbrek tübül hücrelerinde AMPK/mTOR yolağı üzerinden otofajiyi tetikler, hücrelerde anti-oksidan havuzu azaltıp ROS düzeyini artırarak mitokondriyal membran bütünlüğünü bozup sitoplazmaya sitokrom c bırakılması ile apoptozu içsel yolaktan uyarır (75).

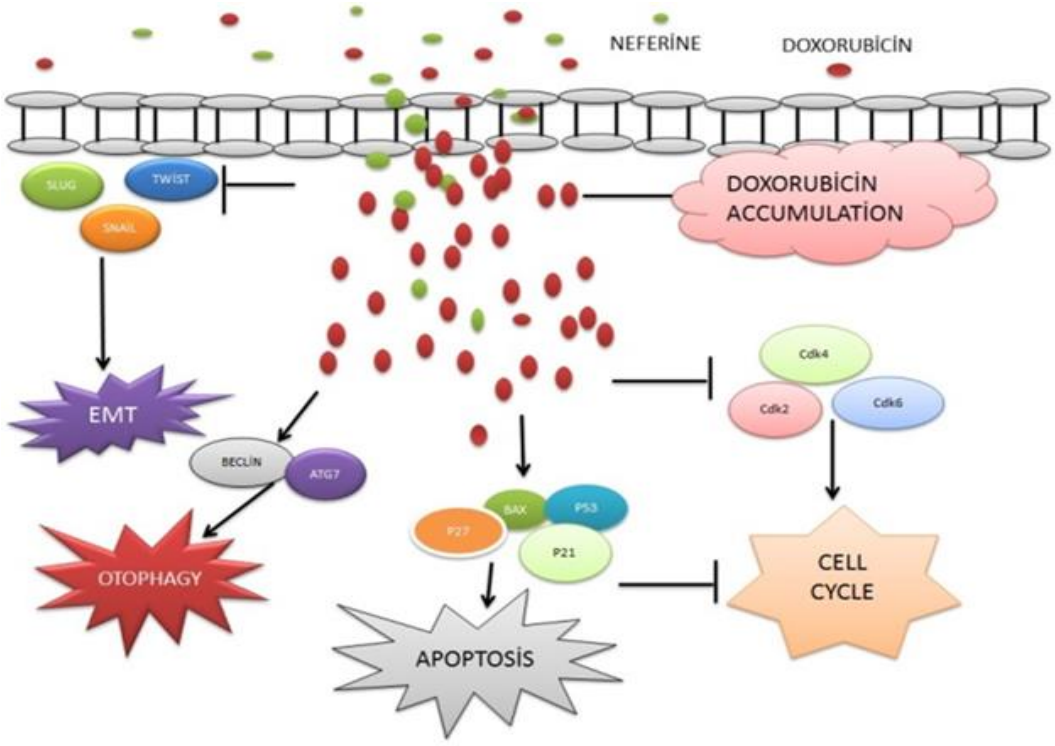
Neferinin insan osteokarsinoma hücrelerinde hücre döngüsünü p38 MAPK ve JNK yolakları üzerinden p21 aracılığıyla G1 fazında durdurduğu belirtilmiştir (73). Bu molekülün, doksorubisin ile insan akciğer adenokarsinom hücrelerinde NF-κB inhibisyonu ve MAPK aktivasyonu ile ROS aracılı apoptozu tetiklediği belirtilmiştir (64). Ayrıca hücre içerisinde doksorubisin birikimine neden olarak kalsiyum birikimi ve oksidatif stres üzerinden apoptozu tetiklediği rapor edilmiştir (65).

İnsan akciğer adenokarsinom hücrelerinde neferinin sisplatinle Beklin 1 aracılığıyla PI3K/Akt/mTOR sinyal yolaklarını baskılayarak otofajiyi tetiklediği de bilinmektedir (71). Neferin, karaciğer kanser hücrelerinde hücre içi kalsiyum birikimini arttırarak mitokondriyal membran bütünlüğünü bozup hücreyi strese sokması ve *Bax, Bak, Bad, kaspaz -3* ve *-8* gibi apoptotik genlerin ifadesini yükseltirken Bcl 2 gibi anti-apoptotik genlerin ifadesini ise azaltır (76). Bununla birlikte neferin tedavisinde AKT, TNF-α, p38, ERK1/2, MAPK sinyalleri inhibe edilirken *PTEN* ve *p53* gibi tümör supresör genlerin anlatımı artırılır (72). Bu alkaloid hepatoselüler karsinomada endoplazmik retikulum (ER) stresi aracılı apoptozu kaspaz 3, -6, -7, -8, PARP, Puma, bak, bax, bim, bid, kalpain 2, kalneksin ve bip moleküllerini aktive ederek artırdığı c-Myc, cyclin D1, D3, CDK4, E2F-1 moleküllerini baskılayarak hücre döngüsünü durdurduğu aktarılmıştır (Şekil 6) (76).

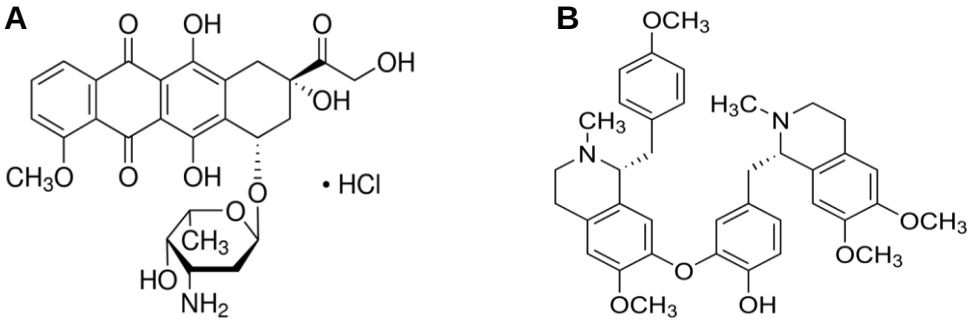
Neferin periferik kan hücreleri gibi sağlıklı normal hücrelerde ise TNF-α, IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar molekülleri baskılar, antioksidan kapasiteyi güçlendirir, oksidatif hasarı azaltır veya önler (77). Şaşırtıcı olarak diyabet aracılı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde olumlu etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (78). Yüksek seviyedeki glikozun vasküler endotel hücrelerinde meydana getirdiği DNA hasarı ve ROS artışı nedeniyle apoptozun aktive olmasını baskıladığı rapor edilmiştir (79).

Prostat kanserinde doksorobusinin kemoterapötik etkinliği ve yan etkileri biliniyor iken, bu kanserde neferinin terapötik amaçlı etkinliği ve doksorubisin ile birlikte kullanım potansiyeli ise henüz ortaya konulmamıştır. Kardiyomiyoblast hücrelerinde neferin ile doksorubisin birleşik uygulandığında LC3B, Beclin 1, Atg7, ULK 1 aktivasyonuyla otofajinin indüklendiği belirtilmektedir (78). İnsan hepatoselüler karsinomasında yapılan bir çalışmada, neferin ile okzaliplatin tedavisinde invazyon ve migrasyondan sorumlu TGF-β1'in inhibe edildiği, *Snail, Slug, Twist, Zeb-1, N-kaderin* ve *vimentin*'in baskılandığı, *E-kaderin*'in aktive edildiği ve matriks metalloproteinaz (MTT) gibi ekstraselüler matriksi yıkımlayıcı enzimlerin aktivitelerinin ise baskılandığı belirtilmiştir (80). Ayrıca neferin, doksorubisin tedavisinde gelişen kardiyotoksisitenin önüne geçebildiği de belirtilmiştir (78).

Belirtilen bu gerekçelerden dolayı, mevcut çalışmada insan androjen-dirençli ve sınırlı düzeyde de androjen-duyarlı insan prostat kanser hücrelerinde neferin etkinliği ve doksorubisin ile kombine kullanım potansiyeli *in vitro* şartlarda analiz edilmesi amaçlandı.



Şekil 6. Kanser hücrelerinde doksorubisin ve neferin tedavisinin etkinliği.



Doksorubisin **Neferin**

Şekil 7. Doksorubisin ve neferinin kimyasal yapısı

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi. Hücre kültürü uygulamalarında biyogüvenlik kabini (Heraeus, Almanya), karbondioksitli inkübatör (Thermo Fisher Scientific, ABD), santrifüj (Centurion Scientific, UK) ve invert mikroskop (Nikon, Japonya) kullanıldı. Otomatik pipet seti (Gilson, Fransa), mikroplaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, ABD), soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya), nanodrop (Optizen, Güney Kore), termal sayklır cihazı (Applied Biosystems, ABD), gerçek zamanlı PCR sistemi (Applied Biosystems, ABD), +4 ve -20 °C buzdolapları (Vestel, Türkiye), -80 °C derin dondurucu (Wisd, Güney Kore), vorteks (İsolab, Türkiye), ultra saf su cihazı ve saf su (TKA, ABD), Tali sitometre (Initrogen, ABD), hassas terazi (Radwag, Polonya) ve florasan miroskop (Zeiss, Almanya) analizlerde farklı amaçlar için kullanıldı.

HÜCRE HATLARI

Yapılan çalışmada insan prostat kanser serisinden androjen-duyarlı LNCAP (CRL-1740) ve androjen-dirençli PC3 (CRL-1435) hücre hatları kullanıldı (American Type Culture Collection, ATCC, ABD). LNCaP hücre serisi kültür 1X Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, ABD), 1X RPMI, % 10 Fetal Sığır Serumu (FBS) (Gibco, ABD) ve % 1 Penisilin/Streptomisin (Gibco, ABD) içeren ortamda çoğaltıldı. PC3 hücreleri ise Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM F12), % 10 FBS, % 1 Penisilin/Streptomisin bulunan ortamda çoğaltıldı ve uygulamalarda kullanıldı.

HÜCRE DONDURMA, ÇÖZDÜRME VE PASAJLAMA

Kriyojenik vial içerisinde donmuş olarak temin edilen hücreler 37 ºC sıcaklığa getirilmiş su içerisinde 2 dk içinde çözündürülüp 15 ml santrifüj tüplerine alındı. Çözünen hücrelerin üzerlerine tam besi ortamı eklendi ve 150 g de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu dimetil sülfoksit (DMSO) (Santa Cruz Biotechnology, ABD) içeren besiyeri uzaklaştırılmış oldu. Hücre peletinin üzerine 3 ml besiyeri eklenerek süspanse edildi ve 25 cm² flasklara (Nest, ABD) ekimleri yapılarak 37 °C'de % 5 CO_2 içeren steril inkübatörde kültüre alındı.

Yeterli yoğunluğa ulaşan PC3 ve LNCaP hücrelerinin pasajlanması için flaskta bulunan besiyeri uzaklaştırıldı ve 37 °C sıcaklıktaki tripsin-EDTA (etilendiamin tetraasetikasit) (Gibco, ABD) solüsyonundan 1 - 3 ml eklendi ve etüvde PC3 hücreleri 10 dk,LNCaP hücreleri 3 dk bekletilerek besi kabının tabanından kalkmaları sağlandı.

Hücreler birbirlerinden ve zeminden ayrıldıktan sonra eklenen tripsin miktarı kadar medyum eklendi, 15 ml santrifüj tüplerine aktarılarak 150 g'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 12 ml medyum eklenerek yeni T75 flasklara (Nest, ABD) ekildi ve invert ışık mikroskobunda yoğunluğu kontrol edildi. Hücrelerin çoğalıp besi kaplarının tabanını doldurmaları için 3-4 gün inkübe edildi ve her iki günde bir besi yeri yenisi ile değiştirildi.

Hücrelerin dondurulması için tripsinizasyon sonrası PBS ile yıkanan hücre pelleti üzerine % 10 FBS ve % 5 DMSO içeren besiyeri eklenilerek süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 2 ml kriyojenik viyallere bölünerek önce 2-3 saat -20 °C'de bekletildi, sonra -80 °C derin dondurucuya, daha sonra da sıvı azot tankına alınarak kullanılıncaya kadar saklandı.

DOKSORUBİSİN VE NEFERİN ÇALIŞMA STOKLARININ HAZIRLANMASI

Doksorubisin (Sigma Aldrich, 85622-93-1) (Şekil 7A) liyofilize 5 mg olarak temin edilip +4 °C buzdolabında saklandı. Önce, 5 mg üzerine 919 µl steril saf su eklenerek 10 mM stok hazırlandı. Daha sonra stoktan 10 µl alınıp 9.990 µl medyum eklenerek 10 µM çalışma stoğu elde edidi. Bundan hücrelere 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078 ve 0,039 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde uygulandı.

Neferin (10236-47-2) (Şekil 7B) liyofilize 25 mg olarak temin edilip +4 °C'de saklandı. Stok hazırlamak için çözücü olarak 1,6 ml DMSO kullanıldı. Son

konsantrasyon 25 mM olacak şekilde neferin stok solüsyonu hazırlandı. Hücrelere 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 1,56 0,78 ve 0,39 µM konsantrasyonlarda uygulandı.

HÜCRE SAĞKALIM ANALİZLERİ: MTT TESTİ

Hücrelerin pasajlanması bölümünde anlatıldığı şekilde tripsinize edilen hücreler besiyeri ile karıştırılarak 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğunda yaklaşık $1x10^4$ hücre olacak şekilde 100 µL hücre karışımı ekildi. Hücrelerin plaka tabanlarına yapışması için 16-20 saat bekletildi, ardından doksorubisin ve neferin uygulamaları yapılarak 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Kontrol grubuna sadece taşıt uygulaması yapıldı.

Tedaviler sonrası kalan hücre sayısını belirlemek için MTT (triazolyum blue tetrazolyum bromid) sağkalım testleri yapıldı. Bunun için 96-kuyucuklu besi kaplarına MTT'nin PBS (fosfat bafır tuz) içindeki 1 mg/ml çözeltisinden çok kanallı pipet ile 50 µl eklendi. MTT solüsyonunun canlı hücrelerin mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimiyle yükseltgenerek formazan kristallerine dönüşmesi için plakalar hücre kültürü koşullarında 3 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki MTT içeren çözelti dökülerek uzaklaştırıldı ve metabolize olarak ortaya çıkan mor renkli boyanın çözünerek görünür hale gelmesi için kuyucuklara 200 µl DMSO pipetlendi. Yükseltgenme sonucu oluşan formazan kristalleri DMSO tarafından çözünmesi için 10 dk beklendi ve absorbanslar mikroplaka okuyucuda (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, ABD) 570 nm dalga boyunda belirlendi. Hesaplamada OD (optik değer) örnek / OD kontrol x 100 formülasyonu kullanıldı.

RNA İZOLASYONU

Bir gün önce 25 cm^2 flasklara (T25) ekilen hücrelerin medyumları alınarak, üzerlerine 2 ml içerisinde 0,625 µM doksorubisin, 40 µM neferin ve ikisinin kombinasyonu uygulandı ve 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda medyumları alınarak iki kez soğuk PBS ile yıkanan hücrelerden ticari RNA izolasyon kiti (Gene Jet Purifycation RNA Kiti, Life Technologies, ABD) kullanılarak total RNA'ları izole edildi.

Flasklara % 2 oranında 2-merkaptoetanol içeren lizis tamponundan 600 µl eklenerek oda ısısında 30 dk inkübe edildi. Membranı yıkımlanan hücreler 1,5 ml steril santrifüj tüplerine alındı ve üzerine 1:1 oranında % 70 etanol eklendi.

Beklenmeden vortekste karıştırıldıktan sonra spin kolonlara aktarılarak 12.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Altta biriken sıvı uzaklaştırılarak kolon üzerine 700 µl birinci yıkama tamponu eklendi ve 12.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolonların altta biriken sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Kolon üzerine 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve sonrası altta kalan sıvı uzaklaştırıldı. Kolon üzerine 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 2 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonrası altta kalan sıvı tüple birlikte atıldı. Kolon üzerindeki membranın kuruması için 2 dk 12.000 g'de santrifüj edildi, kuruyan kolon 1,5 ml hacminde steril toplama tüplerine alındı.

Kolonun tam merkezine 50 µl RNaz içermeyen su pipetlenerek oda ısısında bir dakika bekletildi. Daha sonra 12.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanan RNA 30-40 µl DNaz, RNaz içeren su ile çözdürülerek Nanodrop cihazında (Optizen, Nano Q, Güney Kore) miktarları ve saflıkları belirlendi ve kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

TAMAMLAYICI DNA (cDNA) SENTEZİ

İzole edilen RNA örneklerinden tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için Hight Capacity cDNA reverse transkription kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanıldı. cDNA sentezi için 200 µl PCR striplerine, 10 µl içinde 1 ng RNA, 10 µl cDNA ana karışımından pipetlendi. 10X ters transkripsiyon tamponu (2 µl), 25X dNTP karışımı (0,8 µl), 10X ters transkripsiyon rastgele primerleri (2 µl), ters transkriptaz (1 µl), nükleaz içermeyen su (4,2 µl) bileşenleri kullanıldı. Karışım PCR cihazında (Applied Biosystems, ABD) 25 °C'de 10 dk 37 °C'de 120 dk ve 85 °C'de 5 dk inkübe edilerek cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 °C derin dondurucuda saklandı.

KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PCR (qPCR) ANALİZLERİ

PC3 hücre hattında doksorubisin ve neferin uygulamaları sonucunda apoptozdan sorumlu *kaspaz 3, kaspaz 8 Bax, Bcl 2, Bcl-XL, p53, livin, survivin, sitokrom-c* hücre döngüsünden sorumlu genler olarak *p21, p27, CDK2, Cdk4, CDK6,* epitelyal mezenşimal geçişten sorumlu genler olarak *Snail, Slug, Twist* otofajiden sorumlu genlere ise *Beklin 1, ATG7* genlerin anlatımındaki değişimler RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak ise GAPDH

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) geninin anlatımı kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan primer dizgelerinde ileri primerler için F, geri primerler R kısaltması kullanıldı. GAPDH (F: TTGGTATCGTGGAAGGACTCA, R: TGTCATCATATTTGGCAGGTTT), Bax (F: CATGGGCTGGACATTGGACT, R: AAAGTAGGAGAGGAGGCCGT), kaspaz 3 (F: CAAACTTTTTCAGAGGGGATCG, R: GCATACTG TTTCAGCATGGCA), p53 (F: CACGAGCGC TGCTCAGATAGC, R: ACAGGCAC AAACACGCACAAA), Beclin 1 (F: GAGTGGATCCG CCGACGAGTA, R: GGCTGAGA GACTGGATCAGG), ATG7 (F: ACCCAGAAGAAGCTGAACGA, R: CTCATTTGCTGCTTGTTCCA). CDK 2 (F: GTACCTCCCCTGGATGAAGAT, R: CGAAATCCGCTTGTTAGGGTC), CDK 4 (F: CTGGTGTTTGAGCATGTAGACC, R: GATCCTTGATCGTTTCGGCTG), CDK 6 (F: AGACCCAAGAAGCAGTGTGG, R: AAGGAGCAAGAGCATTCAGC PTEN (F: GCGGAACTTGCAATCCTCAGT, R: AACTTGTCTTCCCGTCGTGT), Snail (F: CAACCCACTCAGATGTCAA, R: CATAGTTAGTCACACCTCGT), p21 (F: GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA, R: GACTCTCAGGGTCGAAAACG), TRAIL-R (F: TAGAGAAGGAAGGGCTTCAGTGACCG, R: TCCTCTGGTCCCAGTTATGTGAGCTG), Bcl-XL (F: GTAAACTG GGGTCGCATTGT, R: TGGATCCAAGGCTCTAGGTG), Survivin (F: GACGACCCCATAGAGGAACA, R: GACAGAAAGGAAAGCGCAAC), kaspaz 8 (F: CTGCTGGGGATGGCCACTGTG, R: TCGCCTCGAGGACATCGCTCTC), Sitokrom c (F: TGGGCCAAATCTCCATGGTC, R: AGGCAGTGGCC AATTATTACTCA).

RT-qPCR analizinde daha önce cDNA eldesi bölümünde anlatılan şekilde elde edilen cDNA'lar kullanıldı. 96 kuyucuklu reaksiyon plakasında, her bir kuyucuğa toplam hacim 12 µl olacak şekilde primer, su, SYBR green ve cDNA pipetlendi. RT-qPCR cihazında reaksiyon; 1 döngü 2 dk 50 ºC ve 10 dk 95 ºC, bunu takiben, 40 döngü denatürasyon (95 ºC 15 sn) ve primer eşleşmesi (annealing) ve zincir uzaması (elongasyon) (60 ºC'de 1 dk) olacak şekilde başlatıldı.

