T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE
FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

NAFTAKİNON TÜREVLİ YENİ SENTEZ BİLEŞİKLERİN KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

REMZİ OKAN AKAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL-2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

NAFTAKİNON TÜREVLİ YENİ SENTEZ BİLEŞİKLERİN KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

REMZİ OKAN AKAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL-2020

ÖZET

NAFTAKİNON TÜREVLİ YENİ SENTEZ BİLEŞİKLERİN KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Remzi Okan Akar
Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi
Prof. Dr. Engin Ulukaya

2020

Prostat kanseri dünyada ikinci, İskandinavya da dahil gelişmiş ülkelerde ise en sık rastlanan birinci kanser türüdür. Hormon ve/veya kemoterapi tedavisi sonrası hücrelerde meydana gelen direnç kanser kaynaklı ölümlerin başlıca sebeplerindendir. Bu nedenle, prostat kanseri tedavisine yönelik yeni ilaç ve tedavi stratejilerinin araştırılmasının yanında, bu ilaç adaylarının etkilediği moleküler yolaklarının aydınlatılması araştırmacıların önemli çalışma sahalarındandır. Naftakinon türevli bileşiklerle yapılan çalışmalarda kanser tedavisinde umut verici etkilerinden ve klinikte kullanılan türevleri olmasından dolayı ilaç olarak kullanımının yaygınlaştığını görülmektedir. Naftakinon türevli ilaçlar topoizomeraz II inhibisyonu ve hücre içi ROS düzeylerinin arttırılması ile hücre ölümünü tetiklemektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, yeni sentez naftakinon türevli bir bileşiğin (K13) insan prostat kanseri hücre hatları (PC-3, DU 145 ve LNCaP) üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Naftakinon türevli bileşiğin hücre canlılığı üzerine etkileri SRB canlılık testi ile incelenmiştir. K13 bileşiğinin belirlenen dozlarında söz konusu hücre hatlarında ölüm mekanizmasının belirlenmesi amacıyla akım sitometrisi kullanılmıştır. Son olarak naftakinon türevli bileşiğin etki edebileceği sinyal yolakları ile ilişkili proteinlerin ifade düzeyleri immunoblotlama yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, yeni sentezlenen naftakinon türevli bileşiğinin üç kanser hücre hattında da hücre ölümünü tetiklediği, fakat mekanizma olarak farklılık gösterdiği bulunmuştur. K13 bileşiğinin prostat kanserinde umut vaad eden bir tedavi seçeneği olabileceği öngörüsüyle farklı kanser türleri de dahil in vitro deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Naftakinon, Apoptoz, Anti-kanser ilaç, Prostat kanseri

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF EFFECT OF NEW SYNTHESIZED NAPHTHOQUINONE DERIVED ON CANCER CELL LINES

Remzi Okan Akar
Cancer Biology and Pharmacology
Prof. Dr. Engin Ulukaya

2020

Prostate cancer is the second most common type of cancer in the world and the first most common type of cancer in developed countries including Scandinavia. The drug resistance after hormone and/or chemotherapy treatment is one of the main reason of cancer deaths. Therefore, investigating new drug and treatment strategies for prostate cancer treatment among many other cancer types as well as elucidating the molecular pathways of cancer are one of the research areas for the researchers. Naphthoquinone-derived compounds have been shown to be widely used as a drug because of their promising effects in the cancer treatment and their clinical use. The naphthoquinone-derived drugs trigger cell death by inhibiting topoisomerase II and increasing intracellular ROS. Therefore, in this thesis study, the cytotoxic effects of a new synthesis naphthoquinone derived compound (K13) on human prostate cancer cell lines (PC-3, DU 145 and LNCaP) were investigated. The effects of naphthoquinone-derived compound on cell viability were investigated by SRB viability test. Flow cytometry was used to determine the mechanism of death in said cell lines at designated doses of compound K13. Finally, the expression levels of proteins associated with signaling pathways that the naphthoquinone-derived compound may act on were determined by immunoblotting. As a result, it was found that the newly synthesized naphthoquinone derived compound triggered cell death in all three cell lines but differed as a mechanism. It was concluded that K13 may be a promising treatment option in prostate cancer and that in vivo experiments should be performed including different types of cancer.

Keywords: Naphthoquinone, Apoptosis, Anti-cancer drug, Prostate cancer

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımda danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, bilime olan heyecanını her toplantıda hissettiren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Tüm yüksek lisans ve laboratuvar hayatım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan, yol gösteren ve desteklerini hiç esirgemeyen çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK'e, Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Burçin GÜNGÖR'e,

Çalışmalarımız boyunca bana her konuda destek olan, benden moral ve desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım çalışma arkadaşlarım Merve ERKISA'ya, Selin SELVİ'ye, Hatice DİNÇER'e ve Melda SARIMAN'a,

Hayatımdaki her kararı birlikte verdiğimiz, iyi ve kötü günümde benimle olan ve umarım gelecekte de benimle olmaya devam edecek olan en büyük destekçim Canan ÖRMEN'e,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi sevgili ailem, babam Cengiz Cem AKAR, annem Özden GÜRBÜZLER ve kardeşim Öner Emre AKAR'a en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Remzi Okan AKAR

04/01/2020

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY
ETİK BEYANI
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **v**
GİRİŞ **3**
1. GENEL BİLGİLER **4**
1.1. PROSTAT KANSERİ **7**
1.1.1. Prostat Kanseri Risk Faktörleri **9**
1.1.2. Prostat Kanseri Moleküler Biyolojisi **10**
1.1.3. Prostat Kanseri Tedavisi **11**
1.2. APOPTOZ **13**
1.3. NEKROZ **19**
1.4. NEKROPTOZ **21**
1.5. EPİTELYAL-MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM **22**
1.6. NAFTAKİNON TÜREVLİ İLAÇLAR **22**
2. MATERYAL METOD **23**
2.1. MATERYAL **23**
2.1.1. Kimyasal Maddeler **23**
2.1.2. Sarf Malzemeler **24**
2.1.3. Cihazlar **25**
2.2. METOT **26**
2.2.1. İstanbul Üniversitesi Tarafından Sentezlenen Naftakinon Türevli Bileşiğin Hazırlanması **26**
2.2.2. Hücre Kültürü **26**
2.2.3. Hücrelerin Stoklanması **27**
2.2.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması **27**

2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı **27**
2.2.6. Sulforhodamine B (SRB) Testi ile Canlılık Tayini..... **27**
2.2.7. Akım Sitometrisi ile Anneksin V Analizi..... **28**
2.3.8. Akım Sitometrisi ile Kaspaz 3/7 Aktivasyon Analizi..... **30**
2.3.9. Akım Sitometrisi ile Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi **30**
2.3.10. Akım Sitometrisi ile DNA Hasarı Analizi..... **30**
2.3.11. Akım Sitometrisi ile Bcl-2 Analizi **31**
2.3.12. Akım Sitometrisi ile ROS Analizi **31**
2.3.13. Western Blot Analizi..... **32**
2.3.14. qRT-PCR Analizi..... **33**
2.3.15. İstatistiksel Analiz..... **36**
3.BULGULAR 37
3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları **37**
3.2. Akım Sitometrisi Bulguları **39**
3.2.1. Anneksin V Testi **39**
3.2.2. Kaspaz 3/7 Testi..... **43**
3.2.3. Mitopotential Testi..... **47**
3.2.4. Bcl-2 Testi..... **51**
3.2.5. ROS Testi..... **55**
3.2.6. H2AX DNA Hasarı Testi..... **56**
3.3. Western Blot Bulguları..... **59**
3.4. qRT-PCR Bulguları..... **60**
4. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 62
KAYNAKÇA 67

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Kanserin ayırt edici özellikleri 7
Şekil 1.2: Erkek üreme sistemi 8
Şekil 1.3: Gleason Skorlama 9
Şekil 1.4: Apoptozun mikroskopik görüntüsü. Oklar apoptotik hücreler göstermektedir. 15
Şekil 1.5: Apoptozun transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmesi. Oklar fragmente nükleusu, ok başları ise apoptotik cisimleri göstermektedir. 16
Şekil 1.6: İçsel ve dışsal yolağın şematik gösterimi. 17
Şekil 3.1: Doza bağlı K13 bileşiği uygulamasının prostat kanseri hücre hatlarında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi 38
Şekil 3.2: K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 40
Şekil 3.3: K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması ile kaspaz 3/7 değerlendirmesi sonucu elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 44
Şekil 3.4: K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu mitokondri membranı değerlendirmesi sonucu elde edilen sağlıklı mitokondri yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 48
Şekil 3.5: K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu Bcl-2 ifadesinin ve fosforilasyonun değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 52
Şekil 3.6: K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu hücre içi ROS değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 56
Şekil 3.7: K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu DNA hasarı değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları 58
Şekil 3.8: PC-3, DU 145 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, K13 (2.5, 5 ve 10 μM) ile 12 ve 24 saat tedavi sonrasında N-kaderin, E-kaderin ve Vimentin protein ifade düzeylerinin Western blot yöntemiyle alınan sonuçları 60
Şekil 3.9: PC-3, DU 145 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, K13 (10 μM) ile 12 saat tedavi sonrasında EMT ve hücre ölümü ile ilgili genlerin ifade düzeylerinin qRT-PCR yöntemiyle alınan sonuçları 61

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar. 20
Tablo 3.1: K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi..... 41
Tablo 3.2: K13 bileşiğinin 24 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi..... 42
Tablo 3.3: K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 45
Tablo 3.4: K13 bileşiğinin 24 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 46
Tablo 3.5: K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 49
Tablo 3.6: K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 50
Tablo 3.7: K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 53
Tablo 3.8: K13 bileşiğinin 24 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 54

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
7-AAD	: 7-Aminoaktinomisin D
ADT	: Androjen yoksunluğu tedavisi
AR	: Androjen Reseptörü
BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albümin
CAD	: Kaspazla aktive olan DNaz
DAI	: DNA-bağımlı interferon-düzenleyici faktör aktivatörü
DHT	: Dihidrotestosteron
DR5	: Ölüm reseptörü 5
DSB	: Çift sarmallı kırıklar
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm
ER	: Östrojen Reseptörü
FADD	: Fas ilişkili ölüm domaini
FasL	: Fas Ligandı
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
H2AX	: Histon 2 A.X
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HMGB1	: High Mobility Group Box 1 Protein
HDGF	: Hepatom-Türevi Büyüme Faktörü
ICAD	: Kaspazla aktive olan DNaz inhibitörü
ICE	: IL-1β-dönüştürücü enzim
IGFR	: Insülin-benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
IL-1β	: İnterlökin-1β
KDPK	: Kastrasyon Dirençli Prostat Kanseri
MET	: Mezenkimal-Epitelyal Dönüşüm
MLKL	: Mixed Lineage Kinase domain-Like
NEMO	: NF-κB esansiyel modülatörü
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PR	: Progesteron Reseptörü
pRb	: Retinoblastoma proteini
PRR	: Patojen Tanıma Reseptörü
PS	: Fosfatidilserin
PSA	: Prostat spesifik antijen
PI	: Propidyum iyodür
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog Proteini
RHIM	: Rip Homotipik Etkileşim Motifi
RIPK1	: Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz 1
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
TACE	: TNF-α dönüştürücü enzim
TBS	: Tris tamponu çözeltisi
TCA	: Trikoloroasetik asit