SİTOMETRİK APOPTOZ ANALİZLERİ

Tali görüntü tabanlı sitometre ile apoptoz analiz çalışmaları Tali Apoptoz Kiti-Anneksin V (AlexaFluor 488) ve Propidyum iyodür (Life Technologies) kiti kullanılarak kit prosedürüne göre yapıldı. Anneksin V yalnızca apoptotik hücrelerdeki fosfatidilserin fosfolipidine bağlanan (normal sağlıklı hücrelerde sitozole bakan

yüzeyde olan fosfatidilserin apoptoz esnasında hücre dışına bakan yüzeye geçer) ve Tali sitometre cihazında yeşil floresanda ışıma yapan bir moleküldür. Propidyum iyodid ise yalnızca ölü hücrelerin zarlarından geçen ve nukleusdaki kırılmış olan DNA parçacıklarına bağlanarak ışıma yapan Tali sitometre cihazında kırmızı ışıma veren bir moleküldür.

Tali sitometre ile apoptoz analizi için T25 flasklara 3 ml besiyeri ile birlikte yaklaşık $7.5x10^5$ hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı. Ekimi yapılan hücrelere 0,625 µM doksorubisin,40 µM neferin uygulamaları yapıldı. 48 saat inkübasyona bırakılan hücreler bu süre sonunda TALI apoptoz kit protokolüne göre işleme tabi tutuldu; kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp tripsinize edilen hücreler 150 g'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Sonrasında PBS ile süspanse edilerek yıkandı ve tekrar santrifüj edildi.

Çöken hücrelerin üzerine 100 µl 1X Annexin bağlanma tamponu eklendi. Bu karışımın her 100 µl'si için 5 µl Annexin V ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Karanlık oda ısısında 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücre karışımı 1.500 g'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatan uzaklaştırıldı. Peletlerin üzerine 100 µl 1X Annexin bağlanma tamponu eklenerek tekrar karıştırıldı. Bu karışıma 1 µl Propidyum iyodür solüsyonu eklenerek karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler içerisindeki hücre karışımından 25 µl alınarak Tali kiti ile alınan özel lamlara pipetlendi ve Tali sitometre cihazı (Invitrogen, Tali Image Based Cytometer) ile analizi yapıldı.

HOECHST APOPTOZ ANALİZLERİ

Hoechst boyama apoptotik hücreleri mikroskobik olarak görüntüleyebilmek için T25 flasklara ekilen hücreler bir gece inkübasyonda bırakıldı. İnkübasyon sonrasında doz uygulamaları gerçekleştirildi. 48 saat sonunda flasklardaki medyum uzaklaştırılıp PBS ile yıkandıktan sonra 1 mg/ml PBS'de çözdürülen Hoechst boyasından 2 ml miktarında flasklara eklenildi, 5 dk sonrasında fluorasan invert mikroskopta DAPI filtresiyle 40X büyütmede görüntülendi.

SİTOMETRİK HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZLERİ

Sitometre ile hücre döngüsü analizi apoptoz analizine benzer şekilde T25 flasklara 3 ml besiyeri ile birlikte yaklaşık $7.5x10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapılarak bir gece inkübatörde bekletildi. Hücre sıvı medyumlarına 0,625 µM doksorubisin,40 µM neferin eklenerek 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar sonunda flasklardaki besiyeri uzaklaştırılıp tripsinize edildi ve sonrasında ayrışan hücreler 150 g'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.

PBS ile yıkanan hücreler % 70 etil alkol ile bir gece inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkanıp santrifüj edildikten sonra üretici firmanın belirtmiş olduğu hücre döngüsü analiz kiti protokolüne göre süspanse edilerek 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler içerisindeki hücre karışımından 25 µl alınarak Tali özel lamlarına pipetlendi ve Tali sitometre cihazı (Invitrogen, TALİ Image Based Cytometer) ile analizi yapıldı.

HÜCRE MİGRASYON ANALİZLERİ

Yara iyileşmesi deneyi için T25 flasklara ekilen hücreler, çoğalıp, yapıştıkları zemini tamamen doldurabilmeleri için ekildikten sonra inkübasyonda bırakıldı. Flask tabanını dolduran hücrelerin bulunduğu zemine 200 µl'lik pipet ucuyla iki ayrı çizik atıldı ve PBS ile yıkandı, sonrasında serumsuz besi yeri ile neferin ve doksorubisin uygulamaları yapıldı. Kırk sekiz saat süresince belirli aralıklarla fotoğrafları çekilerek oluşturulan yaranın açıklığı bilgisayar ortamında genişlikleri ölçülerek santimetre cinsinden kayıt altına alındı.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi lisanslı SPSS 20 (IBM, ABD) programı ile yapıldı. Tali analizinde yazılım ile elde edilen canlı hücre, ölü hücre ve apoptotik hücre değerleri ve qRT- PCR gerçek zamanlı gen ifadesi çalışmalarında ΔΔCt metodu ile elde edilen ekspresyon değerlerinin arasındaki farklar tek yönlü ANOVA analizi (Tukey, Duncan ve LSD testleri yapıldı) ile karşılaştırıldı. % 50 inhibisyon konsantrasyonu değerleri

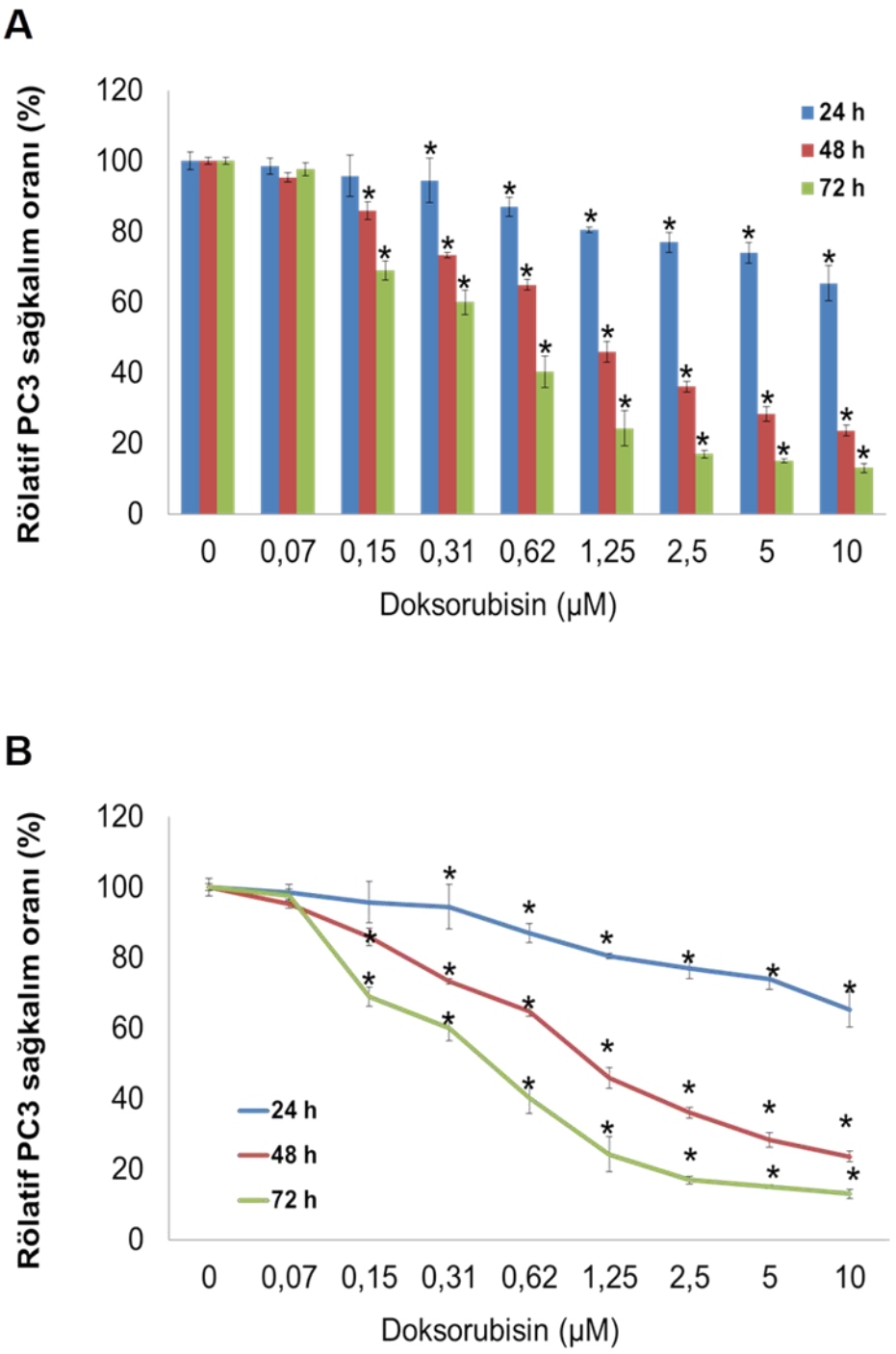
(IC50) GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Yazılımı, Inc., La Jolla, CA, ABD) kullanılarak belirlendi. Elde edilen ”*p*” değerleri 0.05’den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

HÜCRELERDE SAĞKALIM ANALİZLERİ

Yürütülen bu çalışmada androjen-dirençli (PC3) ve androjen-duyarlı (LNCaP) hücrelerin sağkalımlarına doksorubisin ve neferin uygulamalarının ayrı ve kombine etkileri değerlendirildi. Doksorubisin ve neferinin hücrelerde % 50 inhibisyon dozu (inhibition consantration 50: IC_{50}) belirlendi.

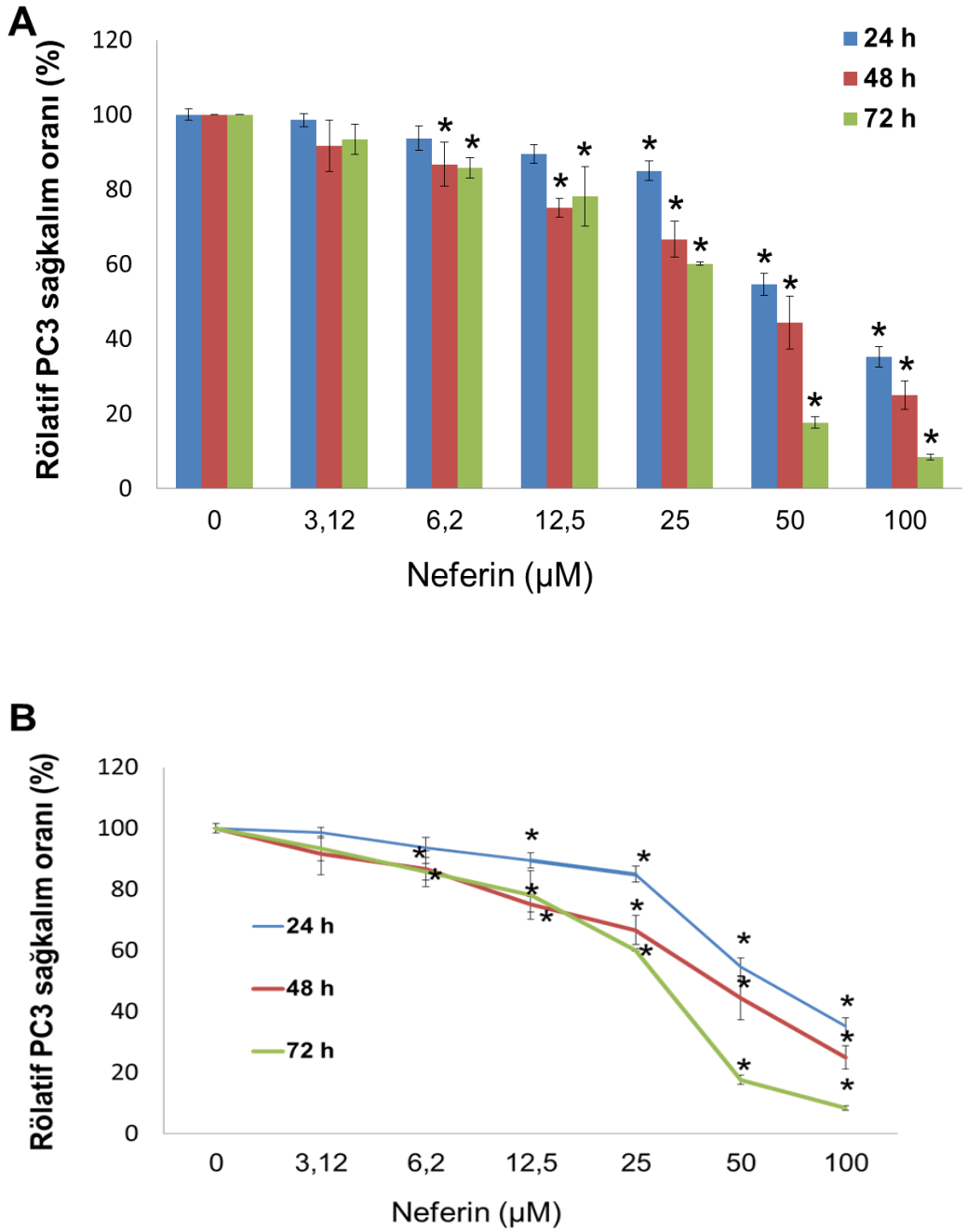
Doksorubisin PC3 hücrelerine 0,07-10 µM konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saat süresince uygulandı. İnkübasyonlar sonrasında MTT testi ile hücre canlılığı belirlendi (Şekil 8). Yapılan çalışmalar sonucunda hücre canlılığında kontrole göre 48 saatlik uygulamada IC_{50} değeri 0,6253 (0,08013 - 63,82) µM olarak saptandı ($p<0,05$). Sonuçlar bar (A) ve çizgi (B) grafiklerinde verildi.



Şekil 8. Doksorubisin uygulanan PC3 hücrelerinde inkübasyon süresi ve doza bağlı hücre sağkalımına etkisi. *p<0,05 kontrol grubu.

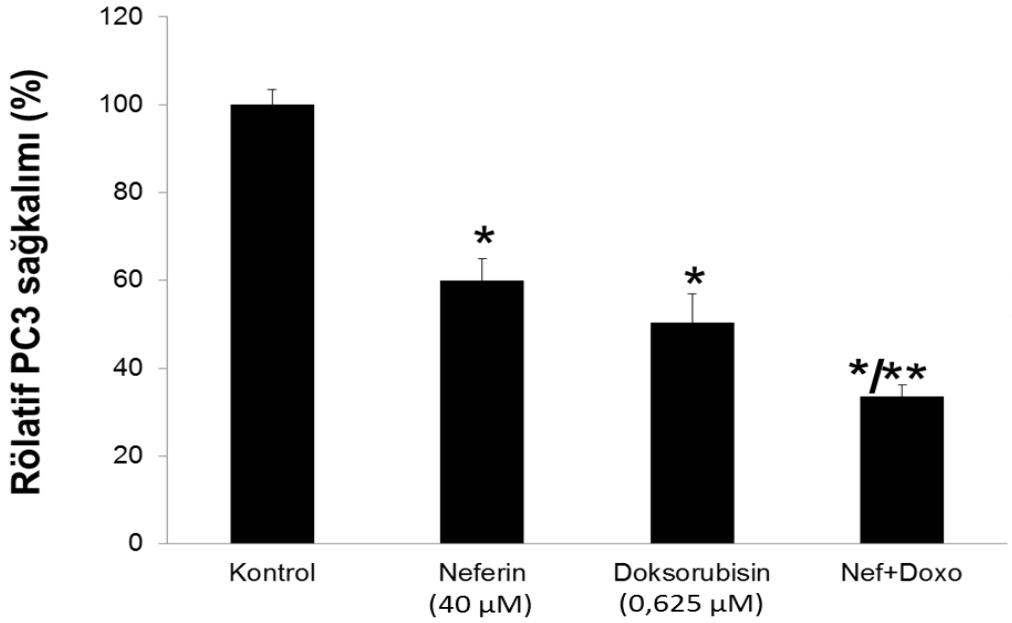
Neferinin PC3 hücrelerinde konsantrasyon ve inkübasyon süresine göre hücre sağkalımına etkisi belirlendi. Bu molekül hücrelere 0-100 µM konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saat süresince uygulandı. Her bir tedavi sonrasında MTT testi ile hücre

canlılığı tespit edildi (Şekil 8). Yapılan analizlere göre hücre canlılığında kontrole göre 48 saatlik uygulamada IC_{50} değeri 39,842 µM (25,33 - 62,65) olarak hesaplandı ($p<0,05$). Elde edilen sonuçlar bar (A) ve çizgi (B) grafiğinde verildi.



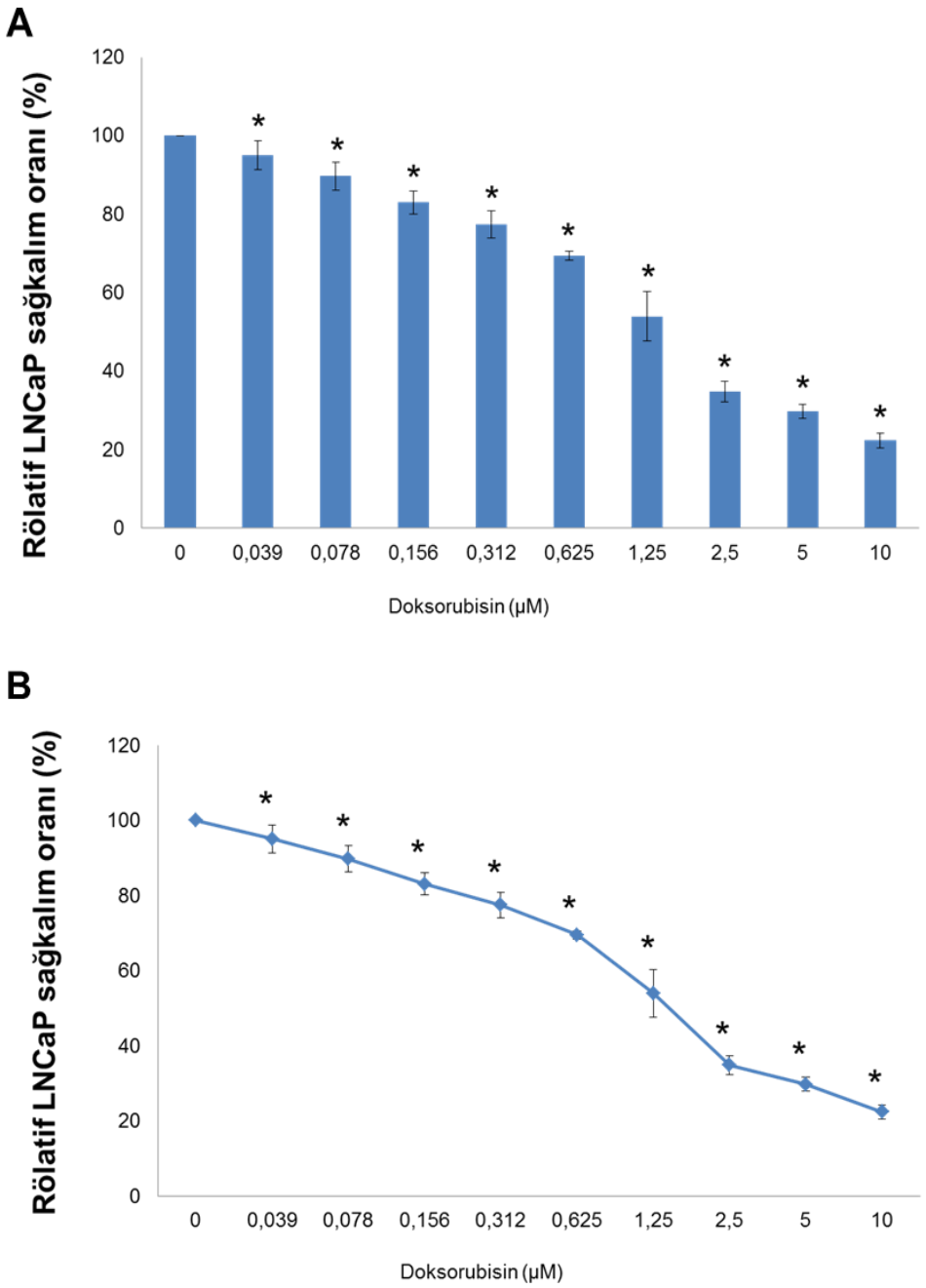
Şekil 9. Neferin uygulanan PC3 hücrelerinde inkübasyon süresi ve konsantrasyona bağlı hücre sağkalımına etkisi. *$p<0,05$ kontrol grubu.

IC_{50} konsantrasyonları 48 saat için belirlenen doksorubisin ve neferin PC3 hücrelerinde ayrı ayrı ve birlikte kullanılarak kombine tedavi etkinliği belirlendi. Elde edilen verilere göre kombinasyon her bir farmakolojik ajanın ayrı kullanımına göre daha yüksek oranda PC3 hücrelerini öldürdü (Şekil 9). Neferin hücrelerde % 35,8±0 oranında, doksorubisin % 39,6±0 oranında hücre ölümüne neden olurken; iki farmakolojik ajanın birlikte kullanımı hücrelerde % 58,5±0 oranında viyabilite kaybına yol açtı.



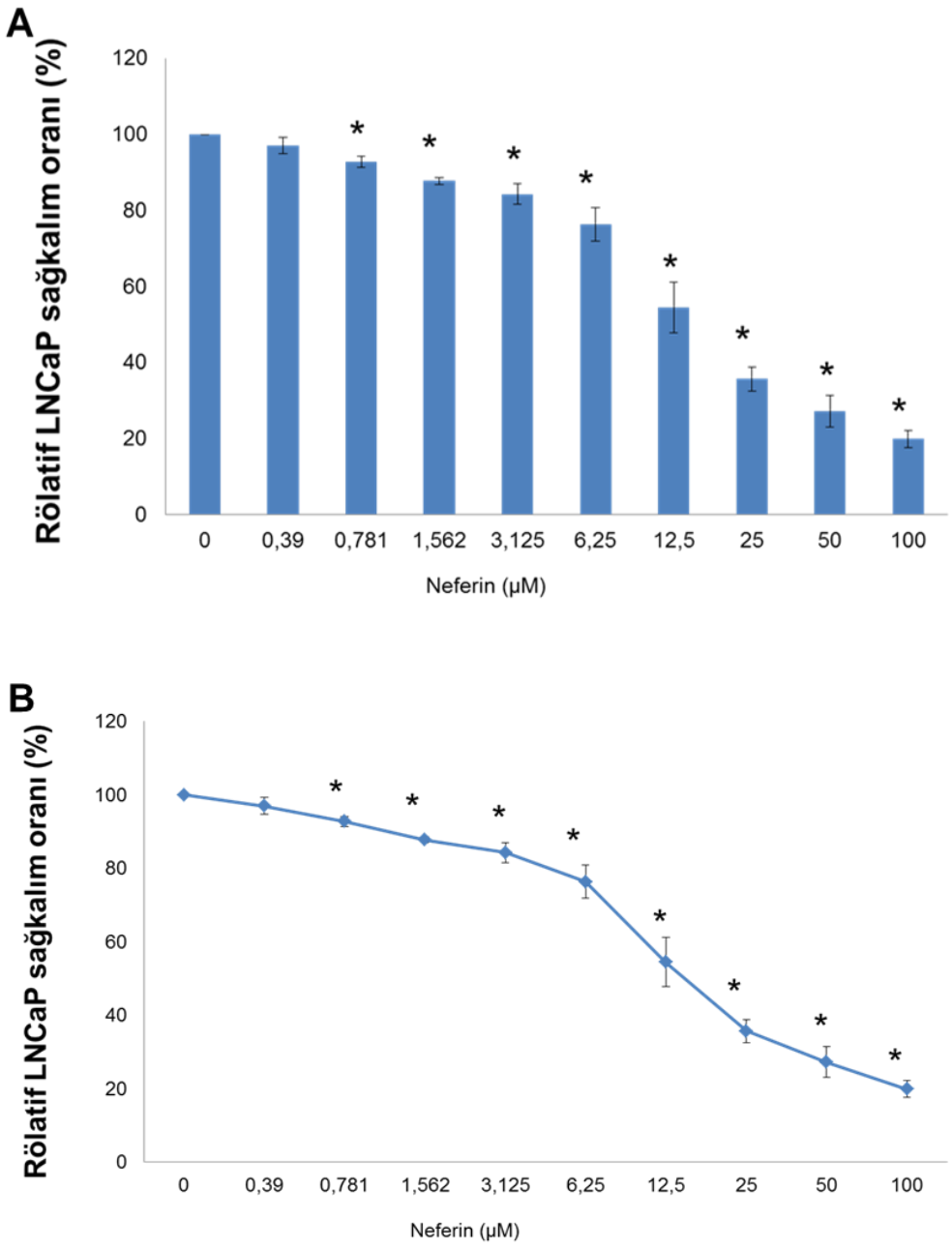
Şekil 10. Neferin, doksorubisin ve kombinasyonun PC3 hücre sağkalımına etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0,05 kontrol,p<0,05 neferin ve doksorubisin.**

Doksorubisin androjene duyarlı prostat kanseri LNCaP hücrelerinde konsantrasyon ve inkübasyon süresine göre hücre sağkalımına olan etkisi analiz edildi. Hücreler farklı konsantrasyonlardaki doksorubisine (0,039 - 10µM) 48 saat süresince maruz bırakıldı ve bu süre sonunda hücre viyabilitesi MTT testi ile saptandı (Şekil 10). Sonuçlar bar (A) ve çizgi (B) grafiğinde verildi. Hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalma saptandı. PC3 hücreleri için belirlenen doksorubisinin IC_{50} konsantrasyonu bu hücrelerde de uygulandı.



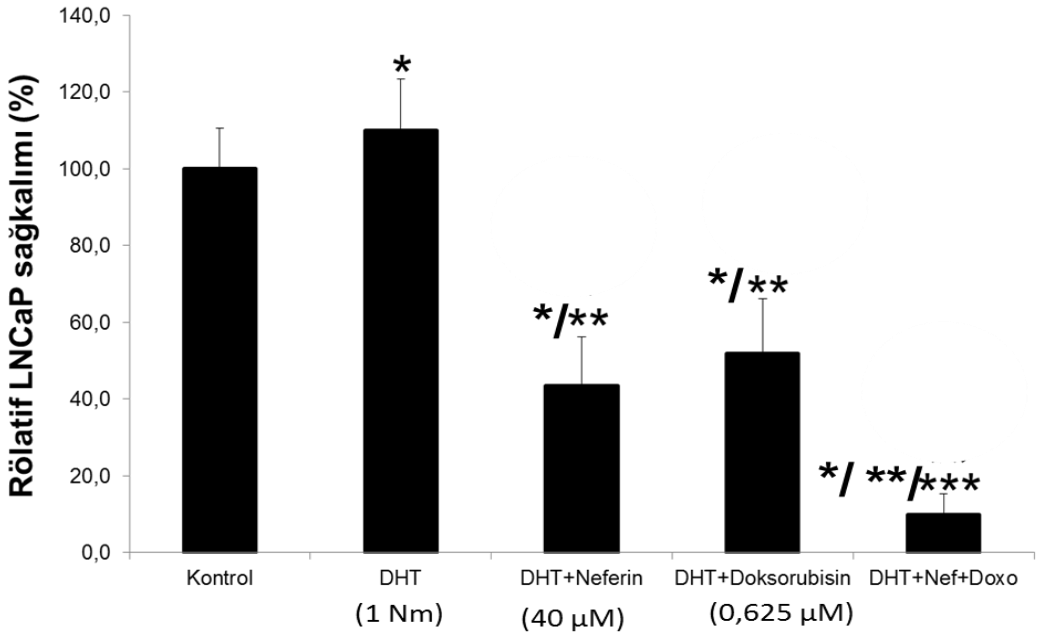
Şekil 11. Doksorubisin terapisinin LNCAP hücrelerinde konsantrasyona bağlı hücre sağkalımına etkis. *p<0,05 kontrol grubu.

LNCAP hücre sağkalımına neferinin olası öldürücü etkisi değerlendirildi. Bunun için hücreler 48 saat süresince 0,39 - 100 µM konsantrasyonlarında neferin ile inkübe edildi. Süre sonunda spektrofotometrik MTT testi ile hücrelerde sağkalım oranları belirlendi (Şekil 11). Veriler bar (A) ve çizgi (B) grafiğinde verildi. PC3 hücreleri için belirlenen neferinin IC_{50} konsantrasyonu bu hücreler için de uygulandı.



Şekil 12. Neferinin LNCaP hücrelerinde konsantrasyona bağlı hücre sağkalımına etkisi. *p<0,05 kontrol grubu.

Yüzde 50 konsantrasyonları 48 saat için belirlenen doksorubisin ve neferin LNCaP hücrelerinde fizyolojik düzeyde dihidrotestosteron ile birlikte kullanılarak etkinliği belirlendi. Elde edilen verilere göre 1 nM DHT hücre sağkalımını yaklaşık % 16±0 düzeyinde artırmaktadır (Şekil 12). Kombinasyon terapisi DHT'ye göre % 96,7±0 oranda, neferine göre % 21,4±0 doksorubisine göre % 22±0 oranda LNCaP hücrelerini öldürdü (Şekil 12).

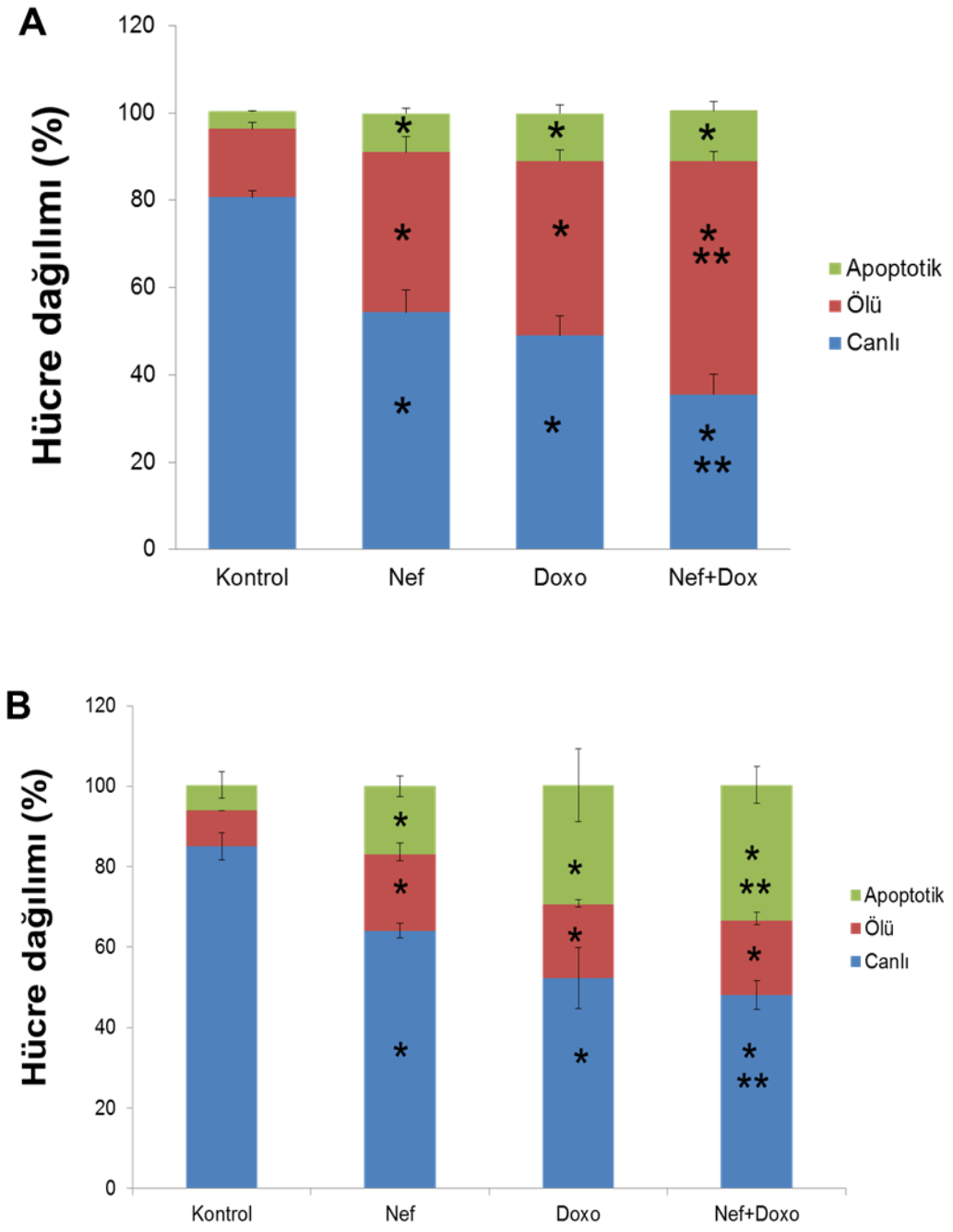


Şekil 13. LNCaP hücrelerinde neferinin ve doksorubisin tedavi etkinliğietkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin, DHT: dihidrotestosteron. *p<0,05 kontrol, **p<0,05 DHT, ***p<0,05 DHT+neferin ve DHT+doksorubisin.

SİTOMETRİK APOPTOZ ANALİZLERİ

Tedavi amaçlı yapılan uygulamaların hücre ölümündeki etkileri hücre-tabanlı sitometre cihazı kullanılarak değerlendirildi. Bunun için 40 µM neferin, 0.625 µM doksorubisin ve ikisinin kombinasyonu PC3 hücrelerine uygulanarak 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri özel kit kullanılarak Tali sitometrede belirlendi. Verilere göre doksorubisin ve neferin gruplarında ölü hücre oranı kontrole göre sırasıyla % 24,33±7,8 ve % 21±5,3 olarak anlamlı düzeyde yüksekti (Şekil 13). Kombinasyon terapisi ayrı uygulamalara göre % 37,83±5,5 oranında ölü hücre oranında anlamlı bir artış oluşturdu. Tek ve kombine doksorubisin ve neferin gruplarında apoptotik hücre oranlarında kontrole göre istatiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Kontrole kıyasla en yüksek apoptotik hücre oranı sırasıyla kombinasyon, doksorubisin ve neferin uygulaması olarak sıralandı. Verilere göre doksorubisin, neferin ve kombinasyon gruplarında apoptotik hücre oranı kontrole göre sırasıyla % 4,83±4,1, % 6,83±2,7, % 7,5±4,1 olarak anlamlı düzeyde

artırdı. Doksorubisin, neferin ve kombinasyon uygulanan PC3 hücrelerinde 48 saat sonra elde edilen sitometrik sonuçlar (A) da verildi (Şekil 13).



Şekil 14. A: PC3, B: LNCaP hücresi. PC3 ve LNCAP hücrelerinde neferin ve doksorubisin tedavisinin hücre ölümü ve apoptoz üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. **p<0.01 kontrol, **p<0.01 neferin ve doksorubisin.

LNCaP hücrelerinde 0,625 µM doksorubisin, 40 µM neferin ve kombinasyon gruplarında ölü hücre oranı kontrol grubuna göre neferinin % 10±1,4 oranında,

doksorubisinin % 9,25±0,6 oranında ve kombine terapinin % 9,5±1 oranında istatiksel olarak anlamlı bir artışta bulundu. Kombinasyon grubundaki apoptotik olmayan hücre ölümü neferin ve doksorubisin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermedi.

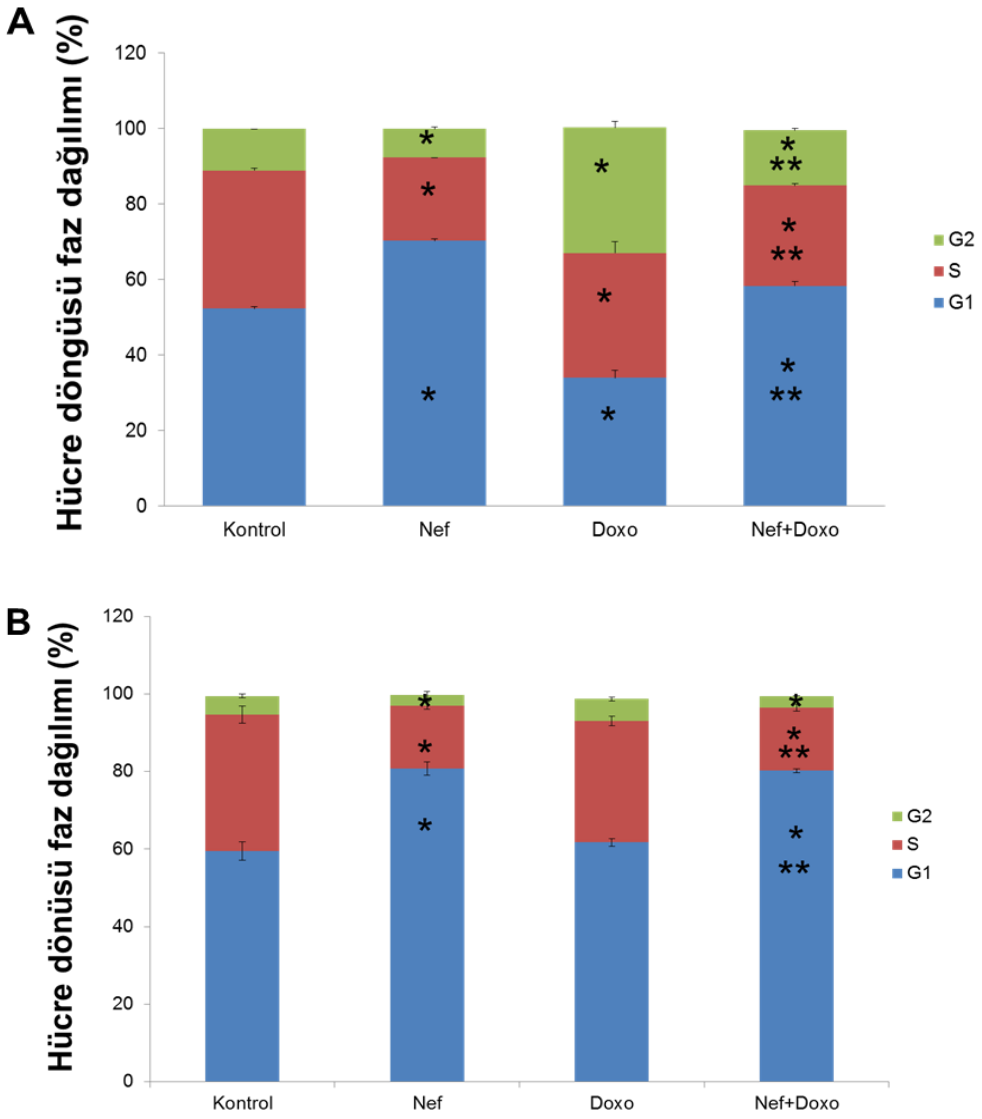
Yapılan analizlere göre tek ve kombine doksorubisin ve neferin tedavi gruplarında apoptotik hücre oranlarında kontrole göre neferinin % 10,75±1,2 oranında doksorubisinin % 23,5±4,5 oranında ve kombine terapinin % 27,5±2,2 oranında istatiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Kontrole kıyasla en yüksek apoptotik hücre oranı sırasıyla kombinasyon, doksorubisin ve neferin uygulaması olarak sıralandı. Doksorubisin, neferin ve kombinasyon uygulanan LNCaP hücrelerinde 48 saat sonra elde edilen sitometrik sonuçlar (B) de verildi (Şekil 14).

SİTOMETRİK HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

Prostat kanser hücrelerinin tedavisinde kullanılan doksorubisin ve neferin ile birleşik kullanımlarının hücre döngüsü fazlarına etkisini belirlemek için Tali görüntü tabanlı sitometrik hücre döngüsü analizleri yapıldı.

Neferin PC3 hücrelerinde G1 evresindeki hücre yüzdesini kontrol grubuna göre % 18±0,3 düzeyinde artırmaktadır. Doksorubisin ise G1 evresindeki hücre yüzdesini kontrol grubuna göre % 18±1,1 azalmıştır. Kombinasyon tedavisi G1 evresindeki hücre sayısını kontrol grubuna göre % 5,7±0,6 artmıştır. Ancak kombinasyon grubunda görülen G1 evresindeki hücre yüzdesi neferin tedavisine göre anlamlı bir artış olduğu görülmemiştir. Buna göre kontrole kıyasla en yüksek G1 evresindeki hücre yüzdesi sırasıyla neferin ve kombinasyon tedavileri sonrasında doksorubisin tedavisi gelmektedir.

Doksorubisin, neferin ve kombinasyonun 48 saat tedavileri PC3 hücrelerinde G1, S ve G2/M hücre yüzde dağılımları grafik (Şekil 15A)'da verildi.



Şekil 15. A: PC3, B: LNCaP hücresi. PC3 ve LNCAP hücrelerinde neferin ve doksorubisin terapisinin hücre döngüsüne etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 doksorubisin.