TEM : Transmisyon elektron mikroskopu
TIR : Toll/interlökin-1 reseptör
TNBC : Üçlü negatif meme kanseri
TNF : Tümör Nekroz Faktörü
TRADD : TNFR-1 ile ilişkili ölüm domaini
TRAIL : TNF ilişkili apoptoz-indükleyeci ligand
TRIF : TIR domain-içeren adaptör protein indükleyici interferon β
TSP1 : Trombospondin 1
VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WIP1 : Doğal Tip p53 ile indüklenen fosfataz 1

GİRİŞ

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde sıkça görülen ve yüksek ölüm oranına sahip olan prostat kanseri, dünyada her yıl bir milyonun üzerinde yeni vaka ile en sık görülen ikinci kanser türüdür. Tüm kanser türleri içinde ölüm oranı bakımından beşinci sırada yer almaktadır (Bray ve ark., 2018). Tedavi seçenekleri, hastalığın derecesine ve tekrarlama riskine, yaş ve komorbidite gibi hasta özelliklerine göre değişebilir. 65 yaşının altındaki erkeklerde tedavi seçeneği olarak daha çok radikal prostatektomi seçilirken, 75 yaş ve üstü erkeklerin yaklaşık yarısında ameliyat veya radyasyon kullanılmamaktadır. Tedavi yerine aktif izleme, özellikle daha az agresif tümörleri olan yaşlı erkekler için uygun ve yaygın olarak önerilen bir yaklaşımdır (Lu-Yao ve ark., 2009; Shappley ve ark., 2009). Androjen tedavisi, kemoterapi, radyasyon veya bu tedavilerin kombinasyonu daha ileri evrelerin tedavisinde kullanılabilmektedir. Abirateron ve enzalutamid gibi daha yeni hormon tedavisi türleri, son yıllarda geleneksel hormon tedavisine cevap vermeyen ileri evre prostat kanserini tedavi etmek için onaylanmıştır (Beer ve ark., 2014; Ryan ve ark., 2013). 5 yıllık sağkalım oranı lokalize kanseri olan hastalarda %100'e yaklaşırken, ileri evrede tanı alan hastalarda %28'e düşmektedir (Miller ve ark., 2016). İleri evre, metastatik ve kastrasyon dirençli prostat kanseri tedavisinde mevcut kanser ilaçları hâlâ yetersiz kalmaktadır. Bunun sonucunda araştırmacılar daha az yan etkiye sahip, daha güçlü ve seçici ilaçlar sentezlemeye yönelik çalışmalar yapmaya devam etmektedirler.

Kemoterapi ajanlarının kimyasal yapıları baz alınarak daha etkili olması hedeflenen yeni bileşikler araştırmacılar tarafından sentezlenmeye devam etmektedir. Bu bileşiklerden olan naftakinon türevli ilaç adaylarının farklı kanserlere karşı umut verici etkilerinden dolayı ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Jardim ve ark., 2015; Wellington, 2015). Naftakinon türevli bileşiklerin sitotoksik etkinliği DNA topoizomeraz II'yi inhibe edici özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Kennedy ve ark., 2011; Kumar ve ark., 2017). Ek olarak, kinon analogları sitokrom P450 redüktaz enzimi tarafından yarı kinon radikallerine dönüştürülür; bu yarı kinonlar normal

oksijen seviyesinde okside olarak kinonlara geri dönüştürülür. Bu olay sırasında O_2 indirgenir ve süperoksit radikal iyonu (O_2^-) oluşur. Hem süperoksit hem de yarı kinon radikal anyonları, DNA iplikçik kopmalarına neden olduğu bilinen hidroksil radikalini üretebilir (Tewey ve ark., 1984; Wellington, 2015). Daha önce farklı naftakinon türevli bileşiklerle yapılan çeşitli çalışmalarda bu bileşiklerin ROS artışı üzerinden apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Karakaş ve ark., 2019; Wang ve ark., 2018).

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yeni sentezlenmiş 1,4-naftakinon türevli bileşiğin PC-3, LNCaP ve DU 145 insan prostat kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkinliği ve bu etkinin moleküler mekanizması araştırılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

Kanser düzenli olmayan hücre büyümesi, invazyon ve hücrelerin orijinden ya da primer bölgeden vücudun diğer yerlerine yayılması ile karakterize edilen, ortaya çıkışı, gelişimi ve sonucu bir hastadan diğer hastaya oldukça değişkenlik gösteren karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser hastalığı, hücrelerin köklü metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdiği çok aşamalı bir süreçtir. Kanser hücreleri aşırı ve zamansız bir şekilde çoğalıp uzaktaki dokulara bile yayılabilmektedirler (Merlo ve ark., 2006). Kanserin ayırt edici özellikleri şu şekilde özetlenebilir: proliferatif sinyalleri sürdürme, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, hücre ölümüne direnç, sınırsız bölünme yeteneği, anjiyogenez, invazyon ve metastaz, enerji metabolizmasını yeniden programlama, immün sistemden kaçma, tümör destekleyici enflamasyon, genomik instabilite ve mutasyon yükü taşımı (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu özellikler aşağıdaki şekilde daha detaylı olarak açıklanabilir:

Proliferatif sinyalleri sürdürme: Sağlıklı hücrelerde yeni bir hücre döngüsüne giriş epidermal büyüme faktörü (EGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır (Yarden ve Ullrich, 1988). Kanser hücrelerinde bu yolaklar, büyüme faktörlerinin veya reseptörlerinin ifade düzeylerinin artmasıyla ve reseptörün ve / veya alt hedef moleküllerinin yapısal değişiklikleriyle de bozulabilir. Bu bozukluk neticesinde kanser hücreleri devamlı olarak proliferasyon sinyali almakta ve kontrolsüz biçimde bölünmesini sürdürmektedir (Perona, 2006; Witsch ve ark., 2010).

Büyüme baskılayıcılarından kaçınma: Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerin proliferasyonunu sınırlayan çoklu tümör baskılayıcı yolaklardan kaçınmak zorundadır (Sun ve Yang, 2010). Retinoblastoma proteini (pRb) ve p53 gibi tümör baskılayıcı proteinler, çeşitli hücre dışı ve hücre içi sinyallere cevap olarak hücre döngüsünü durdurabilir veya apoptozu indükleyebilir (Harbour ve Dean, 2000; Kruiswijk ve ark., 2015). Kanser hücrelerinde bu proteinler delesyona veya mutasyona uğrayabilir ve yeni kanserojen işlevler kazanabilir (Deshpande ve ark., 2005; Sherr ve McCormick, 2002).

Hücre ölümüne direnç: Stres koşullarında sağlıklı hücreler, p53 yolağı üzerinden apoptoz, otofaji veya nekroz yoluyla hücre ölümüne uğrar (Hoffman ve Liebermann, 2008; Tagoug ve ark., 2011). Tümör hücreleri proliferatif sinyalleri arttırarak veya anti-apoptotik ve pro-apoptotik faktörlerin modülasyonu ile apoptozdan kaçınabilir (Igney ve Krammer, 2002).

Sınırsız bölünme yeteneği: Hücrelerin kromozomal DNA'sı zamanla kısalır ve bu kısalma sonucunda hücre yaşlanıp apoptoza sonucunda ölür. Söz konusu bu kısalma telomerlerle korunur (Blasco, 2005). Kanser hücreleri, koruyucu enzim olan telomeraz üretimini arttırarak telomer uzunluğunu koruyabilir (Artandi ve DePinho, 2010; Artandi ve DePinho, 2000; Shammas, 2011; Shay ve Wright, 2011).

Anjiyogenez: Normal yetişkin dokularda, anjiyogenez fizyolojik ihtiyaçlara göre geçici olarak aktive edilir (Papetti & Herman, 2002). Kanser hücreleri beslenmesini sürdürmek ve metastaz için bir taşıma sistemi sağlamak için VEGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombospondin 1 (TSP1) gibi pro-anjiyogenik büyüme faktörlerini kullanarak anjiyogenezi sürekli olarak aktive eder (Carmeliet, 2005; Kazerounian, Yee ve Lawler, 2008; Turner ve Grose, 2010). Ayrıca, anjiyogenez mekanizması immün sistem hücrelerinin tümör dokusuna infiltrasyonu ile de kolaylaştırılır (Murdoch ve ark., 2008; Zumsteg ve Christofori, 2009).

İnvazyon ve metastaz: Sağlıklı hücreler, hücre dışı matriksin yanı sıra birbirine de tutunur (Geiger ve Yamada, 2011). Kanser hücreleri, epitelyal-mezenkimal geçişi mümkün kılan embriyonik faktörlerin ekspresyonuyla ve motilite ve invazyonu sağlayan yapışma faktörlerinin düzensizliği ile bu yeteneklerini kaybedebilir (Berx ve van Roy, 2009; Yang ve Weinberg, 2008). Tümörü çevreleyen bağışıklık hücreleri ve tümör mikroçevresine ait hücreler (kanser ilişkili fibroblast gibi), proteolitik enzimleri veya büyüme faktörlerini aktive ederek invazyon ve metastaza katkıda bulunabilir (Joyce ve Pollard, 2009; Yang ve ark., 2011).