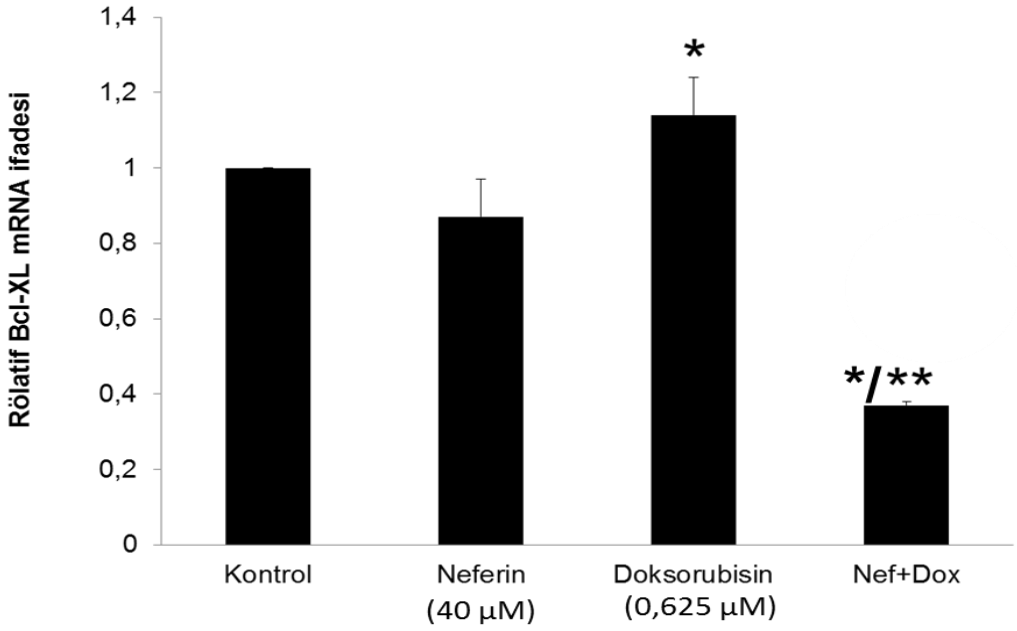
LNCaP hücrelerine uygulanan 40 µM neferin G1 hücre yüzdesini kontrol grubuna göre % 21,25±0,8 oranında anlamlı düzeyde arttırmaktadır. Doksorubisin ise G1 evresindeki hücre yüzdesini kontrol grubuna göre % 2,25±0,4 oranında artırmaktadır. Kombinasyon tedavisi G1 evresindeki hücre sayısını kontrol ve doksorubisin gruplarına göre % 20,75±0,2 oranında anlamlı düzeyde artırmaktadır. Kombinasyon grubunda görülen G1 evresindeki hücre yüzdesi neferin tedavisine göre anlamlı bir artış olduğu görülmemiştir. Buna göre kontrole kıyasla en yüksek G1 evresindeki hücre yüzdesi sırasıyla neferin ve kombinasyon tedavileridir (Şekil 15).

GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

PC3 hücreleri 40μM neferin ve 0,625 μM doksorubisine 48 saat süresince maruz bırakıldı. 48 saatlik İnkübasyon sonunda elde edilen RNA örneklerinde önce cDNA sentezi sonrasında kantitatif PCR analizleri uygulandı. Bu analizlerde *Bcl-XL, Bax, kaspaz-3, kaspaz-8, p21, p53, CDK 2, CDK 4, CDK 6,* genlerini mRNA ifadelerindeki değişiklikler belirlendi. Analizler iki farklı RNA örneğinde ve üç tekrarlı olarak uygulandı, elde edilen verilerde istatistiksel analizler yapıldı.

Bcl-XL Gen İfadesi

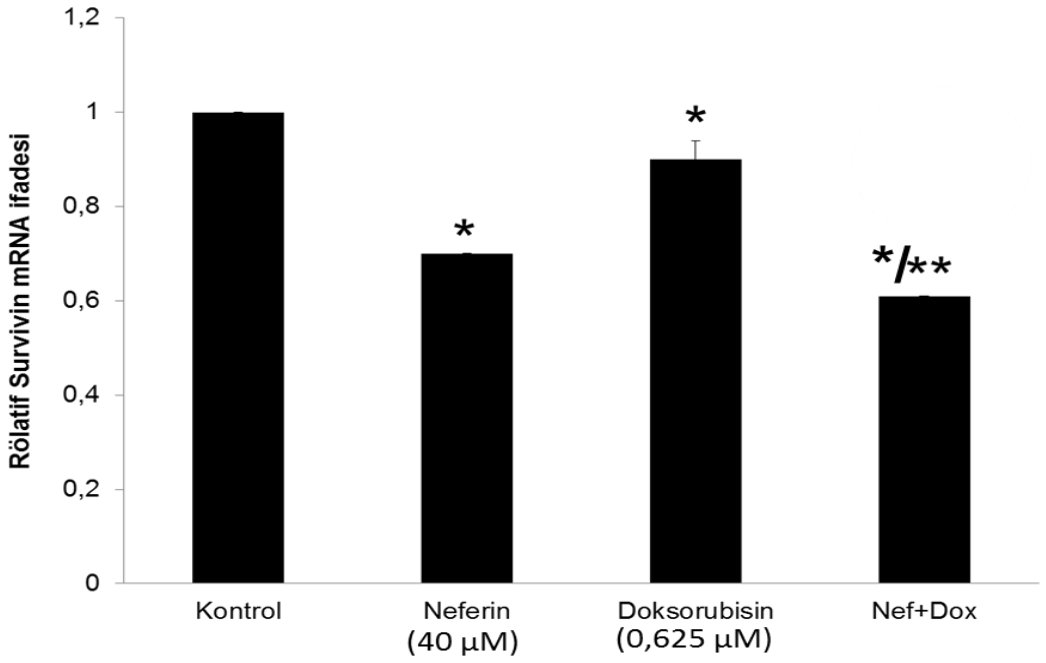
Yapılan tedavi uygulamaları sonunda gerçekleşen hücre ölümlerinin sebepleri yapılan RT-qPCR analizleri ile belirlenmeye çalışıldı. Buna göre Bcl- XL mRNA ifadesi 40 μM neferin tarafından kontrole göre 0.1 kat azalış gösterirken, 0,625 μM doksorubisin tedavisi BCL-XL gen ifadesinde kontrole göre 0.2 kat artış göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise BCL-XL gen ifadesinde kontrol grubuna göre 0.6 kat neferin tedavisine göre 0.5 kat ve tek başına doksorubisin tedavisine göre ise 0.8 kat düşürdü (Şekil 16).



Şekil 16. Neferin ve doksorubisin tedavi uygulamasının Bcl-XL mRNA anlatımına etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.05 kontrol, **p<0.05 doksorubisin.

Survivin Gen İfadesi

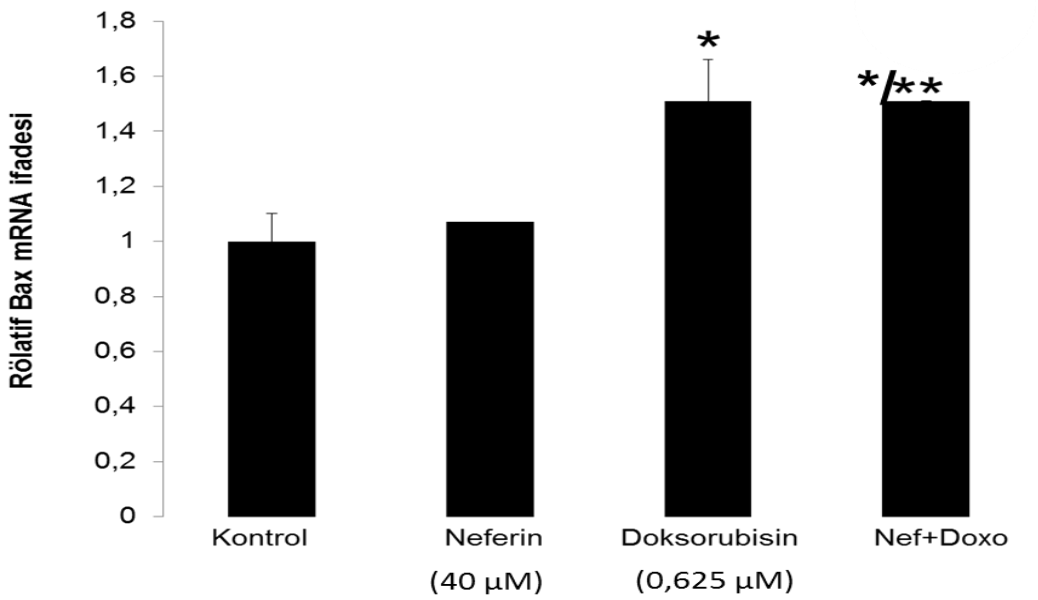
Doksorubisin, neferin ve kombinasyon tedavileri uygulamaları ardından RT-PCR analizleri ile hücrelerin ölüm sebepleri araştırıldı. 40 µM neferin tedavisi survivin mRNA ifadesinde kontrole göre 0.3 kat azalış gösterirken, 0,625 µM doksorubisin tedavisi survivin gen ifadesindeki kontrole göre 0.1 kat azalış göstermiştir. Kombinasyon tedavisinde ise survivin gen ifadesinde kontrol grubuna göre 0.4 kat azalış görülürken doksorubisin tedavisine göre 0.1 kat ve neferin tedavisine göre 0.3 kat azalış görüldü (Şekil 17).



Şekil 17. Neferinin ve doksorubisin tedavisinin Survivin gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontol, **p<0.01 doksorubisin.

BAX Gen İfadesi

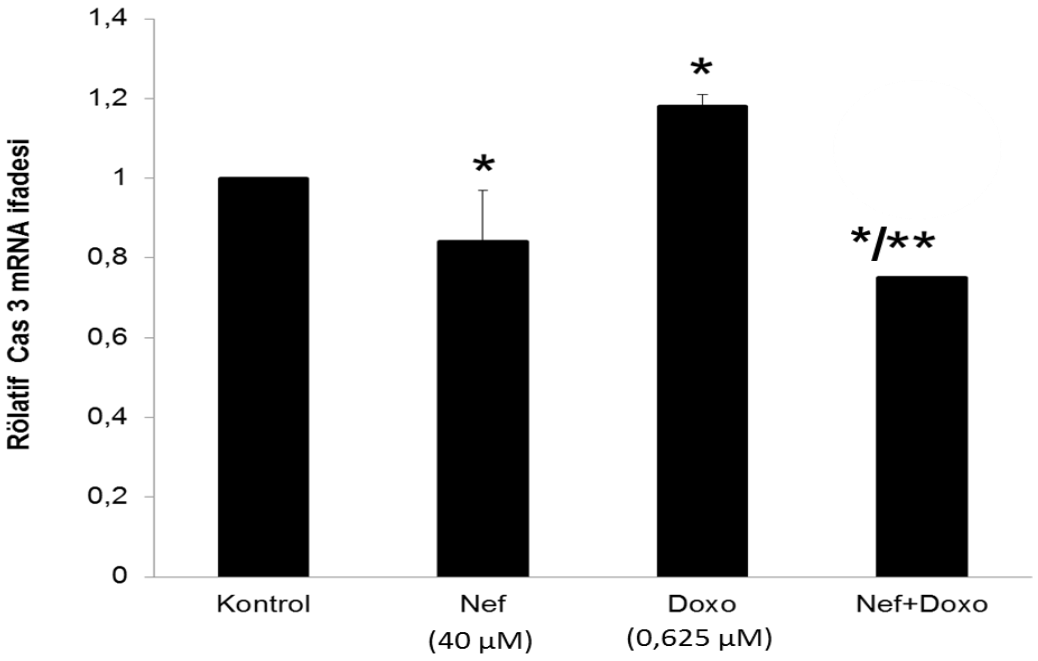
PC3 hücre serilerinde 48 saatlik doksorubisin, neferin ve kombinasyon tedavileri uygulandı. 40 µM neferin tedavisi BAX gen ifadesini kontrole göre 0.1 kat arttırırken 0,625 µM doksorubisin tedavisi BAX gen ifadesini kontrole göre 0.5 kat artırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise BAX gen ifadesini kontrol grubuna göre 0.5 kat artırmıştır (Şekil 18).



Şekil 18. Neferinin ve doksorubisinin Bax gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 doksorubisin.

Kaspaz-3 Gen İfadesi

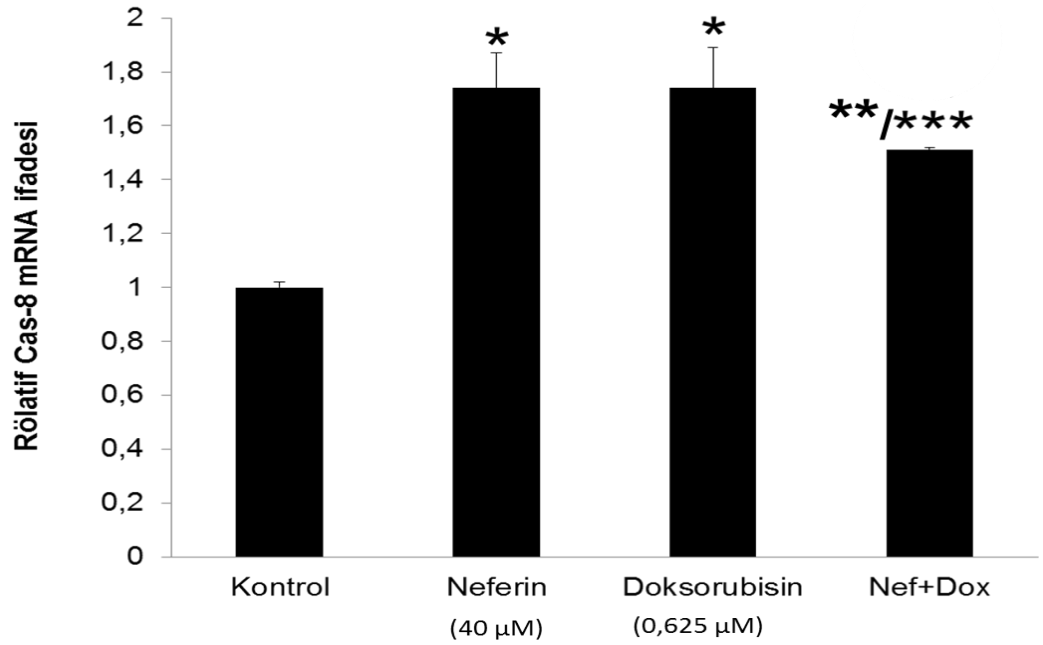
0,625 µM doksorubisin, 40 µM neferin ve kombinasyon tedavileri uygulamaları sonunda RT-PCR analizleri ile hücre ölümlerinin sebepleri belirlenmeye çalışıldı. *Kaspaz-3* mRNA ifadesini kontrole göre 0.2 kat azaltırken doksorubisin tedavisi *kaspaz-3* gen ifadesini kontrole göre 0.3 kat artırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise *kaspaz-3* gen ifadesini neferin tedavisine göre 0.2 kat arttırmaktayken doksorubisin tedavisine göre ise 0.2 kat azaltmıştır (Şekil 19).



Şekil 19. Neferinin ve doksorubisinin kaspaz-3 gen anlatımına üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 neferin ve doksorubisin.

Kaspaz-8 Gen İfadesi

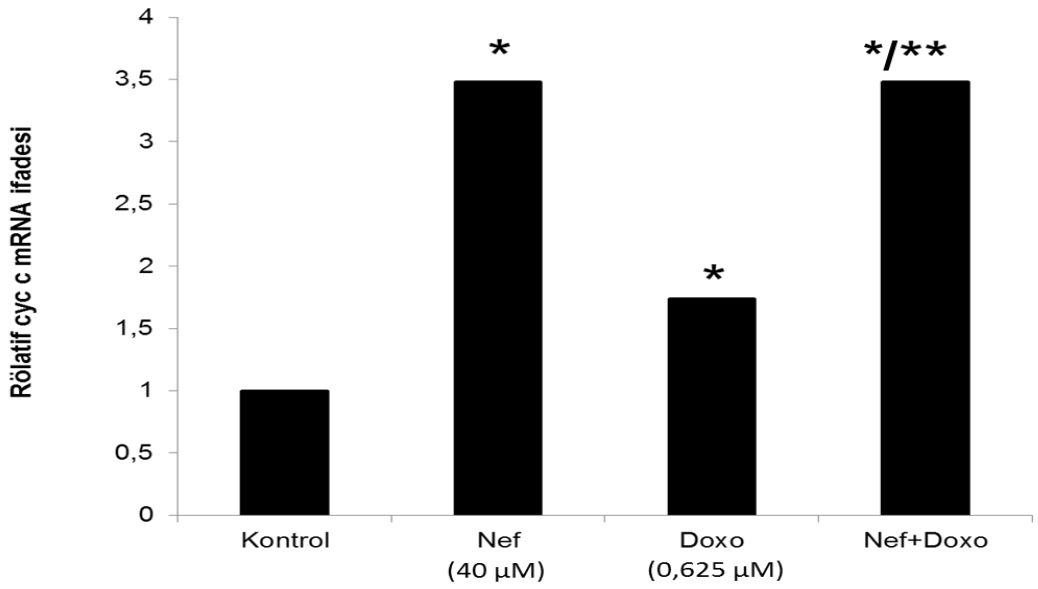
40 µM neferin *Kaspaz-8* mRNA ifadesini kontrole göre 0.8 kat arttırmaktayken 0,625 µM doksorubisin tedavisi *kaspaz-8* gen ifadesini kontrole göre 0.8 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise *kaspaz-8* gen ifadesini kontrol grubuna göre 0.6 kat arttırmış neferin ve doksorubisin tedavilerine göre 0.2 kat azaltmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Neferinin ve doksorubisinin kaspaz-8 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.05 neferin, ***p<0.01 doksorubisin.

Sitokrom-c (Cyc-c) Gen İfadesi

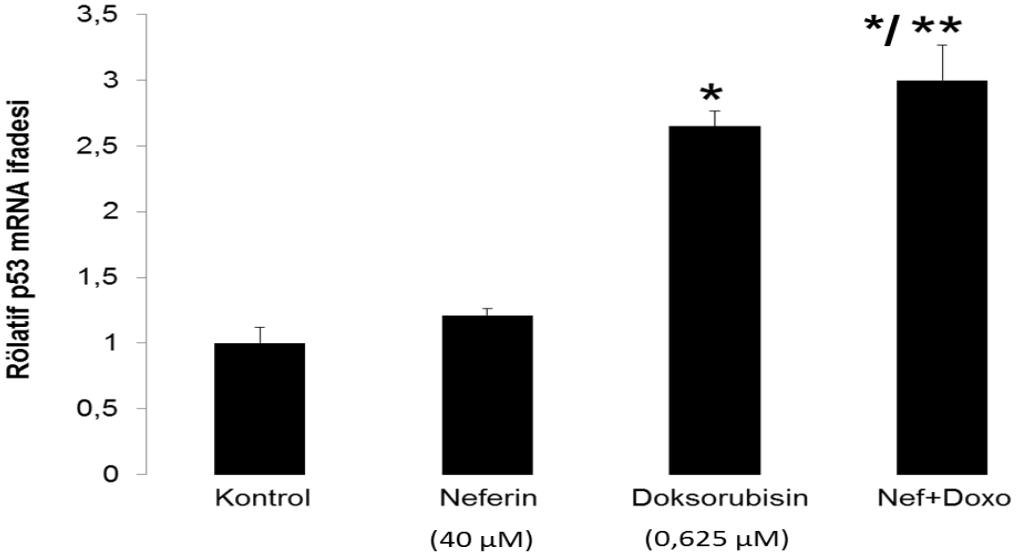
40 µM neferin tedavisi *Sitokrom c* mRNA ifadesini kontrole göre 3.5 kat arttırırken 0,625 µM doksorubisin tedavisi *Sitokrom c* gen ifadesini kontrole göre 0.8 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise Sitokrom c gen ifadesini kontrol grubuna göre 3.5 kat arttırırken doksorubisin tedavisine göre 1.70 kat arttırmıştır (Şekil 21).



Şekil 21. Neferinin ve doksorubisinin Sitokrom c gen anlatımına etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 doksorubisin.

p53 Gen İfadesi

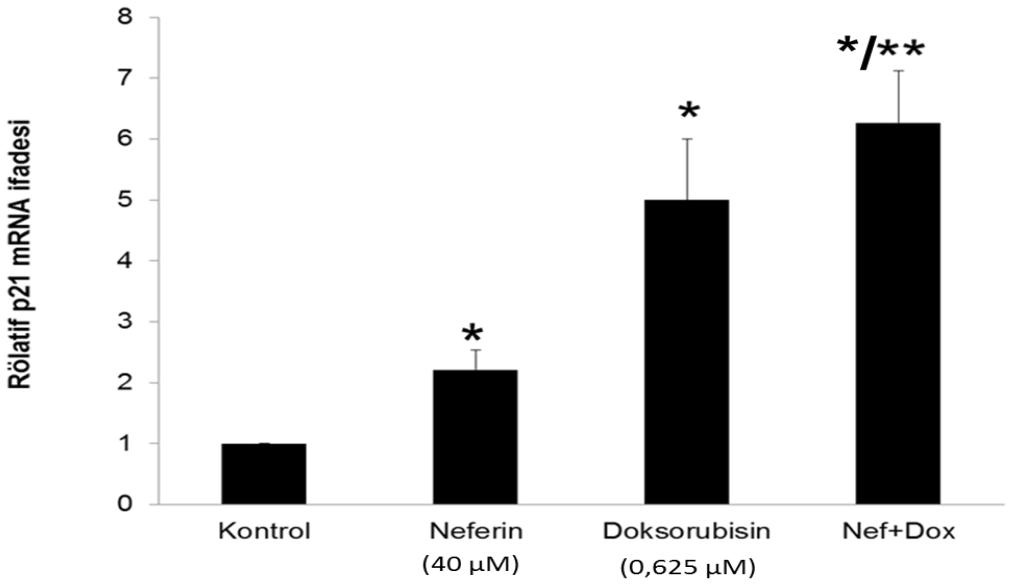
40 µM neferin tedavisi p53 mRNA ifadesini kontrole göre 0.3 kat arttırmışken 0,625 µM doksorubisin tedavisi p53 gen ifadesini kontrole göre 2.80 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise p53 gen ifadesini kontrol grubuna göre 3 kat arttırırken neferin tedavisine göre 2.5 kat, doksorubisin tedavisine göre 0.2 kat artmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. Neferinin ve doksorubisinin P53 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 neferin ve doksorubisin.

p21 Gen İfadesi

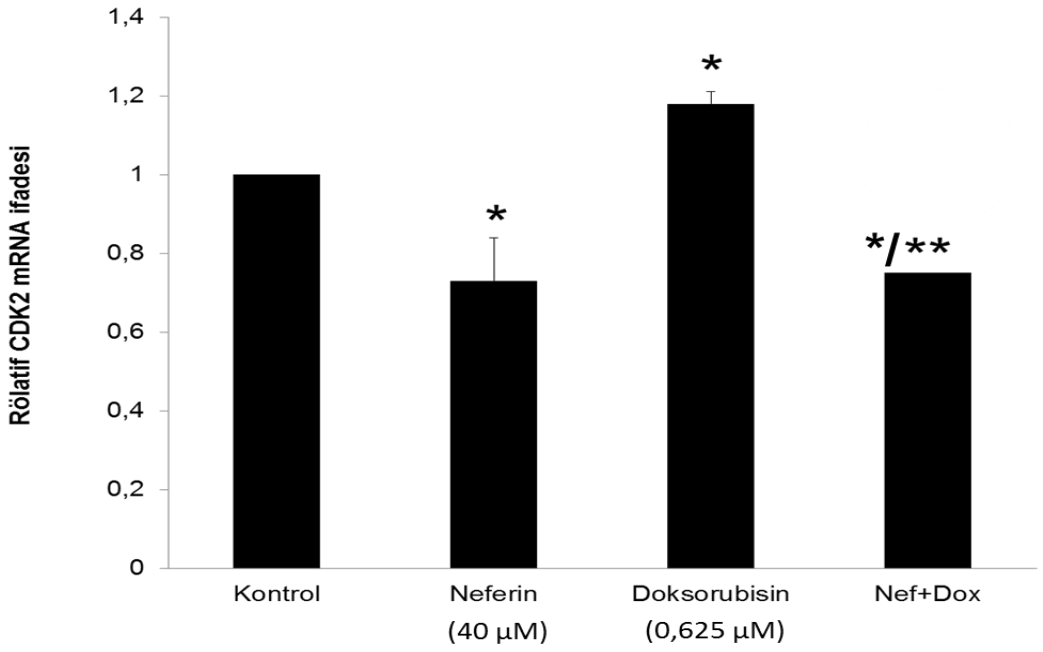
40 µM neferin p21 mRNA ifadesini kontrole göre 1.20 kat artmışken 0,625 µM doksorubisin tedavisi p21 gen ifadesini kontrole göre 5 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise p21 gen ifadesini kontrol grubuna göre 6.5 kat arttırmışken doksorubisin tedavisine göre 1 kat, neferin tedavisine göre 5.8 kat arttırmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. Neferinin ve doksorubisinin p21 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 neferin ve doksorubisin.

CDK 2 Gen İfadesi

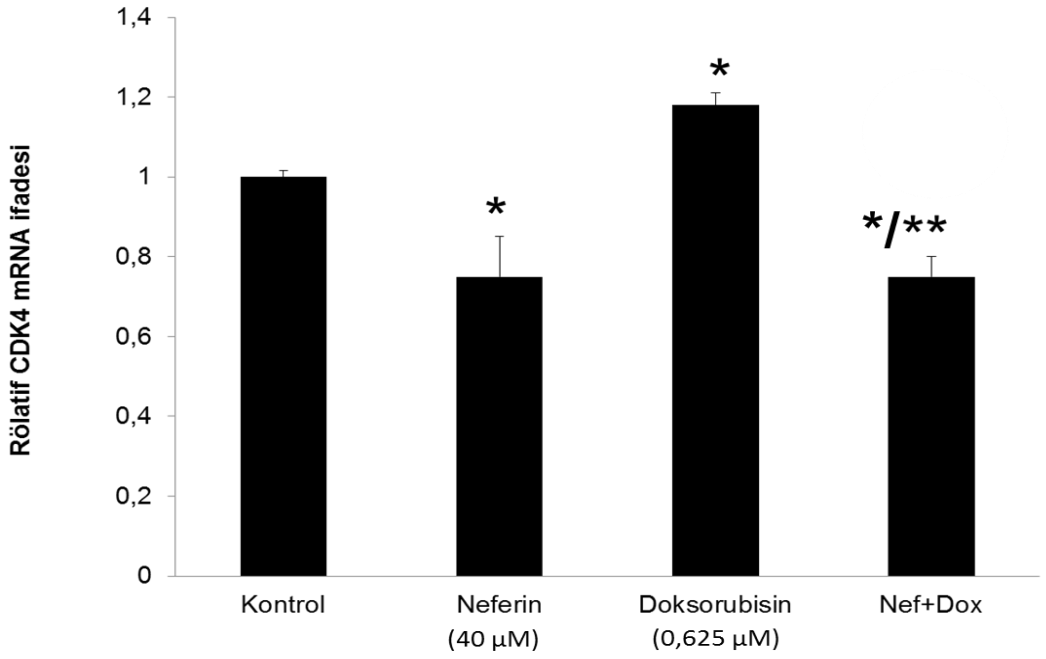
40 µM neferin CDK 2 mRNA ifadesini kontrole göre 0.3 kat azaltırken 0,625 µM doksorubisin tedavisi CDK 2 gen ifadesini kontrole göre 0.2 artırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise CDK 2 gen ifadesini kontrol grubuna göre 0.2 kat azaltırken doksorubisin tedavisine göre 0.4 kat azaltmıştır (Şekil 24).



Şekil 24. Neferinin ve doksorubisinin Cdk 2 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 doksorubisin.

CDK 4 Gen İfadesi

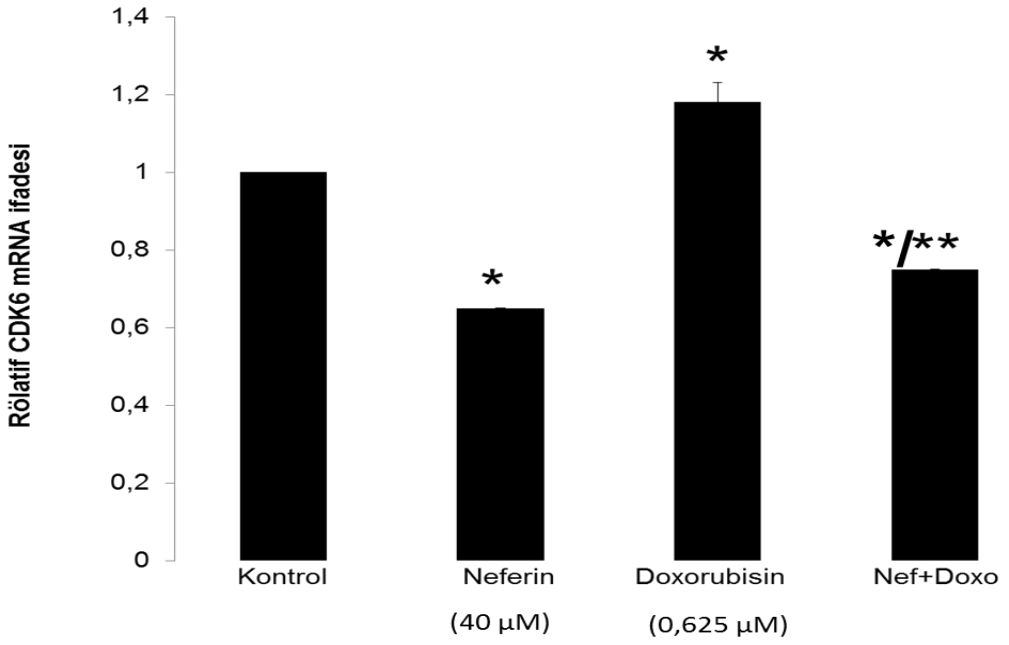
40 µM neferin tedavisi CDK 4 gen ifadesini kontrole göre 0.3 kat azaltırken 0,625 µM doksorubisin tedavisi CDK 4 gen ifadesini kontrole göre 0.2 kat artırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise CDK 4 gen ifadesini kontrol grubuna göre 0.3 kat azaltmışken doksorubisin tedavisine göre 0.5 kat azaltmıştır (Şekil 25).



Şekil 25. Neferin ve doksorubisinin Cdk 4 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 doksorubisin.

CDK 6 Gen İfadesi

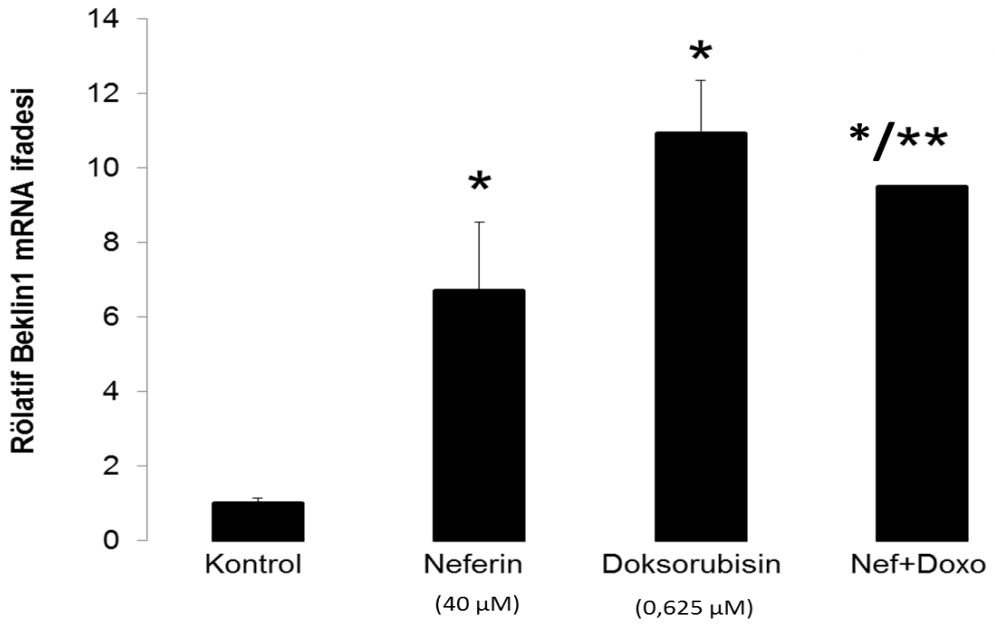
40 µM neferin CDK 6 mRNA ifadesini kontrole göre 0.4 kat azaltırken 0,625 µM doksorubisin tedavisi CDK 6 gen ifadesini kontrole göre 0.2 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise CDK 6 gen ifadesini kontrol grubuna göre 0.2 kat azaltırken doksorubisin tedavisine göre 0.4 kat azaltmıştır (Şekil 26).



Şekil 26. Neferinin ve doksorubisinin CDK 6 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 neferin ve doksorubisin.

Beklin 1 Gen İfadesi

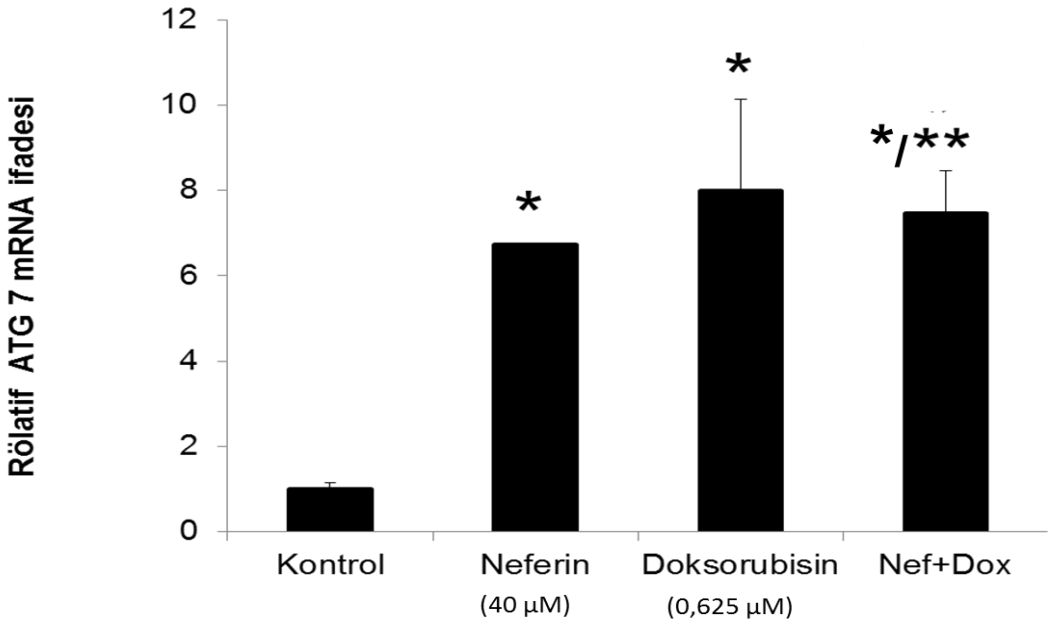
40 μM neferin beklin 1 mRNA ifadesini kontrole göre 7 kat arttırırken 0,625 μM doksorubisin tedavisi Beklin 1 gen ifadesini kontrole göre 11 kat artırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise Beklin 1 gen ifadesini kontrole göre 10 kat, neferin tedavisine göre 3 kat arttırmaktayken doksorubisin tedavisine göre ise 0.1 kat azalmıştır (Şekil 27).



Şekil 27. Neferinin ve doksorubisinin Beklin 1 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 neferin ve doksorubisin.

ATG7 Gen İfadesi

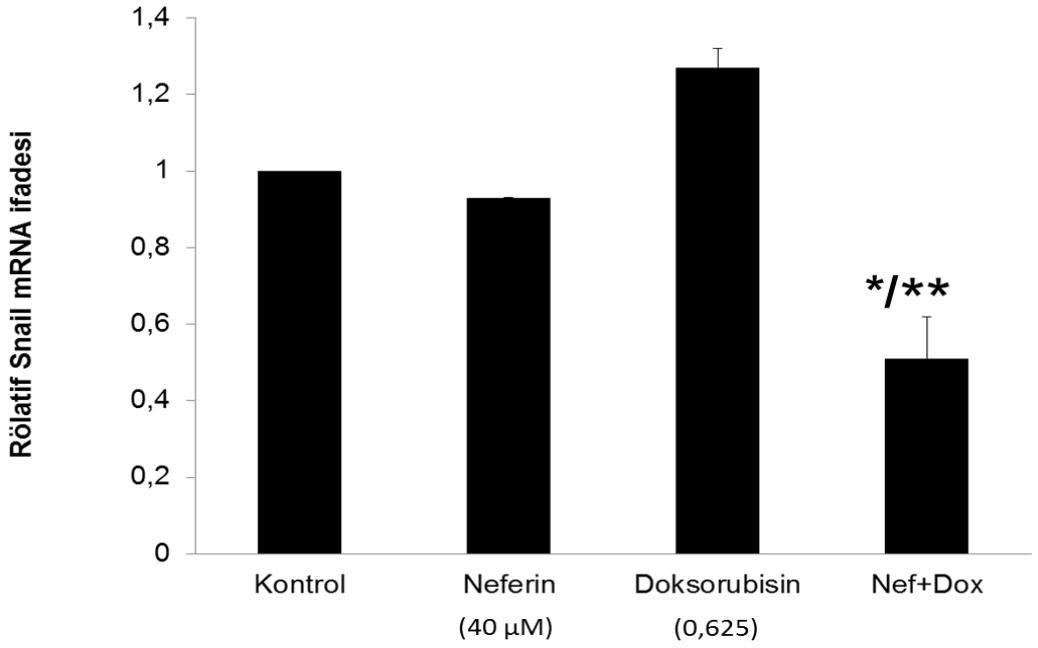
40 µM neferin tedavisi ATG7 mRNA ifadesini kontrole göre 7 kat arttırmışken 0,625 µM doksorubisin tedavisi ATG7 gen ifadesini kontrole göre 8 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise ATG7 gen ifadesini kontrol grubuna göre 7.5 kat, neferin tedavisine göre 1 kat artırmaktayken doksorubisin tedavisine göre 0.5 kat azaltmıştır (Şekil 28).



Şekil 28. Neferinin ve doksorubisinin ATG7 gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, **p<0.01 doksorubisin.

Snail Gen İfadesi

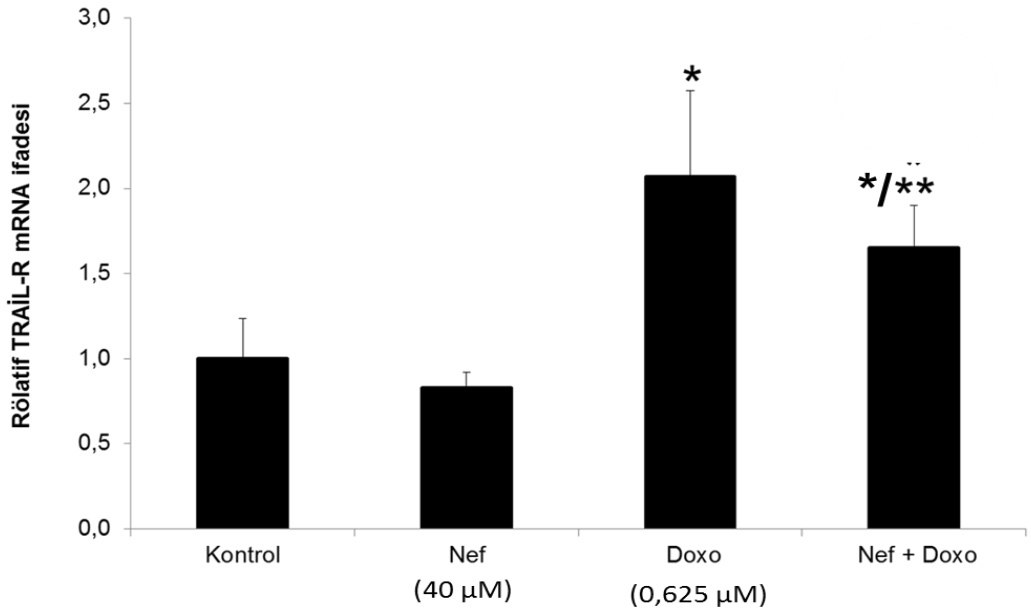
40 µM neferin tedavisi Snail mRNA ifadesini kontrole göre 0.1 kat azaltırken, 0,625 µM doksorubisin tedavisi Snail gen ifadesini kontrole göre 0.3 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise Snail gen ifadesini kontrol grubuna göre 0.5 kat azaltmaktayken, doksorubisin tedavisine göre 0.8 kat azaltmış, neferin tedavisine göre 0.4 kat azaltmıştır (Şekil 29).



Şekil 29. Neferinin ve doksorubisinin snail gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.05 kontrol, **p<0.01 doksorubisin ve neferin.

TRAIL-R Gen İfadesi

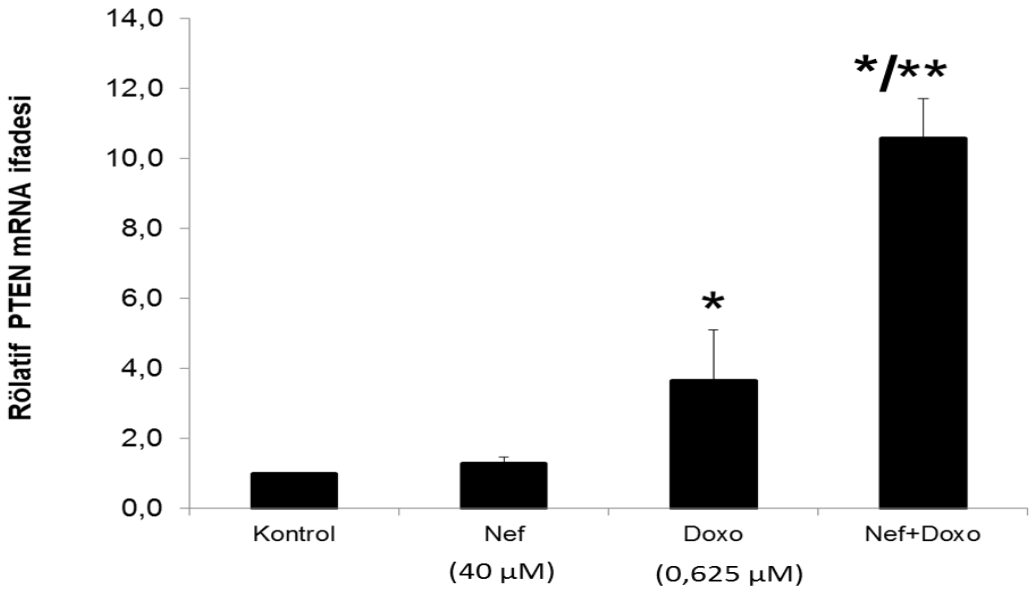
40 μM neferin tedavisi TRAIL-R mRNA ifadesini kontrole göre 0.2 kat azaltmışken, 0,625 μM doksorubisin tedavisi TRAIL-R gen ifadesini kontrole göre 2 kat arttırmıştır. Kombinasyon tedavisi ise TRAIL-R gen ifadesini kontrol grubuna göre 1.7 kat arttırmışken, doksorubisin tedavisine göre 0.3 kat azaltmış, neferin tedavisine göre 1.8 kat arttırmıştır (Şekil 30).