Enerji metabolizmasını yeniden programlama: Sağlıklı hücreler aerobik koşullarda iki aşamalı olan glikoliz gerçekleştirirken, anaerobik koşullarda ise tek aşamalı glikolize geçerler (Hüttemann ve ark., 2007). Kanser hücreleri ise oksijenin varlığında bile tek aşamalı glikoliz gerçekleştirirler (Feron, 2009; Vander Heiden ve ark., 2009). Bu şekilde glikolizdeki ara ürünleri komşu ve yeni hücrelere yönlendirebilir ve laktik asit üretimi ile kendilerine daha asidik bir ortam

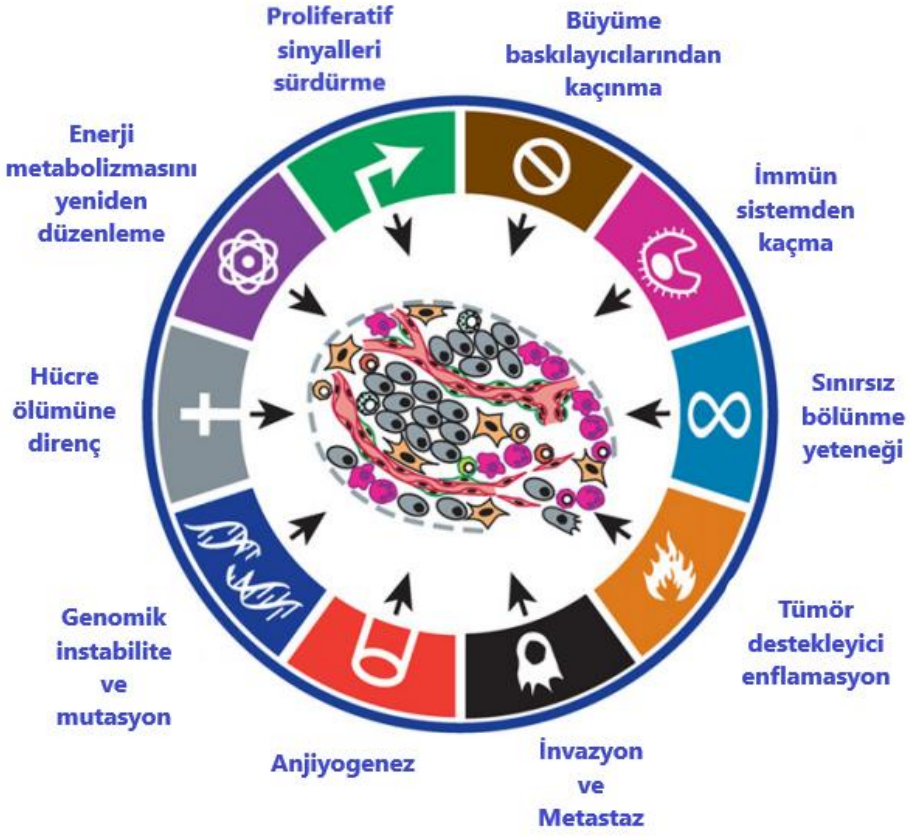
sağlayabilirler. Bu değişim onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcıların değiştirilmesiyle indüklenebilir (DeBerardinis ve ark., 2008; Jones ve Thompson, 2009).

İmmün sistemden kaçma: Normal koşullarda hücreler sürekli olarak bağışıklık hücreleri tarafından taranır ve anormallik durumunda elimine edilirler (Gajewski ve ark., 2013). Kanser hücreleri, immün baskılayıcı faktörler üreterek veya immün baskılayıcı enflamatuar hücreleri tümör dokusuna toplayarak immün sistemden kaçabilir (Mougiakakos ve ark., 2010; Ostrand-Rosenberg ve Sinha, 2009; Shields ve ark., 2010; Yang ve ark. 2010).

Tümör destekleyici enflamasyon: Bağışıklık hücrelerinin tümör dokusuna toplanması ve enflamasyon varlığı, hücrelerin hayatta kalma, büyüme ve pro-anjiyogenik faktörlerin yanı sıra mutajenik oksijen türevleri sağlayarak kanserin ayırt edici özellikler kazanmasını sağlayabilir (DeNardo ve ark., 2010; Grivennikov ve ark., 2010; Qian ve Pollard, 2010).

Genomik instabilite ve mutasyon yükü taşıma: Genomdaki çeşitli değişiklikler hücrelerin kanserin ayırt edici özellikleri kazanmasını sağlar (Negrini ve ark., 2010). TP53 geni gibi DNA'nın korunmasında rol alan bazı genlerin mutasyonları karsinogenik mutasyonların daha fazla birikmesine ve değişmiş hücrelerin hayatta kalmasını kolaylaştırır (Artandi ve DePinho, 2000; Haupt ve ark., 2016).

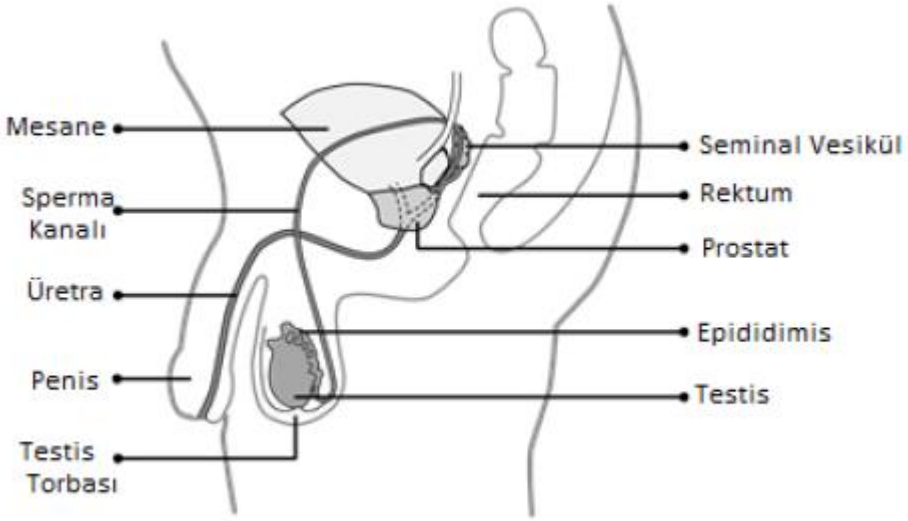
Birçok kanser sadece bir hücreden (ya da az sayıda hücreden) ortaya çıkmaktadır ve bu hücrelere kanser kök hücreleri adı verilmektedir (Erkisa ve ark., 2019; Nowell, 1976). Dünya'da 2012 yılında 14,1 milyon kişiye yeni kanser tanısı konmuş ve 8,2 milyon kişi kansere bağlı sebeplerden ölmüştür. Dünyada en sık görülen kanser türleri erkekler için sırasıyla akciğer, prostat ve kolon iken; kadınlar için sırasıyla meme, kolon ve akciğerdir. Gelişmiş ülkelere baktığımızda ise erkeklerde en sık rastlanan kanserler prostat, akciğer ve kolon; kadınlarda en sık rastlanan kanser türleri meme, kolon ve akciğerdir (Torre ve ark. 2015). Ülkemizde 2009 verilerine göre erkeklerde sık görülen kanser türleri akciğer, prostat, mesane, kolon ve midedir. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri ise meme, tiroit, kolon, uterus korpusu ve akciğer olarak belirlenmiştir (Gültekin ve Boztaş 2014).



Şekil 1.1. Kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

1.1. PROSTAT KANSERİ

Prostat spermleri besleyen ve taşıyan seminal sıvıyı üreten, küçük ceviz biçimli bir bezdir. Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen kanser türlerinden biridir. Genellikle prostat kanseri yavaş büyür ve başlangıçta ciddi zarar vermeyebileceği alan olan prostat beziyle sınırlıdır. Bununla birlikte, bazı prostat kanseri türleri yavaş büyür ve minimal tedaviye ihtiyaç duyar ya da hiç tedaviye ihtiyaç duymazken, diğer tipler agresiftir ve hızla yayılabilir. Hâlâ prostat beziyle sınırlı olan, erken evrede saptanan prostat kanserinin daha iyi bir tedavi şansı vardır.



Şekil 1.2. Erkek üreme sistemi (Martini ve ark., 2008)

Erken evrede prostat kanserinin hiçbir belirtisi olmayabilir. İleri evre prostat kanserinde ise şu belirtiler görülebilir:

- İdrar yapmada zorluk
- İdrar akış kuvvetinde azalma
- Semende kan görülmesi
- Pelvik bölgesinde rahatsızlık
- Kemik ağrısı
- Erektil disfonksiyon

Gleason derecelendirme sistemi prostat kanseri olan erkeklerin prostat biyopsisinden örnekler kullanarak hastalığın prognozunu değerlendirmek için kullanılır. Bu sistem diğer parametrelerle birlikte prognozu öngören ve tedaviyi yönlendirmeye yardımcı olan prostat kanseri evrelemesi stratejisine dahil edilmiştir. Mikroskobik görünümüne bağlı olarak prostat kanserine bir Gleason skoru verilir. Gleason skoru daha yüksek olan kanserler daha agresif ve kötü prognozludur. Patolojik skorlar 2 ile 10 arasında değişmekte olup, daha yüksek rakamlar daha büyük riskler ve daha yüksek ölüm oranları göstermektedir. Toplam skor, hücrelerin mikroskopta nasıl göründüğüne bağlı olarak hesaplanır. Skorun ilk kısmı dominant veya en yaygın görülen hücre morfolojisine dayanır (1-5 puan). İkinci kısım ise dominant olmayan hücre desenine göre skorlanır (1-5 puan). Bu iki sayı toplanarak Gleason skoru elde edilir (Ertoy Baydar, 2017). Gleason skorunun yanı sıra hastalarda Prostat spesifik

antijen (PSA) düzeyleri de incelenir. PSA her zaman kesin sonuçlar vermese de hâlâ klinikte yaygın olarak kullanılan ve Gleason skorlama ile birlikte değerlendirilen, prostat kanseri tanısı için önemli bir parametredir (Carroll ve ark., 2014; Horwich ve ark., 2013). PSA değeri <10 ng/ml ve Gleason skoru <7 olan hastalar düşük risk grubunda; PSA değeri 10-20 ng/ml veya Gleason skoru 7 olan hastalar orta risk grubunda; PSA değeri >20 ng/ml veya Gleason skoru >7 olan hastalar yüksek risk grubunda olarak değerlendirilir (Başaran ve ark., 2015).



Şekil 1.3. Gleason Skorlama (Anonim, 2019)

1.1.1. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

Prostat kanseri riskinizi artırabilecek faktörler şunlardır:

- Yaş. Prostat kanserinin en önemli risk faktörüdür. 45 yaş altında nadir görülür. Prostat kanseri riski yaşlandıkça artabilmektedir.
- Irk. Henüz belirlenemeyen sebeplerden dolayı, siyahi erkekler diğer ırklardan daha fazla prostat kanseri riski taşımaktadır. Siyahi erkeklerde, prostat kanserinin ayrıca agresif veya ilerlemiş olma olasılığı daha yüksek olduğu bulunmuştur.
- Aile öyküsü. Ailedeki erkekler prostat kanseri geçirmişse, risk artmaktadır. Ayrıca, meme kanseri riskini (BRCA1 veya BRCA2) ya da çok güçlü bir aile

meme kanseri riskini artıran bir aile gen geçmişi varsa, prostat kanseri riskinin daha yüksek olabileceği ön görülmüştür.

- Obezite. Prostat kanseri teşhisi konan obez erkeklerin tedavisi daha zor olan ileri hastalığa sahip olma olasılığı daha yüksektir (Mayo Clinic, 2019).

1.1.2. Prostat Kanseri Moleküler Biyolojisi

Androjen reseptörü (AR) testosteron ve dihidrotestosteron için bir transkripsiyon faktörüdür ve dört ana domain içeren (N-terminal domain, DNA-bağlama domaini, menteşe domaini ve ligand bağlama domaini) bir steroid reseptördür. AR prostat kanserinde, özellikle kastrasyon dirençli prostat kanserinde (KDPK) çok önemli rol oynamaktadır. Androjen yoksunluğu tedavisi, hormon-naif prostat kanserini baskılayabilir ancak prostat kanseri AR'yi yeniden düzenler ve hücreler düşük androjen seviyelerinde hayatta kalmaya adapte olur. Bu adaptasyon mekanizmaları arasında AR noktası mutasyonları, AR aşırı anlatımı, androjen biyosentezindeki değişiklikler, ligand bağlanması olmaksızın yapısal olarak sürekli aktif AR varyantları ve androjen kofaktörlerinin değişiklikleri bulunur. KDPK'nde AR üzerine yapılan çalışmalar, AR'nin KDPK'nde hâlâ aktif olduğunu ve KDPK'ni tedavi etmek için potansiyel bir hedef olarak kaldığını ortaya koymuştur. Enzalutamide, taksan bazlı kemoterapiden önce ve sonra KDPK'li hastalarda etkili ikinci kuşak bir anti-androjendir. Bununla birlikte, KDPK hâlâ tedavi edilemeyebilir ve ilaç direnci geliştirebilir. Bu direncin mekanizmalarını anlamak KDPK için yeni nesil tedavileri sağlayabilir. Bazı umut verici yeni AR hedefli tedaviler geliştirilmiştir. Apalutamid, ligand bağlama alanına bağlanan yeni bir Gıda ve İlaç İdaresi onaylı androjen agonistidir ve AR'nin ligand bağlama alanına veya N-terminal alanına bağlanan diğer yeni AR-hedefli ajanların klinik deneyleri devam etmektedir (Fujita ve Nonomura, 2018).

Prostat kanserinin yalnızca %10'unun genetik olduğu, %90'ının ise çevre ve yaş etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Prostat kanseri ile ilgili mutasyonlar genellikle hücre büyümesi ilişkili genlerde, tümör baskılayıcı ve apoptozu tetikleyen genlerde olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı hücrelerdeki yaşlanma sürecinde kromozomların uçlarındaki telomer adı verilen özel bölgelerinde sürekli olarak gen kaybı olur. Kök hücreler ise telomer kısalmasını telomeraz adı verilen bir ters transkriptaz enzimi ile önler. Prostat kanserlerinde telomerazın aşırı ifade edildiği belirlenmiştir (Sommerfeld ve ark., 1996).

Hücrelerde metabolik olaylar sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur ve ROS mutajenik ve karsinojenik etki gösterebilirler. ROS glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi koruyucu enzimler tarafından inaktive edilirler. Bu enzimlerden biri olan GST-pi'nin anlatımının neredeyse tüm prostat kanseri vakalarında kaybolduğu bildirilmiştir. Söz konusu enzimin eksikliğinde ROS artmakta ve karsinogeneze neden olabilmektedir. Bu mutasyon prostat kanserlerinde sıkça rastlanan ve prostat kanseri oluşumuna zemin hazırlayan olaylardan biri olarak bildirilmiştir. Hem prostat bezindeki hem de metastatik prostat kanseri hücrelerinde, özellikle ileri evrede, fosfataz ve tensin homolog proteini (PTEN)'nde mutasyonlar saptanmıştır. PTEN fosfatidilinositol 3 kinaz/ Protein Kinaz B (PI3K/AKT) sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir (Stambolic ve ark., 1998). PI3K epidermal büyüme faktörü düzenleyicisi (EGFR), insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR) gibi hücrelerin büyümesi rol oynayan bazı büyüme faktörlerinin hedef proteinidir. PTEN ise PI3K'ı defosforile ederek inaktive eder. Prostat kanserinde PTEN delesyonu sonucunda PI3K/AKT yolağı sürekli aktif kalmakta ve hücre büyüme sinyali devam etmektedir (Wein ve ark., 2012).

MYC onkogeninin birçok kanserde olduğu gibi metastatik prostat kanserlerinde de aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir (Linja ve ark., 2001).

BH3 domaine Bcl-2 ailesine üye olan bcl-2 bir anti-apoptotik proteindir. Bcl-2 sağlıklı prostat hücreleri tarafından ifade edilir. Özellikle androjen bağımsız tümörlerde aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir (Raffo ve ark., 1995).

En çok bilinen tümör baskılayıcı gen olan TP53 delesyonu veya mutasyonu bölgesel ve metastatik tümörlerle ilişkilendirilmiştir. Prostat kanserinde radyoterapi alan hastalarda p53 mutasyonu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (Wein ve ark., 2012). Kanser hücreleri ve tümör mikroçevresindeki tümör ilişkili hücreler tarafından salgılanan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenezi tetiklemektedir. Prostat kanserlerinin çoğunda VEGF anlatımı görülmektedir. Anjiyogenez hem tümör hücrelerini beslemede hem de metastazında rol almaktadır. VEGF ifadesi androjen tarafından düzenlenmektedir (Botelho ve ark., 2010; Rivera-Perez ve ark., 2017).

1.1.3. Prostat Kanseri Tedavisi

Prostat kanseri sıklıkla çok yavaş büyüdüğü için, bazı erkekler (özellikle daha yaşlı veya başka ciddi sağlık problemleri olanlar) prostat kanseri için tedaviye asla

ihtiyaç duymayabilirler. Tedavi yerine doktorlar dikkatli bekleme veya aktif izlem olarak bilinen yaklaşımlar önerebilirler. Aktif izlem genellikle kanseri yakından takip etmek anlamına gelir. Bu yaklaşım PSA kan testi ve dijital rektal muayenesi ile yaklaşık 6 ayda bir doktor ziyareti içerir. Prostat biyopsileri de her yıl yapılabilir. Dikkatli bekleme ise daha az test gerektiren ve tedavinin gerekip gerekmediğine karar vermek için bir erkeğin semptomlarındaki değişikliklere daha fazla güvenmek anlamına gelebilecek daha az yoğun bir takip türünü tanımlamak için kullanılır. Düşük risk grubundaki hastalarda tercih edilen bir yöntemdir.

Kanser eğer prostat bezinin dışına yayılmamışsa ameliyat yaygın bir tedavi seçimidir. Prostat kanseri için ameliyat şekli radikal prostatektomidir. Cerrah, prostat bezinin tamamını ve seminal veziküller dahil olmak üzere etrafındaki dokuların bir kısmını çıkarır. Radikal prostatektomi farklı şekillerde yapılabilir. Her risk grubu için uygulanabilen bir tedavi yaklaşımıdır.

Radyasyon terapisi sadece prostat bezinde olan ve düşük dereceli kanser için ilk tedavi olarak tercih edilebilir. Bu tip kanserli erkekler için tedavi oranları, radikal prostatektomi ile tedavi edilen erkeklerle aynı orandadır. Radyasyon, prostat bezinin dışında ve yakındaki dokularda büyüyen kanserler için ilk tedavinin (hormon tedavisi) bir parçası olarak kullanılabilir. Buna ek olarak ameliyat sonrası kanser tamamen alınmazsa veya ameliyat sonrası prostat alanında tekrarlarsa radyasyon terapisi kullanılabilir. Ayrıca kanser ilerlemişse mümkün olduğu kadar kontrol altında tutmaya yardımcı olmak ve semptomları önlemek veya hafifletmek için radyasyon kullanılabilir.

Kriyoterapi (kriyocerrahi veya kar cerrahisi olarak da bilinir), prostat kanseri hücrelerinin dondurulması ve öldürülmesi için çok soğuk sıcaklıkların kullanılmasıdır. Kriyocerrahi olarak adlandırılmasına rağmen, aslında bir ameliyat türü değildir. Kriyoterapi bazen erken evre prostat kanserini tedavi etmek için kullanılır. Doktorların çoğu prostat kanseri için ilk tedavi olarak kriyoterapiyi tercih etmez ancak kanser radyasyon terapisinden sonra tekrarlamışsa bir seçenek olarak değerlendirilebilir.

Hormon tedavisinde [androjen yoksunluğu tedavisi (ADT) veya androjen supresyon tedavisi olarak da adlandırılır] amaç vücutta androjen adı verilen erkeklik hormonu seviyelerini azaltmak veya prostat kanseri hücrelerini etkilemelerini engellemektir.

Androjenler prostat kanseri hücrelerinin büyümesini uyarır. Vücuttaki ana androjenler testosteron ve dihidrotestosterondur (DHT). Androjenlerin çoğu testisler tarafından üretilir ancak adrenal bezler de az miktarda androjen üretir. Androjen seviyelerini düşürmek veya prostat kanseri hücrelerine girmesini engellemek genellikle prostat kanserlerinin küçülmesini veya daha yavaş büyümesini sağlar. Ancak tek başına hormon tedavisi prostat kanserini tedavi etmez.

Kemoterapi damar içine enjekte edilen veya ağız yoluyla verilen anti-kanser ilaçlardır. Bu ilaçlar kan dolaşımına girer ve vücudun her tarafına gider. Bu sebeple metastaz yapan kanserler için potansiyel bir tedavi yaklaşımıdır. Son araştırmalar ayrıca hormon tedavisiyle birlikte verildiğinde kemoterapinin yardımcı olabileceğini göstermiştir.

Prostat kanseri için, kemoterapi ilaçları tipik olarak bir seferde bir tane kullanılır. Prostat kanserini tedavi etmek için kullanılan kemoterapi ilaçlarının bazıları şunlardır:

- Dosetaksel
- Kabazitaksel
- Mitoksantron
- Estramustine

Çoğu durumda verilen ilk kemoterapi ilacı olan dosetaksel, steroid ilaç olan prednizonla birlikte verilir. Bu ilaç işe yaramazsa (veya çalışmayı durdurursa) kabazitaksel genellikle bir sonraki kemoterapi ilacıdır (Başaran ve ark., 2015; Mohler ve ark., 2019).