Şekil 30. Neferinin ve doksorubisinin TRAIL-R gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 kontrol, ** p<0.01 neferin ve doksorubisin.

PTEN Gen İfadesi

40 µM neferin tedavisi PTEN gen ifadesini kontrole göre 0.5 kat arttırmış, 0,625 µM doksorubisin tedavisi ise PTEN gen ifadesini kontrole göre 4 kat artırmıştır. Kombinasyon tedavisi PTEN gen ifadesini kontrol grubuna göre 11 kat artırmışken neferin tedavisine göre 10 kat, doksorubisin tedavisine göre 7 kat artırmıştır (Şekil 31).

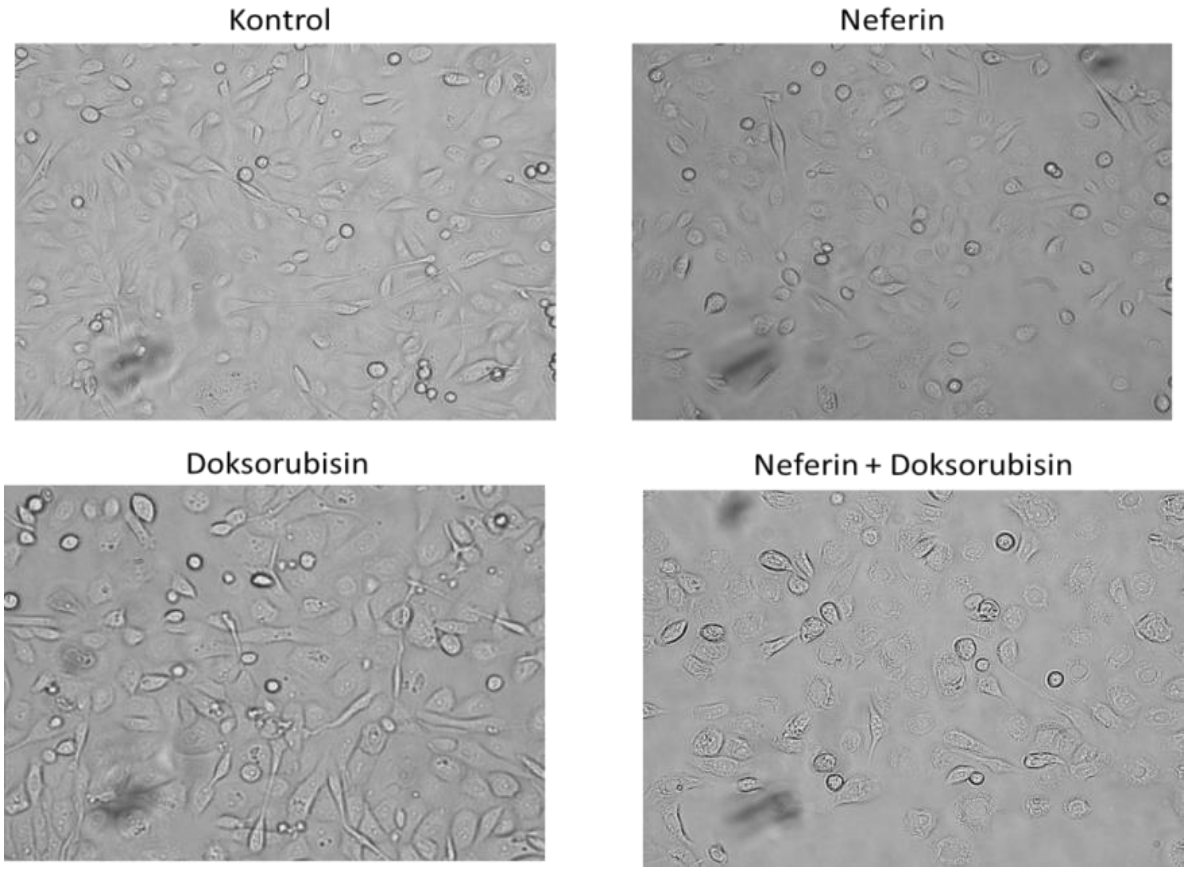


Şekil 31. Neferinin ve doksorubisinin PTEN gen anlatımı üzerine etkisi. Nef: neferin, Doxo: doksorubisin. *p<0.01 konrol,p<0.01 neferin ve doksorubisin.**

MORFOLOJİK ANALİZ

Kültür besi ortamına ekilen PC3 ve LNCAP hücrelerine ertesi gün 40 μM neferin, 0,625 μM doksorubisin ve ikisinin kombinasyonu uygulandı ve 48 saat süresince inkübe edildi. Uygulama sonrası hücre medyumları alınarak PBS ile yıkandı ve invert mikroskopta (x20) görüntülendi.

Elde edilen görüntülerdeki hücre sayılarını MTT ve Annexin 5 analizlerinde sağlanan verilere benzer olduğu saptandı. Buna göre kombine tedavi aynı kullanımlara göre daha yüksek düzeyde hücre ölümüne sebep olmaktadır (Şekil 32).

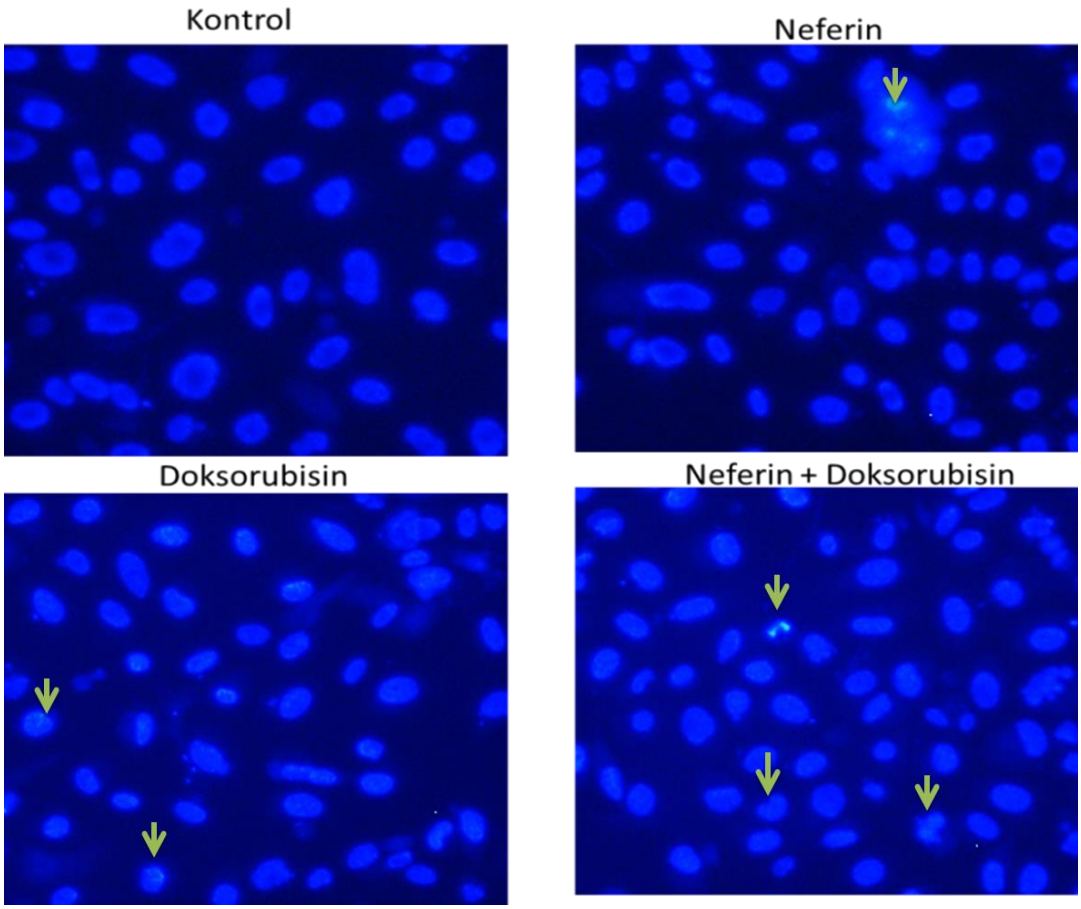


Şekil 32. Uygulamalar sonra hücrelerin mikroskobik görüntüsü.

HÜCRE DÜZEYİNDE APOPTOZ ANALİZİ

Hücresel düzeyde apoptoz analizi androjen-duyarlı LNCaP ve androjen-dirençli PC3 hücrelerinde gerçekleştirildi. 48 saatlik tedavi uygulamaları sonrası PBS ile yıkanan hücreler Hoecsth 33342 boyası ile boyanarak florasan mikroskop ile apoptoz cisimcikleri ve kromatin kondenzasyon alanları belirlendi.

Görüntülere göre neferin düşük düzeyde, doksorubisin orta düzeyde apoptoza yol açarken, kombine tedavide apoptoza uğrayan hücre sayısının arttığı gözlenmektedir (Şekil 33).

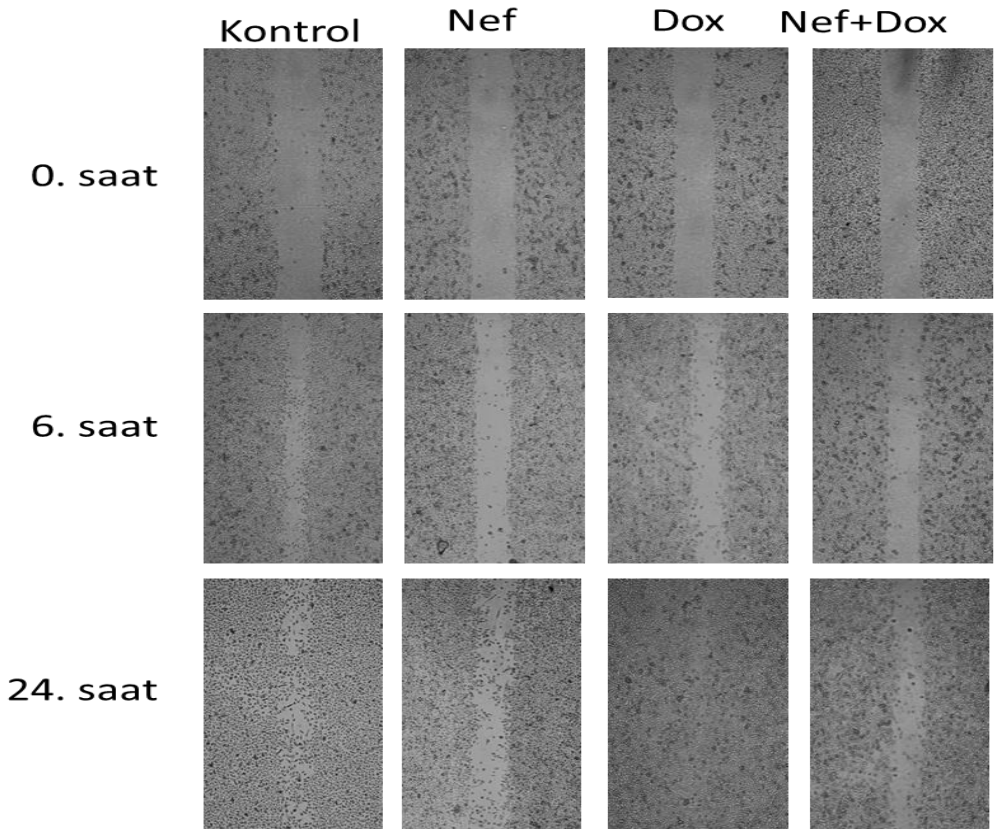


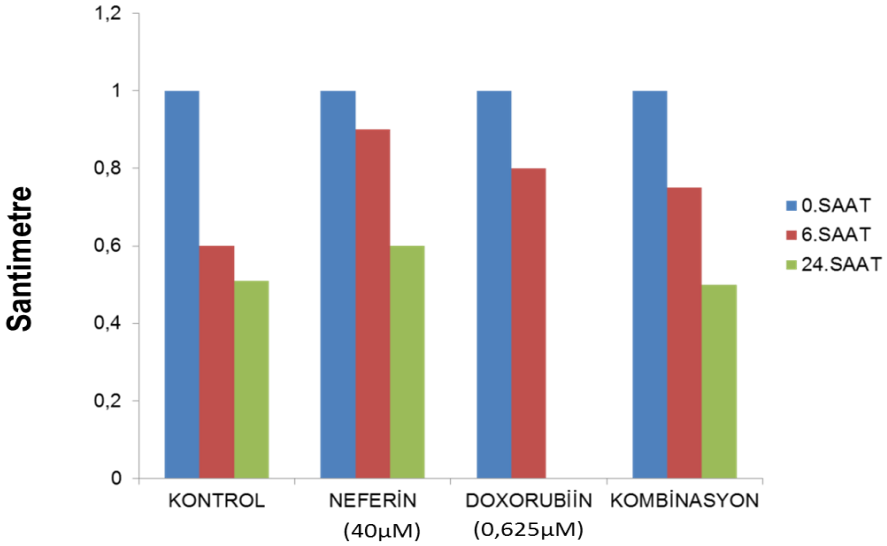
Şekil 33. Floresan mikroskopta Hoecsth 33342 ile apoptoz görüntüsü.

YARA İYİLEŞMESİ (MİGRASYON) DENEYİ

Uygulanan tedavi yöntemleri ve kombine terapinin kanser hücre migrasyonuna olası inhibe edici etkileri yara iyileşmesi deneyi ile incelendi. Serumsuz ortamda yapılan uygulamalara göre kontrol grubu hücreleri yüksek düzeyde göç ederek 24 saatte hücre migrasyonu meydana geldiği görüldü (Şekil 34).

40 µM neferin uygulanan deney grubunda 24. saatte açık alanın yaklaşık % 41,2 kapandığı, 0,625 µM doksorubisinde ise tamamen kapandığı belirlendi. Kombine uygulamanın ise 24. saatte neferin etkisiyle % 50,5 kapandığı belirlendi (x20) (Şekil 34).





Şekil 34. Tedavi uygulamalarının hücre migrasyonuna etkisi.

TARTIŞMA

Prostat kanseri, erkeklerde sık gelişen malignitelerden biridir (81). Hastaların çoğunda tanı esnasında klinik olarak lokalize tümör vardır ve bunlar cerrahi ve radyasyon tedavisi gibi yöntemler ile başarıyla yönetilmektedir. Bununla birlikte, başlangıçta lokal tanısı olan erkeklerin yaklaşık % 10'u metastatik evre ile nükseder ve hastalarda *de novo* metastatik prostat kanseri de gelişebilir (82).

Metastatik prostat kanseri, androjen deprivasyon tedavisi ile sıklıkla taksan-bazlı kemoterapi veya potent androjen reseptör blokörü (örn. abirateron asetat artı prednizon, enzalutamid) ile kombinasyon halinde yönetilir (47, 83). Ancak hastalık kastrasyona dirençli prostat kanserine (KDPK) dönüşebilir. KDPK hastalarının tedaviye yanıt oranları kanser hücrelerinin artan plastisitesine bağlı olarak oldukça değişkendir (84).

Hint lotusu *Nelumbo nucifera*'nın yeşil tohum embriyolarında bulunan neferin bisbenzilizokinolin yapıda bir alkaloittir. Farklı kanser hücrelerinde daha önce yapılan çalışmalara göre neferin, antikanser etkinliği yüksek doğal bir moleküldür. Bu çalışmalardan bazılarına göre neferin, osteosarkoma hücrelerinde hücre döngüsünü durdurmakta (85), çoklu ilaç dirençli kanser hücrelerinin proliferasyonunu etkin bir şekilde inhibe edebilmekte (8), akciğer kanseri ve nöroblastoma hücrelerinde apoptozu ve otofajiyi uyarmakta (10, 86) ve ovaryum sarkomasında angiyogenezi inhibe edebilmektedir (87). Bilinen etkilerine rağmen bu alkaloidin prostat kanseri hücrelerindeki potansiyel kullanılabilirliği henüz aydınlatılmamıştır. Bu molekül doza bağlı benzer anti-proliferatif etkisini HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde hücrelerde mitokondriyal membran bütünlüğünü bozarak, p38, ERK/MAPK sinyal yolaklarını etkinleştirerek, hücre içi kalsiyum ve ROS düzeyini artırarak, antioksidan rezervi tüketerek ve lipid peroksidasyona neden olarak gerçekleştirmektedir (10, 12, 72, 88).

Neferin Mcf-7 meme kanser hücrelerinde anti-proliferatif etkinliğini mitokondri aracılı apoptozun uyarılması ve hücre döngüsünün duraklatılması üzerinden de geliştirebilir (89). Neferin akciğer kanser hücreleri (65), osteosarkoma (85) ve ovaryum (90) kanser hücrelerinde hücre döngüsünü duraksatarak ve otofajiye (10) neden olarak da hücre ölümüne yol açmaktadır.

Son yıllarda biyoaktif bileşikler üzerine yapılan araştırmalar, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı terapötik etkilere odaklanmaktadır. Apoptoz, antimetastatik, antiproliferatif ve antianjiyojenik gibi etki mekanizmaları ile farklı biyoaktif bileşikler antikanser aktivite gösterir.

Doksorubisin kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Bu kemoterapötik ajan prostat kanserinde de belirgin bir aktivite göstermekle birlikte, kullanımı miyelosupresyon ve kardiyotoksisite gibi önemli sistemik yan etkileri ve ilaç direnci gelişimi kullanımını sınırlandırmaktadır (91, 92).

Biyoaktif bileşiklerin gerek tek gerekse doksorubisin gibi farmakolojik ajanlar ile birleşik kullanımı kemoterapötiklerin yan etkilerini azalttığı gibi, terapötik cevabı da üst seviyelere çıkarabildikleri rapor edilmiştir (93), Bu sebeple, yapılan bu çalışmada doksorubisin ile alkaloid neferin kombine kullanılarak prostat kanser hücrelerindeki tedavi potansiyeli araştırıldı.

Yürütülen bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre neferin tedavisi androjen-dirençli ve androjen-duyarlı prostat kanseri hücrelerinde konsantrasyon artışı ve

inkübasyon süresine paralel olarak önemli düzeyde antiproliferatif etki göstermektedir. Önceki literatür verilerini destekler yönde 40 μM neferine 48 saat maruz bırakılan PC3 hücrelerinde apoptoza yol açarken, apoptoz-dışı hücre ölümünü de belirgin düzeyde artırmaktadır.

Neferin *kaspaz-8* ve *sitokrom c* mRNA ifadelerini belirgin düzeyde artırdı, *Bcl-XL* ve *Survivin* ifadelerini ise düşürdü. 25 μM neferine 24 saat maruz bırakılan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde *Bim, Bid, Bax, Bak, PARP, kaspaz-8, -3, -6, -7* gibi apoptotik protein ve gen ifadelerinin yükseldiği, anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL protein anlatım seviyelerini ise azaldığı rapor edilmiştir (76). İlginç olarak çalışmamızda kullanılan PC3 prostat kanser hücrelerinde neferin Bax, p53 ve kaspaz-3 ifadesini değiştirmeden apoptoza yol açtı. Bu sonuç neferinin PC3 hücrelerinde apoptoza kaspaz-dışı yoldan neden olabileceğini düşündürmektedir.

Mitokondriden sitoplazmaya salınan apoptoz uyarıcı faktör (AIF), endonükleaz G (Endo G), sitokrom c ve ikinci mitokondri-türevli kaspaz aktivatörü/doğrudan IAP-bağlı protein (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein, SMAC/DIABLO) geçişi ile kaspazlar aktive edilmeden de DNA kırığı oluşarak da apoptozun gelişebildiği bilinmektedir (94, 95). Bir IAPs üyesi olan *Survivin*'in neferin tarafından aşağı yönde regüle edilmesi, bunun kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi inhibe edici etkinliğinin de ortadan kalkarak apoptozun uyarılması anlamına gelebilir (89).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada 10 μM neferin ile 10 μM sisplatin kombinasyonu PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı, *Beklin 1* gen ifadesi ve ROS artışı ile ER stresine yol açtığı belirtilmiştir (71). Akciğer kanser hücre serisine 48 saat süresince uygulanan 20 μM neferin otofajiyi tetiklemektedir (10).