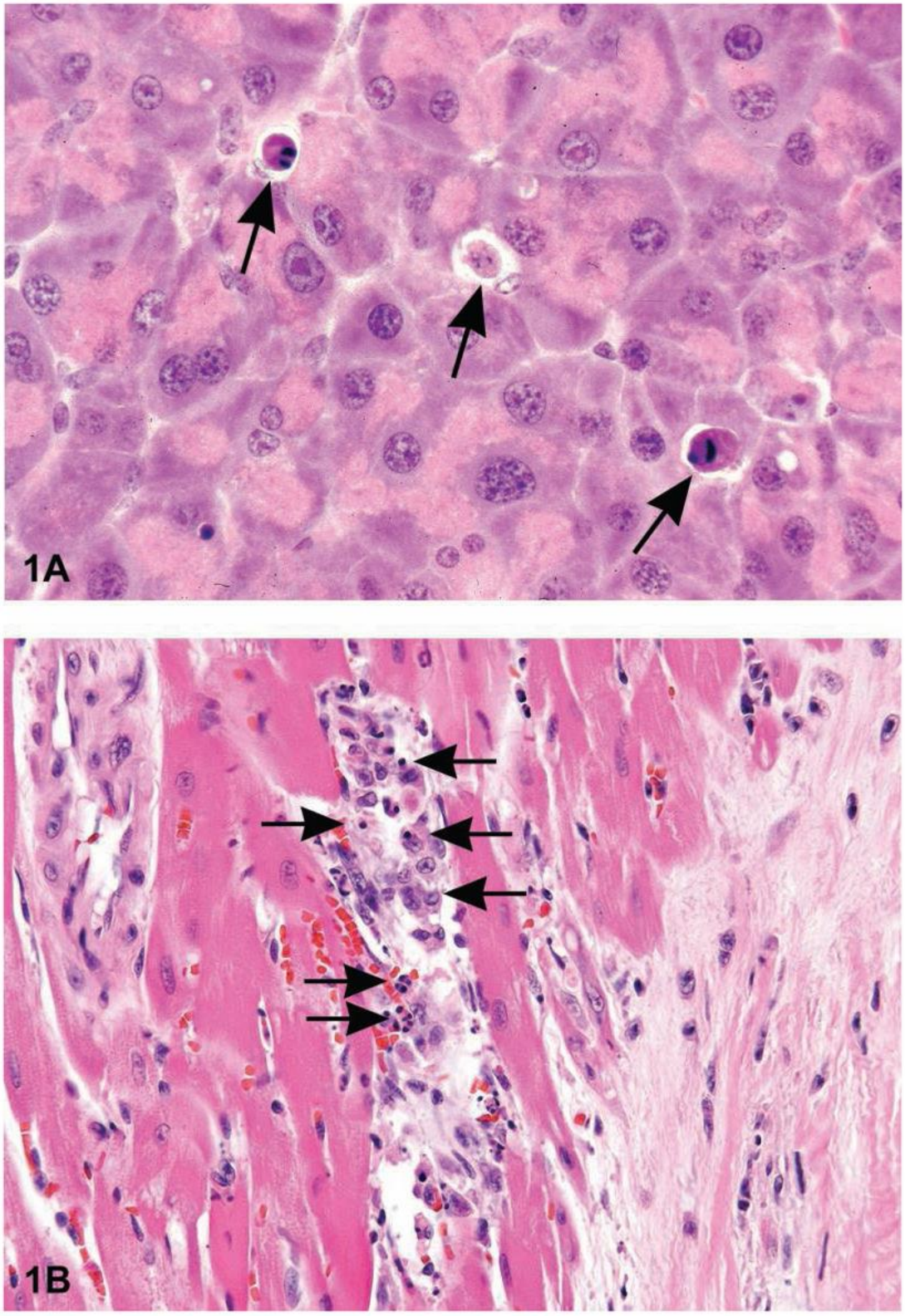
1.2. APOPTOZ

Apoptoz, programlı hücre ölümü, gelişim sırasında önemli bir rol oynar. Örneğin parmaklar arasındaki hücreler, fonksiyonel olmayan sinir hücreleri ve aktive edilmiş lenfositler apoptoz ile elimine edilir. Meme bezlerinin oluşumunda da apoptoz süreci gözlenir. İnsan vücudu her gün 10 ila 100 milyar hücre üretir ve aynı sayıda hücre vücudumuzdaki homeostazı korumak için ölür. Bakteriler veya virüsler tarafından enfekte olan hücreler de ölür. Fizyolojik koşullar altında gerçekleşen hücre ölümü temel olarak, iltihaplanmayan veya sessiz bir işlem olan apoptoz ile ilerlerken, patojen enfeksiyonu, bağışıklık sistemini aktive eden ve iltihaplanmaya neden olan nekroptoz veya piroptozu tetikler. Apoptoz kaskat halinde işleyen bir takım spesifik

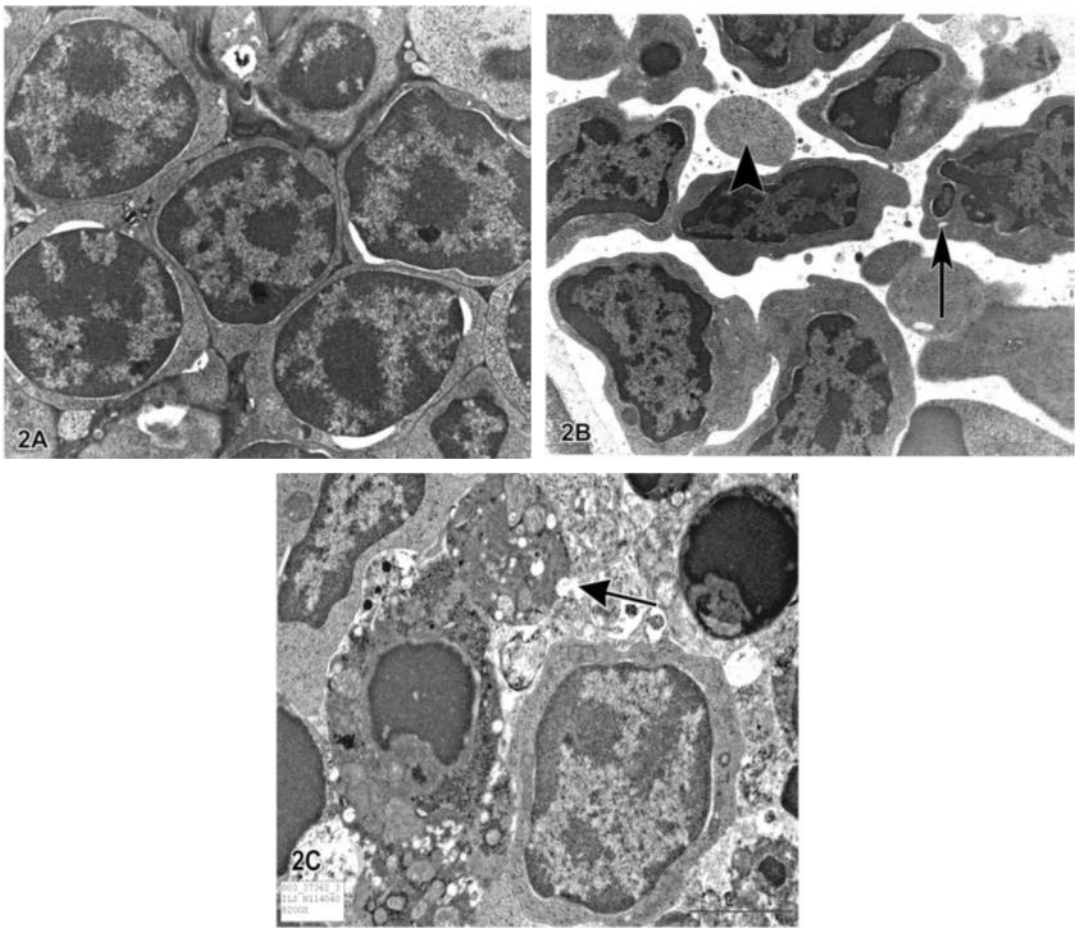
kazpazlar tarafından gerçekleştirilir. Bu kaskadın sonunda kaspaz 3 veya 7'nin rolü vardır. Apoptotik hücreler makrofajlar tarafından yutulur ve degrede edilir (deCathelineau ve Henson, 2003; Nagata, 2018). Bu işlem etkili ve hızlı olduğu için in vivo'da çok sayıda hücrenin apoptoz geçirdiği dokularda bile serbest apoptotik hücrelerin bulunması zordur (Surh & Sprent, 1994). Bu nedenle apoptoz yalnızca hücreleri öldürmek için değil, aynı zamanda makrofajları bölgeye çekmek için ("beni bul") ve makrofajlarca yutulmak için bir sinyal ("beni ye") sağlar (Medina ve Ravichandran, 2016; Nagata ve ark., 2010).

Işık ve elektron mikroskobu apoptoz sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikleri tanımlamıştır. Apoptozun erken döneminde hücre büzülmesi ve piknoz ışık mikroskobu ile görülebilir. Hücre büzülmesinde hücre boyutları küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve organeller daha sıkı paketlenir. Piknoz kromatin kondenzasyonunun bir sonucudur ve apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyası ile yapılan histolojik incelemede apoptoz, tek hücreleri veya küçük hücre kümelerini içerir. Apoptotik hücre koyu eozinofilik sitoplazmaya ve yoğun mor nükleer kromatin fragmentlerine sahip yuvarlak veya oval bir kütle olarak görünür (Şekil 1.2.). Elektron mikroskobu subselüler değişiklikleri daha iyi tanımlayabilir. Kromatin yoğunlaşma evresinin başlarında elektronca yoğun nükleer materyal karakteristik olarak nükleer zarın altında periferik alanda toplanır, bununla birlikte aynı miktarda yoğun çekirdekler de olabilir (Şekil 1.3. A,B). Aşırı hücre membranı bleblenmesi karyoheksiz ve "tomurcuklanma" adı verilen apoptotik cisimlerin hücreden ayrılması olayından sonra meydana gelir. Apoptotik cisimler, nükleer fragment içeren veya içermeyen, sıkı şekilde paketlenmiş organelleri olan sitoplazmadan oluşur (Şekil 1.3 C). Organel bütünlüğü hâlâ korunur ve bunların tümü intakt bir plazma mebranı içindedir. Apoptoz süreci ya da apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması süreci ile ilişkili enflamatuar reaksiyon yoktur. Çünkü;

- apoptotik hücreler hücresel bileşenlerini çevre dokuya salmazlar,
- çevre hücreler tarafından hızla fagosite olduklarından sekonder nekroz önlenir,
- fagositoz yapan hücreler anti-enflamatuar sitokinler üretmez.



Şekil 1.2. Apoptozun mikroskopik görüntüsü. Oklar apoptotik hücreleri göstermektedir (Susan, 2007).



Şekil 1.3. Apoptozun transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmesi. Oklar fragmente nükleusu, ok başları ise apoptotik cisimleri göstermektedir (Susan, 2007).

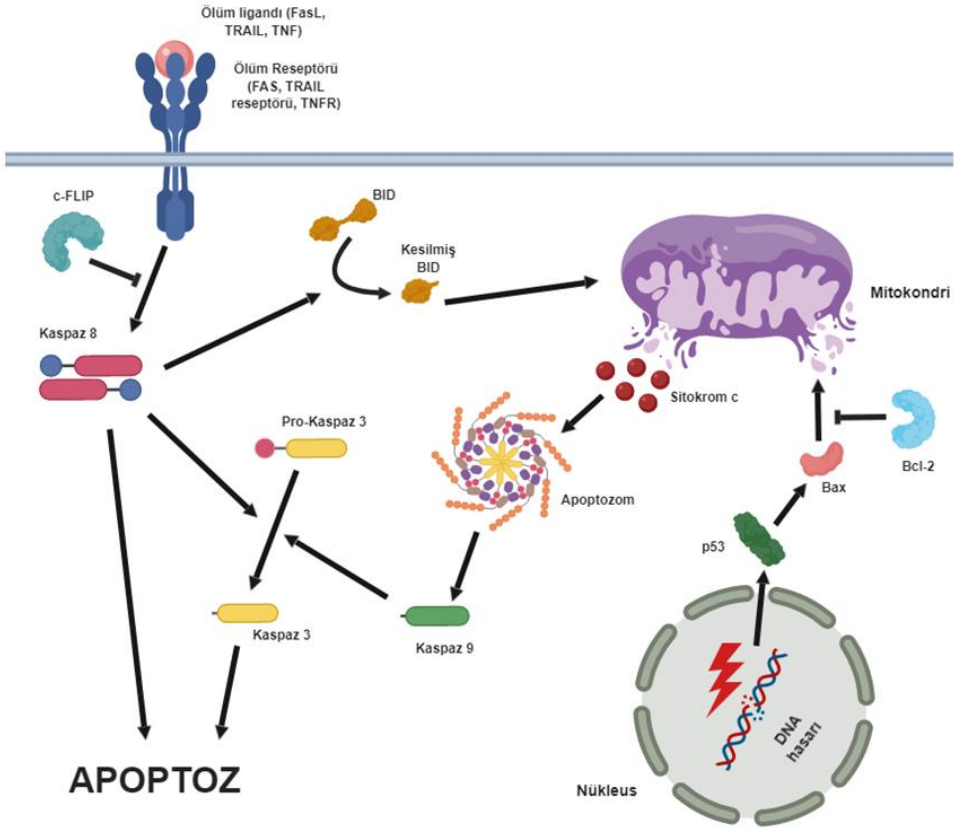
Kazpazlar, kaskat şeklinde görev yapan sistein proteaz ailesi proteinleridir. 1990'ların başında Horvitz ve arkadaşları C. elegans'ta programlanmış hücre ölümü için gerekli olan CED-3'ün memelideki homoloğu olan ICE'yi (IL-1β-dönüştürücü enzim) buldu (J Yuan, Shaham, Ledoux, Ellis, & Horvitz, 1993). ICE olgun IL-1β üretiminden sorumlu olan bir proteazdır. 1990 yılında başlayan insan genom projesi bir kısmı apoptoz ile ilişkili olan, ICE'ye homolog olan birçok gen ortaya çıkardı. Biyokimyasal ve hücresel analizler, bu ICE homologlarının aktif bölgede histidin ve sistein rezidüleri bulunduran bir motif ile proteaz olduklarını göstermiştir. Bu proteazlar hedef proteinleri üzerinde en az beş amino asit rezidülerini tanımakta ve kesinlikle aspartattan sonra gelen peptit bağlarını kesmektedir. Bu proteaz ailesine, aspartik asitten sonra gelen sisteini kestiği için kaspaz ya da sistein aspartil proteaz adı verilmiştir. Kaspazlar, öncü veya zimojen olarak sentezlenir. İki pozisyondaki spesifik kesilmeler, N terminal ucundaki prodomaini uzaklaştırır ve iki büyük ve iki küçük alt birimden ($\alpha_2\beta_2$) oluşan aktif bir enzim üretir. Bazı kaspazların farklı tanıma sekansları

vardır. Bir grup kaspaz (insan kaspazları 2, 3 ve 6-10) apoptozla, diğer grup (insan kaspazları 1, 4 ve 5) enflasmayona neden olan piroptozla ilişkilidir (Nagata, 2018).

Apoptoz iki farklı yolla uyarılabilir.

- Mitokondriden sitokrom c salınmasına bağlı olarak aktifleşen kaspaz kaskadı ile gerçekleşen içsel yolak (mitokondriyel)
- Fas ölüm reseptörünün hücre dışından gelen bir sinyal ile aktive edilmesiyle gerçekleşen dışsal yolak.

Farklı ara moleküllerin sinyal kaskadıyla aktivasyonundan sonra, her iki yolak da sonunda kaspaz aktivasyon basamağına ulaşır ve genellikle farklı proteinlerin kesilmesine yol açar (Ghobrial ve ark., 2005) (Şekil 6).



Şekil 1.4. İçsel ve dışsal yolağın şematik gösterimi.

Mitokondriyal yolak olarak da adlandırılan içsel yolak, gelişimsel olarak kontrol edilen ve genotoksik ajan aracılı apoptozda görülür; Bcl-2 protein ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. Bcl-2 ailesi üç alt aileden oluşur: sadece BH3 domaini içeren pro-apoptotik (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf ve Bad), pro-apoptotik efektör moleküller (Bax ve Bak) ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri (Bcl) -2, Bcl-xL,

Mc1, A1 ve Bcl-B). Sağlıklı hücrelerde Bax ve Bak anti-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri tarafından tutularak apoptozu başlatması engellenir. Bir apoptotik uyarıya cevap olarak sadece BH3 domaini içeren üyeler transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel olarak düzenlenerek arttırılır. Bu proteinler aktifleşerek Bak ve Bax'a etki eder veya anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine antagonist olarak eder. Daha sonra Bax ve Bak homo ve heterodimer oluşturarak mitokondri membranında bir por oluştururlar. Oluşan bu pordan sitokrom c'nin salınmasını sağlanır. Sitokrom c, Apaf-1 ile birlikte, dATP/ATP'ye bağımlı bir şekilde apoptozom denilen heptametrik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, monomerik prokaspaz 9'u dimerleştirir. Bunun sonucunda otokatalitik bölünme gerçekleşir ve kaspaz 9 aktifleşir. Aktif kaspaz 9, kaspaz 3'ü keser ve aktive eder (Kiraz ve ark., 2016; Nagata, 2018; Ulukaya ve ark., 2011). Kaspaz 3, apoptozu gerçekleştirmek için 1300'den fazla hücresel substratı kesmektedir. Örnek olarak,

- Apoptotik DNA fragmentasyonu için ICAD (kaspazla aktive olan DNaz inhibitörü) kesilerek CAD (kaspazla aktive olan DNaz) serbestleşir (Nagata, 2005).
- Dış membran yüzeyine PS çıkması için ATP11A/11C ve XKR8 kesilir (Nagata, 2018).
- Apoptotik membran bleblenmesi için ROCK1 kesilir (Sebbagh ve ark., 2001).

Hücre dışı faktörler ile apoptoz ölüm reseptörlerinin; Fas, TNF reseptörü-1, DR-3, DR-4 ve DR-5'in ligandları ile etkileşimi ile indüklenir. Bu hücre yüzeyi reseptörleri hücre membranı üzerinde bulunur ve bunlar TNFR ailesinin üyeleridir. Ölüm reseptörlerinin ligandları reseptörlerin oligomerizasyona ve aktivasyonuna sebep olur. Reseptörlerin oligomerizasyonu takiben spesifik adaptör proteinler (FADD, TRADD) reseptörlere bağlanır ve ardından kaspaz kaskadının aktivasyonuna sağlanır. Ligandlar reseptörlere bağlandıklarında Fas ve TNFR-1 bir dizi protein-protein etkileşimi gerçekleşir. İlk olarak kendilerine bağlı olan ölüm domaini olan TNFR-1 ile ilişkili ölüm domaini (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) ile etkileşimi başlatırlar. Ölüm domainleri prokaspaz-8'i aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır. Kaspaz-8 oligomerizasyonu takiben otoaktivasyon ile aktive edilir. Aktif kaspaz-8'in apoptoz aktivasyonuna dair bulunan üç mekanizma vardır. Kaspaz-8'in 1) doğrudan kaspaz-3'ü kesmesi ve aktive etmesi, 2) pro-apoptotik protein olan Bid'i keserek ve 3) anti-apoptotik Mcl-1'i keserek Bim'in serbestleşmesini sağlayarak

içsel yolağı aktive etmesi. Kesilmiş Bid aktif hale gelir ve sitozolden mitokondriye transloke olarak sitokrom c salınımını indükler. Mcl-1'den serbestleşen Bim ise Bcl-2 ile etkileşim kurarak Bax ve/veya Bak'ın Bcl-2'den serbest kalarak sitokrom c salınmasını sağlayacak mitokondri üzerinde por açılmasını sağlar. TNFR-1 ve DR-3 FADD ve TRADD'i adaptör protein olarak kullanarak kaspaz-8'i aktive eder. Ayrıca FADD (TRADD değil) hem DR-4 hem de DR-5 için bir adaptör molekül olarak kullanılır ve bu nedenle ölüm reseptörleri için evrensel bir adaptör olarak bile önerilmiştir (Collison ve ark., 2009; Han ve ark., 2006; Ulukaya ve ark., 2011).

1.3. NEKROZ

Apoptoz ve nekroz iki farklı hücre ölümü şeklidir. Nekroz fizyolojik koşulların ötesinde gerçekleşirken, apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik koşullar altında ortaya çıkabilir. Başka bir deyişle, apoptoz hem sağlıklı hem de hastalık durumlarında mevcut olabilir. Apoptozun belirgin morfolojik özellikleri vardır. Örneğin, nekrozdaki aşırı hücre içine sıvı akışı hücrenin şişmesine neden olurken, apoptoz sırasında hücre büzülmesi görülür. Nekrozda kromatinin görünümü normal hücrelerle kıyaslandığında benzerlikler vardır ancak apoptoz sırasında kromatin kondenzasyonu ve nükleer membran çevresinde yoğunlaşma gözlenir. Nekrotik hücrelerde hasarlı hücre zarının bütünlüğünün kaybı nedeniyle hücre içi içerik salınır. Bununla birlikte, apoptotik hücrelerde hücre zarı sağlam kalır ve blebler olarak bilinen düzensiz tomurcuklar oluşur. Nekrozda hücre içi içeriğin salınması enflamatuar yanıt oluşturur. Apoptotik cisimler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiği için enflamatuar yanıt oluşturmaz. Apoptozun bir diğer ayırt edici özelliği agaroz jel elektroforezinde merdiven modeli oluşturan 180 ila 200 baz çifti aralığındaki internükleozomal DNA fragmentasyonudur. Dış plazma zarına fosfatidilserin translokasyonu apoptoz sırasında meydana gelen önemli değişikliklerden biri olup apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.