Mevcut araştırmamızda da neferin uygulanan PC3 hücrelerinde otofajiyi düzenleyen genlerden *Beklin-1* ve *ATG7* mRNA ifadesinin artışı hücre ölümlerinin en azından bir kısmının otofaji aracılı olabileceğini göstermektedir. Aynı konsantrasyonda neferin uygulanan hücrelerin farklı yanıt oluşturmaları ise neferine karşı duyarlılığın hücre-spesifik olduğuna işarettir.

Hücre döngüsünün duraklatılması genom stabilizesini korumak için hücreler tarafından geliştirilen önemli bir mekanizmadır. Döngüdeki duraklatma DNA hasarına uğramış hücrelerin gelişen mutasyonların onarımına izin verir (96). Hücre

döngüsünün bozulması kanser progresyonuna yol açabilir (97). Şimdiye kadar, birçok doğal bileşiğin, hücre döngüsünü bloke ederek malign büyüme inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (98-100).

Kanser hücrelerinde hücre döngüsünün G1 veya G2/M fazındaki tutulması, neferin tedavi etkinliğinin bir kısmını oluşturuyor olabilir (12, 85). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre neferin PC3 ve LNCaP hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde düşürmektedir. Tedavi ile birlikte hücre çoğalmasındaki bu azalma, G1 hücre döngüsünde duraklamadan da kaynaklanıyor olabilir. Nitekim insan osteokarsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada 10 μM neferinin p38 MAPK ve JNK yolakları üzerinden p21 ifadesindeki artışla hücre döngüsünün G1 evresinde durduğu belirtilmiştir (73). A549 akciğer kanser hücrelerinin düşük doz neferin tedavisi p53 ve bunun efektör proteinini p21 ile hücre döngüsünü düzenleyen siklin D1'i aşağı yönde regüle etmesi sonucu döngü G1 evresinde tutulmuştur (12).

Literatür verilerine de benzer olarak (101-103) PC3 ve LNCaP hücrelerinin doksorubisine maruz bırakılması doza bağlı antiproliferatif etki oluşturdu. PC3 hücrelerinin uygulamalar sonrası yapılan qPCR analizlerine göre doksorubisin *Bax, kaspaz-3, TRAIL, kaspaz-8, p53, sitokrom c* mRNA ifadelerinde artış ve *Survivin*'de ise azalmaya neden olmaktadır.

Doksorubisin prostat kanseri hücrelerinde ROS ve hücre içi kalsiyum düzeyinde artış ve JAK2/STAT3 sinyal yolunun inhibisyonu sonucu apoptoz üzerinden antikanser etki göstermektedir (104). Doksorubisin etkinliğinde p53'ün apoptozu maksimize etmek için gerekli olabileceği gösterilmiştir (105). Benzer olarak bu çalışmada da doksorubisinin LNCaP p53 mRNA ifadesini 2.5 kat artırdığı saptandı. Bununla birlikte, doksorubisin PC3 hücrelerinde p53 ifadesinde bir değişim oluşturmadı. Bunun sebebi PC3 hücrelerinin p53 geninde allel delesyonu ve diğerinde de stop kodonu üreten çerçeve kayması mutasyonu sonucu fonksiyonel p53 protein üretiminde eksikliğine bağlı olabilir (106). Literatürde bu konuda yer alan verilere göre doksorubisin antikanser etkinliğini yalnızca apoptoz üzerinden gerçekleştirmemekte, hücre yaşlanması (senescence), nekroz ve otofajiye de yol açmaktadır (107, 108).

Yürütülen bu çalışmada olası sinerjik ya da aditif etkiyi test etmek amacıyla doksorubisin ile neferin birleşik kullanıldı. Her birinin IC50 konsantrasyonları olan

0,625 µM doksorubisin ve 40 µM neferin kombinasyonu PC3 ve LNCaP hücrelerine 48 saat uygulandı.

Birleşik tedavi ile PC3 hücrelerinde doksorubisinin tek uygulanmasına göre % 16, DHT uygulanan LNCaP hücrelerinde ise % 40 düzeyinde daha fazla hücre ölümü gerçekleşti. Akciğer kanser modelinde de benzer olarak 10 µM neferin ile 2 µM doksorubisin 48 saat kombine tedavisi yaklaşık % 20 oranında daha yüksek viyabilite kaybına neden olduğu bildirilmiştir (65). Bu etkinin G1 hücre evresinde duraklama, *Bak, bax, bid, kaspaz 9, kaspaz 8, kaspaz 3* ve *sitokrom c* gen anlatımlarında artış ve *Bcl-2* ifadesindeki azalmaya bağlı gelişen apoptoz sonucu geliştiği bildirilmiştir.

Kombine tedavi sonrası yaptığımız sitometrik analizlere göre neferinin hücre döngüsünü G1 evresinde tutma etkisi (arrest) devam etmekte, PC3 hücrelerinde ayrıca G2/M fazında da arreste neden olmaktadır. Bu etkinin sebebi farmakolojik ajanların tek uygulanmasına göre *CDK -2, -4, -6* mRNA ifadelerinin daha fazla düşmesine, *p21* ve *p53* de ise artmasına bağlı olabilir. Benzer olarak mide kanser hücrelerine 48 saat uygulanan 16 µM neferin ve 0.036 µM doksorubisin hücre döngüsünü G1 fazında durdurmaktadır (109).

Birçok farklı kanser tedavisinde kullanılan doksorubisinin çoğu zaman etkisini artırmak ve toksisiteyi azaltmak için diğer ilaçlar ile birleştirilmektedir. Anti-kanser özelliklerine sahip doğal bir seskiterpen lakton olan costunolid ile prostat kanseri hücre dizilerinde yapılan bir çalışmaya göre, ROS üretimi ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı ve Bcl-2 aile proteinlerinin modülasyonu yoluyla mitokondri aracılı apoptoza neden olmuştur. Bunda c-jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 protein kinazların fosforilasyonunu önemli ölçüde artırarak yaptığı da rapor edilmiştir (110).

Prostat kanserinde düşük PTEN ekspresyonu yüksek dereceli (Gleason skoru 7-10) ve evre tümörlerle ilişkilidir ve bu da PTEN genindeki değişikliklerin tümör progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (111). Yaptığımız qPCR analizlerine göre neferin PC3 hücrelerinde PTEN ifadesinde önemli bir değişiklik yapmaz iken, doksorubisin ile kombinasyonu etkiyi güçlü bir şekilde artırmaktadır. PTEN'in tümör baskılayıcı rolü dikkate alındığında neferin ile doksorubisin kombinasyon terapisinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun prolifere edici özelliğinin baskılanmış olabileceği düşünülebilir (112).

Prostat kanserli hastaların yaklaşık % 5 - 12'sinde tümör klinik olarak organ-sınırlıdır (113). Bununla birlikte hastaların yaklaşık % 70-80'inde kemik metastazı, 2'si

nde ise bölgesel lenf nodu metastazı gelişir (114). Prostatta lenf nodu metastazının saptanması tedavi edilemeyen kanser hastaları için kötü bir prognoz olduğunu gösterir (115). Bu nedenle metastaz mekanizmalarının anlaşılması ve hastalığın daha fazla yayılması yeni tedavi stratejileri geliştirmek için önemlidir. Yürütülen bu çalışmadan elde edilen verilere göre doksorubisin hücre migrasyonu üzerine önemli bir etki oluşturmazken, neferin ve doksorubisin ile kombinasyonu hücre göçünü güçlü bir şekilde inhibe etmektedir.

Yaptığımız moleküler analizler neferinin ve kombine tedavinin anti-migrasyon etkisinde Snail mRNA ifadesindeki baskılanma katkı sağlamış olabilir. Hücre göçünü önleyici etkisi daha önce hepatoselüler karsinoma hücrelerinde de gösterilmiştir (76). Verilerimize benzer olarak Zhang ve ark. yaptığı bir araştırmaya göre, doksorubisin tek uygulamada PC3 hücrelerinin göçünü önlemede yetersiz kalmaktadır (116). Bunula birlikte, PI3K/PTEN/AKT inhibitörü dazatinib ile kombinasyonu etkiyi güçlendirmektedir. Yapılan başka bir karaciğer kanseri hücrelerinde neferin ile okzaliplatin kombinasyonu hücre göçünü önemli düzeyde inhibe etmektedir (117). Benzer olarak, neferin hepatoselüler karsinom hücrelerinde E-kaderin protein ifadesinde artış ile Vimentin, Snail ve N-kaderin'in aşağı regülasyonu yoluyla Epitelyal Mezenşimal geçiş ile uyarılmış hücre göçü ve invazyon yeteneklerini bastırmıştır (80).

Bu tez çalışmasından elde edilen verilere göre, doğal bir alkaloid olan neferin farklı hücre ölüm yolaklarını uyararak androjen-dirençli ve androjen-duyarlı insan prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu önemli düzeyde baskılamaktadır. Metastazda önemli bir yer tutan hücre göçü de neferin tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilmektedir. Ayrıca, bu molekülün kemoterapi ajanı olarak kullanılan doksorubisin ile kombinasyonu, bu farmakolojik ilacın etkisini belirgin düzeyde artırmaktadır. Sonuç olarak, neferinin tek veya kombine olarak anti-kanser potansiyeli *in vivo* ileri araştırmalar ile desteklenerek tedavide kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi önerilmiştir.

SONUÇLAR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Doğal bir alkaloid olan neferin'in çeşitli kanserlerin tedavisinde rutin olarak kullanılan doksorubisin ile kombine kullanım potansiyeli prostat kanser hücrelerinde analiz edildi. Apoptoz, otofaji, hücre döngüsü ve hücre migrasyonu üzerine olası tedavi etkinliğinin analiz edildiği bu çalışma sonuçlarına göre;

1. İnsan prostat kanseri androjen-dirençli PC3 ve androjen-duyarlı LNCaP hücrelerinin neferin ve doksorubisinin değişen konsantrasyon ve inkübasyon sürelerine bağlı olarak duyarlılık gösterdikleri saptandı.
2. Her iki çeşit hücrenin doksorubisinin ve neferinin farklı dozlarına 48 saat maruz bırakılması sonucu IC_{50} değenlerinin sırasıyla 0,6253 (0,08013 - 63,82) µM ve 39,842 µM (25,33 - 62,65) düzeyinde bulundu.
3. Neferin ve doksorubisinin birleşik kullanımı PC3 hücrelerinde yaklaşık % 20, DHT uygulanan LNCaP'lerde ise % 60 oranında daha yüksek sitotoksisite gösterdiği saptandı.
4. Her iki farmakolojik ajan da kontrol grubuna göre apoptoz yüzdesini artırmaktadır.
5. Neferin ve doksorubisin kombine kullanımı PC3 hücrelerinde apoptoz yüzdesini artırmazken, LNCaP'lerde belirgin düzeyde yükseltmektedir.
6. Neferin tedavisi her iki hücre çeşidinde de hücre döngüsünü belirgin düzeyde G1 evresinde, doksorubisin ise G2/M evresinde durdurmaktadır.
7. Hücre döngüsündeki duraksamanın temelinde rol alan genlerin regülasyonunda değişimlerin yattığı saptandı.
8. Doksorubisinin etkisizliğine karşın, neferin ve kombinasyonları PC3 hücre migrasyonunu belirgin düzeyde inhibe ettiği tespit edildi.

ÖZET

Prostat kanseri dünya genelinde erkeklerin en ölümcül hastalıklarından biridir. Bu çalışmanın amacı, geleneksel bir tıbbi bitki olan *Nelumbo nucifera*'nın (Lotus) tohum embriyosundan izole edilen neferin, bisbenzilizokinolin alkaloidin insan prostat kanser hücrelerinde doksorubisin tedavisi üzerindeki etkisini araştırmaktı. Prostat kanseri hücreleri, neferin, doksorubisin veya ikisinin kombinasyonu ile tedavi edildi. Hücre sağkalımı MTT testi ile belirlendi.

Hücresel apoptoz ve hücre döngü evreleri sitometre cihazında değerlendirildi. Hücre migrasyonu yara iyileşme testi ile incelendi. RT-qPCR, mRNA ekspresyonunu değerlendirmek için kullanıldı. Androjen-dirençli PC3 ve androjen-duyarlı LNCaP hücrelerinin neferin ile tedavisi, doz ve zamana bağlı bir şekilde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı. Bir kemoterapötik ajan olan doksorubisinin neferin ile kombinasyonu, anti-proliferatif aktiviteyi anlamlı düzeyde artırdı. Sitometrik değerlendirmeye göre neferin doksorubisinin apoptoz ve G1 fazında hücre siklusunu durması üzerindeki etkilerini uyarmaktadır.

PCR analizleri, kombine tedavi rejiminin kaspaz-3, -8, sitokrom c, p53'ü indükleyerek ve Bcl-XL ve survivin mRNA ekspresyonunu azaltarak apoptoza yol açtığını gösterdi.

Neferin tedavisi Beklin-1 ve ATG7 genlerini indükleyerek otofajiye neden olmaktadır. Hücre döngüsü, G1 fazında artmış p21 ve düşürülmüş CDK2, CDK4 ve CDK6 regülasyonu ile duraklatıldı. Ayrıca, neferin hücre migrasyonunu inhibe ederek doksorubisin tedavisine anti-migrasyon yoluyla da katkı sağladı. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, neferin androjen-dirençli ve androjen-duyarlı prostat kanseri tedavisinde tek ya da kombine uygulanabilme potansiyeline sahip olabileceği, ancak ileri *in vivo* araştırmalar ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, neferin, doksorubisin, PC3, LNCaP, apoptoz.

EFFECT OF NEFERINE MOLECULE ON THE SENSITIVITY OF PROSTATE CANCER CELLS TO CHEMOTHERAPY

SUMMARY

Prostate cancer (PCa) is one of the most lethal diseases of men worldwide. The aim of this study was to investigate the effect of neferine, bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the seed embryo of a traditional medicinal plant *Nelumbo nucifera* (Lotus) on doxorubicin therapy in human PCa cells.

Prostate cancer cells were treated with neferine with or without doxorubicin. Cell survival was tested by MTT assay. Cell apoptosis were assessed by annexin V staining with cytometry. Cell cycle progression was determined with cell-based cytometer. Cell migration was evaluated by wound healing test. RT-qPCR was used to assess mRNA expression. Neferine treatment of androgen-insensitive PC3 and androgen-sensitive LNCaP cells significantly decreased cell viability in a dose and time-dependent manner.

Combination of neferine and doxorubicin, a chemotherapeutic agent, significantly enhanced its anti-proliferative activity. Cytometric evaluation demonstrated that neferine induces effects of doxorubicin on apoptosis and cell cycle arrest at G1 phase.

PCR analyzes demonstrated that therapy regimes lead apoptosis through inducing caspase 3 and 8, Bax, p53, and decreased the mRNA expression of Bcl-XL. Cell cycles were arrested at G1 phase by upregulated p21 and down regulation of cyclin dependent kinases (CDK) such as CDK2, CDK4 and CDK6. In addition, neferine contributed to doxorubicin treatment by anti-migration via inhibiting cell migration.

According to the data obtained in this study, it was concluded that neferine may have single or combined potency in the treatment of androgen-resistant and androgen-sensitive prostate cancer but should be supported by further *in vivo* studies.

Keywords: Prostate cancer, neferine, doxorubicin, PC3, LNCaP, apoptosis.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893-917.

2. Buttyan R, Zakeri Z, Lockshin R, Wolgemuth D. Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. Molecular Endocrinology. 1988;2(7):650-7.

3. Robles LA, Chou S, Cole OJ, Hamid A, Griffiths A, Vedhara K. Psychological and social factors influencing patients' treatment selection for localised prostate cancer. Advances in prostate cancer. 2013;5:207-215.

4. Cayla J, Auclerc C, Goldberg D, Darne C, Jacquillat C. [Role of chemotherapy in the treatment of bone metastases of breast cancer]. Rev Rhum Mal Osteoartic. 1984;51(11):651-6.

5. So AI, Hurtado-Coll A, Gleave ME. Androgens and prostate cancer. World journal of urology. 2003;21(5):325-37.

6. Campbell JK, King JL, Harmston M, Lila MA, Erdman JW. Synergistic effects of flavonoids on cell proliferation in Hepa-1c1c7 and LNCaP cancer cell lines. J Food Sci. 2006;71(4):S358-S63.

7. Huang CH, Li YP, Cao PG, Xie ZX, Qin ZQ. Synergistic effect of hyperthermia and neferine on reverse multidrug resistance in adriamycin-resistant

SGC7901/ADM gastric cancer cells. J Huazhong U Sci-Med. 2011;31(4):488-96.

8. Kadioglu O, Law BYK, Mok SWF, Xu SW, Efferth T, Wong VKW. Mode of Action Analyses of Neferine, a Bisbenzylisoquinoline Alkaloid of Lotus (Nelumbo nucifera) against Multidrug-Resistant Tumor Cells. Front Pharmacol. 2017;8:238.

9. Yoon JS, Kim HM, Yadunandam AK, Kim NH, Jung HA, Choi JS, et al. Neferine isolated from Nelumbo nucifera enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response. Phytomedicine. 2013;20(11):1013-22.

10. Poornima P, Weng CF, Padma VV. Neferine from Nelumbo nucifera induces autophagy through the inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and ROS hyper generation in A549 cells. Food Chemistry. 2013;141(4):3598-605.

11. Yoon JS, Kim HM, Yadunandam AK, Kim NH, Jung HA, Choi JS, et al. Neferine isolated from Nelumbo nucifera enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: Molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response. Phytomedicine. 2013;20(11):1013-22.

12. Poornima P, Weng CF, Padma VV. Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo, inhibits human lung cancer cell growth by MAPK activation and cell cycle arrest. Biofactors. 2014;40(1):121-31.

13. CARNEIRO lCJJ. Temel Histoloji. SOLAKOĞLU PDYADDS, editor: Nobel tıp kitap evi; 2006:973-978.

14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

15. Hall JE, Guyton AC. Guyton ve Hall tıbbi fizyoloji: Nobel Tıp Kitabevleri; 2013: 102-105.

16. Kim HL, Puymon MR, Qin M, Guru K, Mohler JL. NCCN clinical practice guidelines in oncology™. 2013;8:2.

17. Deng Q, Tang DG. Androgen receptor and prostate cancer stem cells: biological mechanisms and clinical implications. Endocr Relat Cancer. 2015;22(6):T209-20.

18. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. Endocr Rev. 2004;25(2):276-308.

19. Cunha GR, Vezina CM, Isaacson D, Ricke WA, Timms BG, Cao M, et al. Development of the human prostate. Differentiation. 2018;103:24-45.

20. DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grunwald V, Ray RB, Hidalgo M. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. Ann Oncol. 2004;15(10):1510-6.

21. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. J Dent Res. 2008;87(1):14-32.

22. Neskey DM, Osman AA, Ow TJ, Katsonis P, McDonald T, Hicks SC, et al. Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. Cancer Res. 2015;75(7):1527-36.

23. Li YZ, Rogoff HA, Keates S, Gao Y, Murikipudi S, Mikule K, et al. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. P Natl Acad Sci USA. 2015;112(6):1839-44.

24. Albrecht JH, Poon RYC, Ahonen CL, Rieland BM, Deng CX, Crary GS. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. Oncogene. 1998;16(16):2141-50.

25. Gulappa T, Reddy RS, Suman S, Nyakeriga AM, Damodaran C. Molecular interplay between cdk4 and p21 dictates G(0)/G(1) cell cycle arrest in prostate cancer cells. Cancer Lett. 2013;337(2):177-83.

26. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins temel patoloji: Nobel Tıp Kitabevleri; 2014:365-368.

27. Acikgoz E, Guven U, Duzagac F, Uslu R, Kara M, Soner BC, et al. Enhanced G2/M Arrest, Caspase Related Apoptosis and Reduced E-Cadherin Dependent Intercellular Adhesion by Trabectedin in Prostate Cancer Stem Cells. Plos One. 2015;10(10):e0141090.

28. Bruce Alberts KR, Julian Lewis, Martin Raff, Peter Walter, Alexander Johnson Hücrenin moleküler biyolojisi: Türkiye Bilimler Akademisi; 2008:876-878.

29. Pongracz JE, Stockley RA. Wnt signalling in lung development and diseases. Respir Res. 2006;7:15.

30. Luo K. Signaling Cross Talk between TGF-beta/Smad and Other Signaling Pathways. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2017;9(1).

31. Bae JS, Jeon Y, Kim SM, Jang JY, Park MK, Kim IH, et al. Depletion of MOB1A/B causes intestinal epithelial degeneration by suppressing Wnt activity and activating BMP/TGF-beta signaling. Cell Death Dis. 2018;9(11):1083.

32. Pencik J, Pham HT, Schmoellerl J, Javaheri T, Schlederer M, Culig Z, et al. JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome. Cytokine. 2016;87:26-36.

33. Friederichs K, Schmitz J, Weissenbach M, Heinrich PC, Schaper F. Interleukin-6-induced proliferation of pre-B cells mediated by receptor complexes lacking the SHP2/SOCS3 recruitment sites revisited. European Journal of Biochemistry. 2001;268(24):6401-7.