Nekroz sonrasında tipik olarak enflamatuar reaksiyonlar görülür. Nekrotik hücreler enflamatuar yanıtı sağlamak için selektif olarak HMGB1 ve HDGF gibi faktörler salarlar ve enflazomun çekirdek proteini olan NLRP3 tarafından algılanarak enflamatuar aktivasyona neden olur. Bu olaya takiben pro-enflamatuar sitokin olan IL-1β salgılanır. NLRP3 enflamazom aktivasyonu hasarlı hücrelerden salınan mitokondri tarafından üretilen ATP ile tetiklenir. Mekanik olarak nekroz kaspaz kaskadının aktivasyonu ile ilişkili değildir. Hasara tepki olarak ya da patolojik olaylar sonucunda

hücre ölümüne sebep olduğu ve normal gelişim sırasında rol almadığı düşünülmektedir. Buna rağmen, programlanmış nekrotik ölümün (nekroptoz olarak da bilinir) in vivo'da çok yaygın görüldüğü bilinmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar nekrozun aksine programlanmış nekroptozun apoptoz ile birçok benzerliği görülmüştür (Nikoletopoulou ve ark., 2013).

Tablo 1.1. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Ulukaya ve ark., 2011).

Karakteristikleri	Apoptoz	Nekroz
Neden olan faktörler	➢ Orta seviye oksidatif stres ➢ Büyüme faktörlerinin eksikliği ➢ HIV ➢ Kemoterapi ➢ Radyasyon ➢ Ölüm reseptörlerinin uyarılması ➢ Sitotoksik T hücreleri	➢ Aşırı oksidatif stres ➢ İskemi ➢ Hipertermi, ➢ Hipoksi ➢ Yüksek doz toksik madde ➢ Kemoterapi
Morfolojik özellikleri	➢ Kromatin kondenzasyonu ➢ Blebler içeren intakt hücre membranı ➢ Hücre büzülmesi ➢ Apoptotik body formasyonu	➢ Kromatin topaklanması ➢ Membran hasarı ➢ Organellerin dağılması ➢ Hücre şişmesi ➢ Hücre parçalanması
Biyokimyasal ve immünolojik özellikler	➢ ATP gereklidir ➢ Nükleozomlar arası DNA fragmentasyonu ➢ Agaroz jelde merdiven modeli görülür ➢ M30 antijeni salınır ➢ Enflamasyon görülmez	➢ Bozulmuş iyon dengesi ➢ ATP gerekli değildir ➢ Agaroz jelde DNA sürüntü olarak görülür ➢ LDH ve M65 gibi hücre ölüm belirteçleri salınır ➢ Lizozomal enzimler salınır ➢ Enflamasyon görülür

1.4. NEKROPTOZ

1980'lerin sonunda nekrozun, apoptozu tetikleyen aynı ölüm sinyalleri tarafından tetiklenen alternatif programlanmış bir hücre ölüm modu olarak da işlev görebileceği ortaya çıktı. Yapılan çalışmada F17 hücrelerinde TNFα tedavisi apoptozu indüklerken farklı bir hücre tipi olan L-M hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Laster ve ark., 1988). Nekroptoz terimi, nekrozun "kazara" ölüm yerine, düzenlenmiş ve programlanmış bir ölüm şeklini temsil ettiği ve apoptozdan farklı olan durumlarını tanımlamak için kullanıldı. Apoptozun dışsal yolağında görev alan TNFR1, FAS, TNFR2, TRAILR1 ve TRAILR2 ölüm reseptörlerinin farklı hücre tiplerinde nekroptozu indüklediği açıkça gösterilmiştir (Chan ve ark., 2003; Holler ve ark., 2000; Jouan-Lanhouet ve ark., 2012; Vercammen ve ark., 1998). Bu durum özellikle apoptozun bloklandığı veya düşük ATP seviyelerinde gerçekleşir. Ölüm reseptörlerine ek olarak, nekroptoz patojen ile ilişkili molekülleri algılamak için doğal bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen patojen tanıma reseptörü (PRR) ailesinin üyeleri tarafından da başlatılabilir. Yine de nekroptoz mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

TNF'in TNFR1'e bağlanması, reseptör etkileşimli protein kinaz 1 (RIPK1) ve NF-κB esansiyel modülatörünün (NEMO) poliübikitinlenmesini içeren NF-κB yolağını aktive eder. RIPK1'in lineer ubikitin zincirlerinin deubikuitinazlar tarafından deubikitine olması sonra RIPK1 "prosurvival" fonksiyonunu yitirir ve hücre ölümünü indükler. TNFR1 ligand bağlanması sonucu apoptozun dışsal yolağında olduğu şekilde aktifleşir ve kaspaz 8 aktive olur. Kaspaz 8-FLIP heterodimeri, NF-κB aktivasyonuyla indüklenen FLIP ekspresyonu olan hücrelerde fazladır. Kaspaz 8 veya FLIP azaldığında veya kaspaz 8'in aktivasyonu veya fonksiyonu engellendiğinde RIPK1 nekrozomu oluşturmak için RIPK3 ile bir kompleks oluşturur. RIPK3'ün bir başka hedef molekülü olan MLKL, nekroptozda rol alan bir psödokinazdır.

Apoptozda yüksek derecede immünojenik hücre içi proteinlerin birçoğu ölü hücrenin içinde kalırken nekroptozda doğal ve adaptif immün yanıtlar güçlü bir şekilde tetiklenir. RIPK3 hem RIPK1 hem de RIPK3'te bulunan bir RHIM motifi ile diğer proteinlerle etkileşime girebilir. Bugüne kadar, insan genomunda bilinen sadece dört RHIM içeren protein (RIPK1, RIPK3, DAI ve TRIF). TRIF, toll benzeri reseptör 3 ve 4'ün bağlanmasından sonra nekroptozu tetikleme yeteneğine sahiptir; DAI viral sinyaller sonucu nekroptotik yolağı aktive eder. Kaspaz inhibitörünü eksprese eden

virüsünün enfeksiyonunun RIPK3 eksikliği olan fareler için öldürücü olduğu fakat doğal tip farelerin hayatta kaldığı bulunmuştur. Ayrıca hem apoptoz hem de nekroptoz, tip I ve II interferonlar tarafından indüklenebilir; viral olarak enfekte olmuş hücrelerin ölümünü sağlarlar. Çeşitli virüsler ve hücre içi bakteriler, kaspaz 8'in aktivasyonunu engelleyerek hücreyi nekroptoza duyarlı hâle getiren proteinleri eksprese eder. Bu nedenle nekroptozun bu tür hücre içi istilacılara karşı bir savunma mekanizması sağladığını varsayabiliriz. Bu hipotez, nekroptozun viral inhibitörlerinin tanımlanması ile de desteklenmektedir. Benzer şekilde, FLIP kaybı hem apoptoz hem de nekroptoz ile hücre ölümüne yol açar. FLIP hızlı protein dönüşümüne maruz kaldığından ve NF-κB aktivasyonuna cevap olarak eksprese edildiğinden, protein sentezini bloke eden veya NF-κB ile etkileşime giren herhangi bir şey hücrelerin ölmesine hassaslaşabilir (Linkermann ve Green, 2014).

1.5. EPİTELYAL-MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM

Epitel hücre profiline sahip prostat kanseri hücreleri polaritelerini ve morfolojilerini kaybederek primer tümör yapısından ayrılabilmektedirler. Kanser hücreleri ekstrasellüler matriksi degrede ederek intravazasyon yapmaktadırlar. Damar yolu ile vücuda dağılan hücreler ekstravazasyon ile sekonder tümör yapısını oluşturabilmektedirler. Bu süreçte yüksek invazyon ve metastaz aktivitesine sahip olan kanser hücrelerinde epitel hücre belirteçlerinin ifade düzeyleri azalıp epitel hücre profilini kaybederken mezenkimal hücre belirteçleri anlatımı artarak mezenkimal hücre profili kazanmaktadırlar. Bu dönüşüm epitel-mezenkimal dönüşüm (EMT) olarak adlandırılır. Epitel hücre markerları E-kaderin, klaudin, okludin, tip IV kollajen, laminin 1 ve desmoplakin; mezenkimal hücre markerları N-kaderin, integrin, vimentin, fibronektin, tip I kollajen ve laminin 5'tir. EMT in vitroda epitel hücrelerin mezenkimal benzeri hücrelere fenotipik olarak dönüşümü ile ilişkilidir. Kanserde EMT'nin mekanizmasını araştıran çalışmalar Twist, Snail, Slug ve Zeb1/2 gibi EMT'yi indükleyen transkripsiyon faktörleri üzerinde durmuşlardır (Kalluri ve Weinberg, 2009; Nieto ve ark., 2016; Yeung ve Yang, 2017).

1.6. NAFTAKİNON TÜREVLİ İLAÇLAR

Kinonlar kimya, biyoloji ve tıp alanlarında sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca kinonlar canlı hücrelerde yaygın olarak görülür. Biyolojik işlevi hücre metabolizmasında elektron taşıyıcı olarak bulunan kinonlar sınıfının bazı üyeleri

mantarlara ve bakterilere karşı kullanılabilmektedir (Deniz ve ark., 2015; El-Najjar ve ark., 2011).

Kinon türevleri, özellikle 1,4-naftakinonlar, solid kanser tedavisinde klinikte kullanılmaktadırlar. Bu bileşiklerin sitotoksik etkileri esas olarak DNA topoizomeraz II'nin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Kennedy ve ark., 2011; Kumar ve ark., 2017). Ek olarak, kinon analogları sitokrom P450 redüktaz enzimi tarafından yarı kinon radikallerine dönüştürülür; bu yarı kinonlar normal oksijen seviyesinde okside olarak kinonlara geri dönüştürülür. Bu olay sırasında O_2 indirgenir ve süperoksit radikal iyonu (O_2^-) oluşur. Hem süperoksit hem de yarı kinon radikal anyonları, DNA iplikçik kopmalarına neden olduğu bilinen hidroksil radikalini üretebilir (Tewey ve ark., 1984; Wellington, 2015). Naftakinonların bu etkileri göz önüne alındığında, bu bileşiklerin kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterebileceği öne sürülmüştür. Tahminlere uygun olarak, birkaç çalışma naftakinon analoglarının anti-kanser etkisine sahip olduğunu göstermiştir (Ghosh ve ark., 2018; Pingaew ve ark., 2015; Silva ve ark., 2009). Ayrıca kinon bileşiklerinin anti-viral, anti-bakteriyel ve anti-enflamatuar özellikler sergilediğini gösteren birçok çalışma vardır (Brandelli ve ark., 2004; Novais ve ark., 2018; Prachayasittikul ve ark., 2017; Wellington ve ark., 2019). Kanser tedavisinde kullanılan saintopin, daunorubisin, antrasiklinler ve mitomisin gibi kullanılan birçok ilacın kinon yapısına sahip olduğu bilinmektedir (Brandy ve ark., 2013; Verma, 2006).