34. Kriegl L, Vieth M, Kirchner T, Menssen A. Up-regulation of c-MYC and SIRT1 expression correlates with malignant transformation in the serrated route to colorectal cancer. Oncotarget. 2012;3(10):1182-93.

35. Santos E, Crespo P. The RAS-ERK pathway: A route for couples. Sci Signal. 2018;11:554.

36. McCubrey JA, Abrams SL, Stadelman K, Chappell WH, LaHair M, Ferland RA, et al. Targeting signal transduction pathways to eliminate chemotherapeutic drug resistance and cancer stem cells. Adv Enzyme Regul. 2010;50:285-307.

37. Erdogan S, Doganlar O, Doganlar ZB, Serttas R, Turkekul K, Dibirdik I, et al. The flavonoid apigenin reduces prostate cancer CD44(+) stem cell survival and migration through PI3K/Akt/NF-kappaB signaling. Life sciences. 2016;162:77-86.

38. Bitting RL, Armstrong AJ. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. Endocr-Relat Cancer. 2013;20(3):83-99.

39. Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, Socci ND, Scher HI. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappa B signalling. Nat Commun. 2011;2.

40. Hossini AM, Quast AS, Plotz M, Grauel K, Exner T, Kuchler J, et al. PI3K/AKT Signaling Pathway Is Essential for Survival of Induced Pluripotent Stem Cells. Plos One. 2016;11:5.

41. Ciuffreda L, Falcone I, Incani UC, Del Curatolo A, Conciatori F, Matteoni S, et al. PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting. Advances in biological regulation. 2014;56:66-80.

42. Jamaspishvili T, Berman DM, Ross AE, Scher HI, De Marzo AM, Squire JA, et al. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. Nat Rev Urol. 2018;15:222-234.

43. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013;63(1):11-30.

44. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):359-86.

45. Belpomme D, Irigaray P, Sasco AJ, Newby JA, Howard V, Clapp R, et al. The growing incidence of cancer: Role of lifestyle and screening detection (Review). Int J Oncol. 2007;30(5):1037-49.

46. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. Science. 2009;324(5928):787-90.

47. Armstrong AJ, Saad F, Phung, Dmuchowski C, Shore ND, Fizazi K, et al. Clinical outcomes and survival surrogacy studies of prostate-specific antigen declines following enzalutamide in men with metastatic castration-resistant prostate cancer previously treated with docetaxel. Cancer. 2017;123(12):2303-11.

48. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. Nature reviews Cancer. 2001;1(1):34-45.

49. Mulholland DJ, Tran LM, Li YF, Cai HJ, Morim A, Wang SY, et al. Cell Autonomous Role of PTEN in Regulating Castration-Resistant Prostate Cancer Growth. Cancer Cell. 2011;19(6):792-804.

50. Ferraldeschi R, Rodrigues DN, Riisnaes R, Miranda S, Figueiredo I, Rescigno P, et al. PTEN Protein Loss and Clinical Outcome from Castration-resistant Prostate Cancer Treated with Abiraterone Acetate. European Urology. 2015;67(4):795-802.

51. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM, et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. Cell. 2015;162(2):454-.

52. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, et al. Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. Cancer Cell. 2011;19(5):575-86.

53. Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer. J Clin Invest. 2008;118(10):3513.

54. Yuen HF, Abramczyk O, Montgomery G, Chan KK, Huang YH, Sasazuki T, et al. Impact of oncogenic driver mutations on feedback between the PI3K and MEK pathways in cancer cells. Bioscience Rep. 2012;32(4):413-22.

55. VATANSEVER HS. Epitelial Mezenkimal Transition (Geçiş-Aktarım). Turkiye Klinikleri Journal of Radiation Oncology-Special Topics. 2016;2(1):52-5.

56. Soner AD. Role of FAM134B in liver cancer: Bilkent University; 2013.

57. Montanari M, Rossetti S, Cavaliere C, D'Aniello C, Malzone MG, Vanacore D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. Oncotarget. 2017;8(21):35376.

58. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. Cell Signal. 2004;16(2):139-44.

59. Sauler M, Bazan IS, Lee PJ. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. Annu Rev Physiol. 2018;81.

60. Badrinath N, Yoo SY. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. Carcinogenesis. 2018;20:1-12.

61. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. Tumour Biol. 2016;37(7):8471-86.

62. Tait SWG, Ichim G, Green DR. Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. Journal of cell science. 2014;127(10):2135-44.

63. Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. Febs J. 2015;282(22):4279-88.

64. Priya LB, Baskaran R, Huang C-Y, Padma VV. Neferine ameliorates cardiomyoblast apoptosis induced by doxorubicin: possible role in modulating NADPH oxidase/ROS-mediated NFκB redox signaling cascade. Scientific reports. 2017;7(1):12283.

65. Poornima P, Kumar VB, Weng CF, Padma VV. Doxorubicin induced apoptosis was potentiated by neferine in human lung adenocarcima, A549 cells. Food and chemical toxicology. 2014;68:87-98.

66. Fruehauf JP, Myers CE, Sinha BK. Synergistic activity of suramin with tumor necrosis factor α and doxorubicin on human prostate cancer cell lines. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1990;82(14):1206-9.

67. El-Zawahry A, McKillop J, Voelkel-Johnson C. Doxorubicin increases the effectiveness of Apo2L/TRAIL for tumor growth inhibition of prostate cancer xenografts. BMC cancer. 2005;5(1):2.

68. Chen H-M, Wu Y-C, Chia Y-C, Chang F-R, Hsu H-K, Hsieh Y-C, et al. Gallic acid, a major component of Toona sinensis leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. Cancer letters. 2009;286(2):161-71.

69. Wagner BA, Evig CB, Reszka KJ, Buettner GR, Burns CP. Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. Archives of biochemistry and biophysics. 2005;440(2):181-90.

70. Konkimalla VB, Efferth T. Evidence-based Chinese medicine for cancer therapy. J Ethnopharmacol. 2008;116(2):207-10.

71. Selvi SK, Vinoth A, Varadharajan T, Weng CF, Padma VV. Neferine augments therapeutic efficacy of cisplatin through ROS-mediated non-canonical autophagy in human lung adenocarcinoma (A549 cells). Food and Chemical Toxicology. 2017;103:28-40.

72. Poornima P, Quency RS, Padma VV. Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells. Food chemistry. 2013;136(2):659-67.

73. Zhang X, Liu Z, Xu B, Sun Z, Gong Y, Shao C. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization. European journal of pharmacology. 2012;677(1-3):47-54.

74. Baskaran R, Poornima P, Huang CY, Padma VV. Neferine prevents NF-κB translocation and protects muscle cells from oxidative stress and apoptosis induced by hypoxia. Biofactors. 2016;42(4):407-17.

75. Li H, Tang Y, Wen L, Kong X, Chen X, Liu P, et al. Neferine reduces cisplatin-induced nephrotoxicity by enhancing autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway. Biochemical and biophysical research communications. 2017;484(3):694-701.

76. Yoon J-S, Kim H-M, Yadunandam AK, Kim N-H, Jung H-A, Choi J-S, et al. Neferine isolated from Nelumbo nucifera enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response. Phytomedicine. 2013;20(11):1013-22.

77. Baskaran R, Priya LB, Kalaiselvi P, Poornima P, Huang C-Y, Padma VV. Neferine from Nelumbo nucifera modulates oxidative stress and cytokines production during hypoxia in human peripheral blood mononuclear cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;93:730-6.

78. Priya LB, Baskaran R, Huang CY, Padma VV. Neferine modulates IGF-1R/Nrf2 signaling in doxorubicin treated H9c2 cardiomyoblasts. Journal of cellular biochemistry. 2017;119:1441-1452.

79. Guan G, Han H, Yang Y, Jin Y, Wang X, Liu X. Neferine prevented hyperglycemia-induced endothelial cell apoptosis through suppressing ROS/Akt/NF-κB signal. Endocrine. 2014;47(3):764-71.

80. Deng G, Zeng S, Ma J, Zhang Y, Qu Y, Han Y, et al. The anti-tumor activities of Neferine on cell invasion and oxaliplatin sensitivity regulated by EMT via Snail signaling in hepatocellular carcinoma. Scientific reports. 2017;7:41616.

81. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2016;25(1):16-27.

82. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schroder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. Lancet. 2016;387(10013):70-82.

83. Taneja SS. Re: Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. J Urology. 2018;199(1):26-8.

84. Wyatt AW, Gleave ME. Targeting the adaptive molecular landscape of castration-resistant prostate cancer. Embo Molecular Medicine. 2015;7(7):878-94.

85. Zhang XY, Liu ZJ, Xu B, Sun ZL, Gong YQ, Shao CS. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization. European journal of pharmacology. 2012;677(1-3):47-54.

86. Pham DC, Chang YC, Lin SR, Fuh YM, Tsai MJ, Weng CF. FAK and S6K1 Inhibitor, Neferine, Dually Induces Autophagy and Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells. Molecules. 2018;23(12).

87. Zhang Q, Li Y, Miao C, Wang Y, Xu Y, Dong R, et al. Anti-angiogenesis effect of Neferine via regulating autophagy and polarization of tumor-associated macrophages in high-grade serous ovarian carcinoma. Cancer Lett. 2018;432:144-55.

88. Poornima P, Quency RS, Padma VV. Neferine induces reactive oxygen species mediated intrinsic pathway of apoptosis in HepG2 cells. Food Chem. 2013;136(2):659-67.

89. Yang DY, Zou XC, Yi RK, Liu WW, Peng DG, Zhao X. Neferine increase in vitro anticancer effect of dehydroepiandrosterone on MCF-7 human breast cancer cells. Appl Biol Chem. 2016;59(4):585-96.

90. Xu L, Zhang X, Li Y, Lu S, Lu S, Li J, et al. Neferine induces autophagy of human ovarian cancer cells via p38 MAPK/ JNK activation. Tumour Biol. 2016;37(7):8721-9.

91. Hortobagyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer - An overview. Drugs. 1997;54:1-7.

92. Shen F, Chu S, Bence AK, Bailey B, Xue X, Erickson PA, et al. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. J Pharmacol Exp Ther. 2008;324(1):95-102.

93. Klippstein R, Bansal SS, Al-Jamal KT. Doxorubicin enhances curcumin's cytotoxicity in human prostate cancer cells in vitro by enhancing its cellular uptake. Int J Pharmaceut. 2016;514(1):169-75.

94. Li LY, Luo L, Wang XD. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature. 2001;412(6842):95-9.

95. Wang XD. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Gene Dev. 2001;15(22):2922-33.

96. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Darband SG, Kaviani M, Mihanfar A, Aghazadeh Attari J, Yousefi B, et al. DNA damage response and repair in colorectal cancer: Defects, regulation and therapeutic implications. DNA Repair (Amst). 2018;69:34-52.

97. Davalli P, Marverti G, Lauriola A, D'Arca D. Targeting Oxidatively Induced DNA Damage Response in Cancer: Opportunities for Novel Cancer Therapies. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:2389523.

98. Turkekul K, Colpan RD, Baykul T, Ozdemir MD, Erdogan S. Esculetin Inhibits the Survival of Human Prostate Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Arresting the Cell Cycle. J Cancer Prev. 2018;23(1):10-7.

99. Yan XH, Qi M, Li PF, Zhan YH, Shao HJ. Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. Cell Biosci. 2017;7.

100. Deng XH, Song HY, Zhou YF, Yuan GY, Zheng FJ. Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro. Exp Ther Med. 2013;6(5):1155-8.

101. Zhu C, Yan X, Yu A, Wang Y. Doxycycline synergizes with doxorubicin to inhibit the proliferation of castration-resistant prostate cancer cells. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2017;49(11):999-1007.

102. Fan XZ, Wang LF, Guo YL, Xiong XY, Zhu LH, Fang KJ. Inhibition of prostate cancer growth using doxorubicin assisted by ultrasound-targeted nanobubble destruction. Int J Nanomed. 2016;11:3585-96.

103. Tehranian N, Sepehri H, Mehdipour P, Biramijamal F, Hossein-Nezhad A, Sarrafnejad A, et al. Combination effect of PectaSol and Doxorubicin on viability, cell cycle arrest and apoptosis in DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines. Cell Biol Int. 2012;36(7):601-10.

104. He Y, Khan M, Yang J, Yao M, Yu S, Gao H. Proscillaridin A induces apoptosis, inhibits STAT3 activation and augments doxorubicin toxicity in prostate cancer cells. Int J Med Sci. 2018;15(8):832-9.

105. Lin RW, Ho CJ, Chen HW, Pao YH, Chen LE, Yang MC, et al. P53 enhances apoptosis induced by doxorubicin only under conditions of severe DNA damage. Cell Cycle. 2018;17(17):2175-86.

106. Chappell WH, Lehmann BD, Terrian DM, Abrams SL, Steelman LS, McCubrey JA. p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. Cell Cycle. 2012;11(24):4579-88.

107. Movafegh B, Jalal R, Mohammadi Z, Aldaghi SA. Poly-L-arginine: Enhancing Cytotoxicity and Cellular Uptake of Doxorubicin and Necrotic Cell Death. Anticancer Agents Med Chem. 2018;18:307-320.

108. Meredith AM, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. J Pharm Pharmacol. 2016;68(6):729-41.

109. Huang C, Li Y, Cao P, Xie Z, Qin Z. Synergistic effect of hyperthermia and neferine on reverse multidrug resistance in adriamycin-resistant SGC7901/ADM

gastric cancer cells. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]. 2011;31(4):488.

110. Chen JS, Chen BS, Zou ZH, Li W, Zhang YM, Xie JL, et al. Costunolide enhances doxorubicin-induced apoptosis in prostate cancer cells via activated mitogen-activated protein kinases and generation of reactive oxygen species. Oncotarget. 2017;8(64):107701-15.

111. Tanaka M, Rosser CJ, Grossman HB. PTEN gene therapy induces growth inhibition and increases efficacy of chemotherapy in prostate cancer. Cancer Detect Prev. 2005;29(2):170-4.

112. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. Current cancer drug targets. 2008;8(3):187-98.

113. Cai T, Nesi G, Luciani LG, Tinacci G, Giubilei G, Tiscione D, et al. Clinical Importance of Lymph Node Density in Predicting Outcome of Prostate Cancer Patients. Eur Urol Suppl. 2011;10(2):322-3.

114. Shah RB, Mehra R, Chinnaiyan AM, Shen RL, Ghosh D, Zhou M, et al. Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases: Lessons from a rapid autopsy program. Cancer Res. 2004;64(24):9209-16.

115. Gandaglia G, Karakiewicz PI, Briganti A, Passoni NM, Schiffmann J, Trudeau V, et al. Impact of the Site of Metastases on Survival in Patients with Metastatic Prostate Cancer. European Urology. 2015;68(2):325-34.

116. Zhang P, Li J, Ghazwani M, Zhao WC, Huang YX, Zhang XL, et al. Effective co-delivery of doxorubicin and dasatinib using a PEG-Fmoc nanocarrier for combination cancer chemotherapy. Biomaterials. 2015;67:104-14.

117. Deng G, Zeng S, Ma J, Zhang Y, Qu Y, Han Y, et al. The anti-tumor activities of Neferine on cell invasion and oxaliplatin sensitivity regulated by EMT via Snail signaling in hepatocellular carcinoma. Sci Rep. 2017;7:41616.

ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

Şekil 1. Hipotalamus-hipofiz-testis aksı ve prostat bezinin konumu.....**4**
Şekil 2. Testosteron ve östrojenin biyosentezi.....**5**
Şekil 3. Androjen ve östrojenlerin prostat epitel hücrelerindeki rolü.....**6**
Şekil4. Kanser ile ilişkili sinyal ileti yolları. A: PIK3/AKT aracılı kontrol mekanizmaları, B: JAK-STAT, MAPK, ERK aracılı kontrol mekanizmaları.....**8**
Şekil 5. İnvazyon, migrasyon, ekstravazasyon ve metastaz süreçleri.....**10**
Şekil 6. Kanser hücrelerinde doksorubisin ve neferin tedavisinin etkinliği. **15**
Şekil 7. Doksorubisin ve neferinin kimyasal yapısı **16**
Şekil 8. Doksorubisin uygulanan PC3 hücrelerinde inkübasyon süresi ve doza bağlı hücre sağkalımına etkisi..**.....26**
Şekil 9. Neferin uygulanan PC3 hücrelerinde inkübasyon süresi ve konsantrasyona bağlı hücre sağkalımına etkisi. **27**
Şekil 10. Neferin, doksorubisin ve kombinasyonun PC3 hücre sağkalımına etkisi **. .28**
Şekil 11. Doksorubisin terapisinin LNCAP hücrelerinde konsantrasyona bağlı hücre sağkalımına etkisi.....**29**
Şekil 12. Neferinin LNCaP hücrelerinde konsantrasyona bağlı hücre sağkalımına etkisi..**.....30**
Şekil 13. LNCaP hücrelerinde neferinin ve doksorubisin tedavi etkinliğietkisi.**.....31**

Şekil 14. PC3 ve LNCAP hücrelerinde neferin ve doksorubisin tedavisinin hücre ölümü ve apoptoz üzerine etkisi**. 32**
Şekil 15. PC3 ve LNCAP hücrelerinde neferin ve doksorubisin terapisinin hücre döngüsüne etkisi. **.....34**
Şekil 16. Neferin ve doksorubisin maruziyeti Bcl-XL mRNA anlatımına etkisi**. 35**
Şekil 17. Neferinin ve doksorubisin tedavisinin Survivin gen anlatımı üzerine etkisi. **36**
Şekil 18. Neferinin ve doksorubisinin Bax gen anlatımı üzerine etkisi. **.....37**
Şekil 19. Neferinin ve doksorubisinin kaspaz-3 gen anlatımı üzerine etkisi. **.....38**
Şekil 20. Neferinin ve doksorubisinin kaspaz-8 gen anlatımı üzerine etkisi**. 39**
Şekil 21. Neferinin ve doksorubisinin Sitokrom c gen anlatımına etkisi**. 40**
Şekil 22. Neferinin ve doksorubisinin P53 gen anlatımı üzerine etkisi. **.....41**
Şekil 23. Neferinin ve doksorubisinin p21 gen anlatımı üzerine etkisi**.....42**
Şekil 24. Neferinin ve doksorubisinin Cdk 2 gen anlatımı üzerine etkisi**. 43**
Şekil 25. Neferin ve doksorubisinin Cdk 4 gen anlatımı üzerine etkisi. **.....44**
Şekil 26. Neferinin ve doksorubisinin CDK 6 gen anlatımı üzerine etkisi**. 45**
Şekil 27. Neferinin ve doksorubisinin Beklin 1 gen anlatımı üzerine etkisi **.....46**
Şekil 28. Neferinin ve doksorubisinin ATG7 gen anlatımı üzerine etkisi**. 47**
Şekil 29. Neferinin ve doksorubisinin snail gen anlatımı üzerine etkisi**. 48**
Şekil 30. Neferinin ve doksorubisinin TRAIL-R gen anlatımı üzerine etkisi.**.....49**
Şekil 31. Neferinin ve doksorubisinin PTEN gen anlatımı üzerine etkisi. **.....50**
Şekil 32. Uygulamalar sonra hücrelerin mikroskobik görüntüsü.**.....51**
Şekil 33. Floresan mikroskopta Hoecsth 33342 ile apoptoz görüntüsü.**.....52**
Şekil 34. Tedavi uygulamalarının hücre migrasyonuna etkisi. **.....54**

ÖZGEÇMİŞ

Ad:	Talha
Soyad:	BAYKUL
Doğum Yeri:	Bakırköy/İSTANBUL
Doğum Tarihi:	03.12.1993
E-Posta Adresi:	talhabakul_@hotmail.com

EĞİTİM

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Tıbbi Biyoloji
A.B.D.- Yüksek Lisans
2016-2018

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji- Lisans
2012-2016

YAYINLAR

1. Turkekul, K., Colpan, RD., Baykul, T., Ozdemir, MD., Erdogan, S. Esculetin Inhibits the Survival of Human Prostate Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Arresting the Cell Cycle. Journal of Cancer Prevention 2018;23:10-17.

2. Turkekul, K, Baykul, T., Colpan, D., Ozdemir, M., Erdogan, S. Esculetin Inhibits Human Prostate Cancer Cells Trough Inducing Apoptosis And Cell Cycle Arrest. Association of Thrace Universities 1st International Health Sciences Congress, 23-25.11.2017, Edirne, Turkey.

PROJELER

1. Neferin molekülünün prostat kanser hücrelerinin kemoterapi duyarlılığına etkisi TÜBAP 2018-01, Araştırmacı.

2. Prostat Kanser Kök Hücrelerinin Apoptozu, Proliferasyonu Ve Anti-Neoplastik Tedavilerinde Midkin Büyüme Faktörünün Etkinliğinin Araştırılması, 2015-2018, TÜBİTAK-115S356, Bursiyer.