2. MATERYAL METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kimyasal Maddeler

%0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco

10X Yürütme tamponu, BioRad

2X Laemmli Sample Buffer, Chemcruz

Amonyum persülfat, BioRad

Anti-E-Cadherin (24E10) antikoru, 3195, CST

Anti-GAPDH (14C10) antikoru, 2118, CST

Anti-N-Cadherin (D4R1H) XP antikoru, 13116, CST

Anti-Vimentin (D21H3) XP antikoru, 5741, CST

Asetik asit, Isolab

Bovine Serum Albumin, Sigma

Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma

ECL Prime W.B. Detection, Amersham

Fetal sığır serumu (FBS), Wisent Bioproducts

Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco

Glycine, Bioshop

Halt Protease Inhibitor Cocktail 100 X, Sigma

Hidroklorik asit, Tekkim

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo

Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore

Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore

Muse® H2A.X Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore

Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore

Muse® Oxidative Stress Kit, Merck Millipore

Muse® PI3K Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore

Naftakinon bileşiği, İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü

PageRuler Plus Prestained protein ladder, Thermo

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco

Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Sigma

PureLink™ RNA Mini Kit, Thermo

RIPA solüsyonu, Thermo

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Wisent Bioproducts

Sodyum klorür, Merck

Sulforhodamine B sodium salt, Chemcruz

TEMED, BioRad

TGX FastCast jel solüsyonları, BioRad

Trikoloroasetik asit, Sigma

Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries

Trizma Base, Sigma

Tween-20, Sigma

2.1.2. Sarf Malzemeler

0,5 ml, 1,5 ml ve 2 ml‘lik santrifüj tüpleri, Isolab

1000µl’lik pipet uçları, Isolab

10µl'lik pipet uçları, Isolab

2 ml'lik cam pastör pipetler, Isolab

25cm^2, 75cm^2 ve 175cm^2'lik flask, Sunub

5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject

6 kuyulu plate, Sunub

96 kuyulu plate, Sunub

Hemasitometri lamı, Neubauer improved, Isolab

Kriyovial, ATS

Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab

Steril santrifüj tüpleri (15ml), Nest

Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest

Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millex, Millipore

2.1.3. Cihazlar

10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Brand

200 µl çok kanallı pipet, Brand

-80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE.

Buzdolabı, Panasonic, MPR-721-PE

CO_2 inkübatörü, Panasonic, MCO-230AIC-PE

Dikey elektroforez, Bio-Rad

Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N

Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2

Jel görüntüleme sistemi, General Electric, ImageQuant LAS 500

Kuru sterilizatör, Panasonic, MOV-212-PE

Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard

Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck

Orbital shaker, Lab companion

Otoklav, Nüve, OT90L

Pipetör, Isolab

Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar

Santrifüj, Hitachi, CF16RN

Soğutmalı santrifüj, Hitachi, CT15RE

StepOne Plus qRT-PCR cihazı , Applied Biosystem

Thermal cycler, Bio-Rad

Transfer cihazı, BioRad, 10016505C

Vorteks, Scilogex, MX-F

2.2. METOT

2.2.1. İstanbul Üniversitesi Tarafından Sentezlenen Naftakinon Türevli Bileşiğin Hazırlanması

İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından sentezlenen yeni naftakinon türevli bileşiği (K13) 50 mM stok konsantrasyonda hazırlandı. Bunun için 6,9 mg K13 bileşiği 500 µl DMSO içerisinde çözdürülmüştür.

2.2.2. Hücre Kültürü

Laboratuvarımızda bulunan LNCaP (ATCC CRL 1740), PC-3 (ATCC CRL 1435) ve DU 145 (ATCC HTB-81) prostat kanseri hücre hatları kriyovial tüpler içerisinde -80°C dolapta saklandı.

LNCaP lenf noduna metastaz yapmış ve buradan alınan, iyi farklılaşmış prostat kanseri hücre hattıdır. PSA salgılar ve AR açısından androjene duyarlıdır. PTEN ve p53 ifadesi doğal tip olarak tanımlanmıştır. PC-3 hücre hattı metastatik bölgesi kemikten alınmıştır ve androjene duyarsızdır. PC-3 hücreleri p53, PTEN ve AR ifadesinden yoksundur. DU 145 hücre hattı androjene duyarsızdır ve p53 DNA bağlanma bölgesinden mutanttır. Beyin metastazı yapmış ve bu bölgeden alınmıştır (Cunningham ve You, 2015; Wu ve ark., 2013).

2.2.3. Hücrelerin Stoklanması

Flasklardaki hücreler yoğun olduklarında besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkama yapıldı. Adherent hücrelerin bulunduk yüzeyden kalkmaları için %0.05 Tripsin-EDTA solüsyonu ile 5 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsin inhibisyonu için tripsinin on katı besiyeri ilave edildi. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Sallanan kovalı rötarlı santrifüjde 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım aspire edildi ve hücreler 1 ml dondurucu medium (%5-10 DMSO + %10 FBS + %80 DMEM) içinde 1×10^6 hücre olacak şekilde her bir kriyovial içine konuldu. Daha sonra hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

PC-3, LNCaP ve DU 145 hücrelerinin besiyeri şu şekilde hazırlandı: RPMI 1640 (Gibco) besiyerine %10 Fetal Bovine Serum (Gibco) ve %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco) ilave edildi.

2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Tripsinle kaldırılan hücreler süspanse hale getirildikten sonra 10 µl alınarak 96 kuyulu plate içerisinde 10 µl %0,5 tripan mavisi (Sigma) ile karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl alınarak mikroskopta hemasitometri üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerindeki hücre sayısı hesaplandı.

2.2.6. Sulforhodamine B (SRB) Testi ile Canlılık Tayini

SRB testi, 1990'da Skehan ve ark. tarafından hücre tabanlı çeşitli tarama çalışmalarında sitotoksisite deneylerini ucuz bir şekilde yapmak için kullanılmıştır (Skehan ve ark., 1990; Vichai ve Kirtikara, 2006). Bu yöntem, hafif asidik koşullar altında proteinlere stokiyometrik olarak bağlanan ve daha sonra bazik koşullarda çözünen SRB boyasının özelliğine dayanır. Bu nedenle, bağlı boya miktarı, hücre çoğalmasını ölçmek için varsayımsal olarak hücre canlılığı hakkında bilgi verebilir. Protokol dört ana aşamaya ayrılabilir:

- Tedavinin hazırlanması
- Tercih edilen tedaviyle hücrelerin inkübasyonu
- Hücre fiksasyonu ve SRB boyaması
- Absorbans ölçümü

SRB boyası, %0,4 (kütle/hacim) olacak şekilde %1 asetik asit çözeltisi ile hazırlandı. Stok boya solüsyonu 4°C'de saklandı. Trikoloroasetik asit (TCA) %50 (kütle/hacim) olacak şekilde distile su ile hazırlandı ve 4°C'de saklandı.

SRB testi için K13 bileşiğinin farklı konsantrasyonları (40-0,625 µM) hazırlanarak 96 kuyulu plate içerisine uygulandı. PC-3, LNCaP ve DU 145 hücreleri 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya hücreler ekildi. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör olarak kullanılacak kuyulara sadece 200 µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler 48 saat 37°C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Fiksasyon işlemi için 48 saatlik tedavi süresi sonunda her bir kuyuya 50 µl TCA eklenerek plate 4°C'de 1 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda TCA kuyulardan uzaklaştırıldı ve kuyular 5 kez distile su ile yıkandı. Yıkama sonunda her kuyuya 50 µl SRB boyası eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası boya kuyulardan uzaklaştırıldı ve kuyular kuyular %1 asetik asit çözeltisi ile 5 kez yıkandı. Plate tamamen kuruduktan sonra boyanın çözünmesi için her kuyuya 150 µl (10 mM, pH:10) Tris Bazı eklendi ve orbital çalkalayıcıda 10 dakika 100 rpm'de bırakıldı. Sürenin sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar) 564nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi.

Kontrol grubu hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edildi ve kimyasal uygulanan hücrelerin canlılığı aşağıdaki formül ile hesaplandı. Her bir kimyasal konsantrasyonu birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

% Canlılık = [100 × (Kimyasal uygulanan grubun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması) / (Kontrol grubunun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması)]

2.2.7. Akım Sitometrisi ile Anneksin V Analizi

Akım sitometresi ile analiz gerçekleştirebilmek için hücrelerin süspanse hâlde olması gerekmektedir. Cihaz ölçüm alırken hücreler tek tek "flow cell" adı verilen kapiler borudan geçer ve bu geçiş sırasında lazer ışınına maruz kalırlar. Hücreler lazer ışığının bir kısmını saptırır ve bu saptırma bize hücre boyutu hakkında bilgi verir. Ayrıca eğer hücreler floresan işaretli bir boya ile muamele edilmişse ilgili lazer ışığı tarafından uyarıldıkları zaman floresan ışıma yaparlar. Bu işaretleme hücre yüzeyindeki veya içindeki proteinlere spesifik antikor bağlanması ya da hücredeki

moleküllere (ROS gibi) veya organellere spesifik boyalar kullanılarak gerçekleştirilir. Söz konusu spesifik antikorlara FITC, PE veya 7-AAD (7-Aminoaktinomisin D) gibi floresan boyalar eklenir. İlgili boya ya da antikor ile işaretlenen hücre lazer ışınıyla uyarıldığında floresan ışıması cihaz tarafından belirlenir (Karaboz ve ark., 2008).

Anneksin V, fosfatidilserinlere (PS) bağlanma kapasitesi yüksek bir proteindir ve hücre membranında geçememektedir. Apoptozun erken evresinde kaspaz aktivasyonuna bağlı olarak hücre membranının iç kısmında lokalize olan PS'ler hücre kaspaz tarafından aktifleşen Xkr8 yardımıyla membranının dış kısmına "flip-flop" hareketi ile transloke olurlar (Mariño ve Kroemer, 2013; Rysavy ve ark., 2014; Segawa ve Nagata, 2015). Anneksin V'in FITC gibi floresan bir maddeyle işaretlenmesi sonucunda apoptotik hücreler belirlenebilir bir hâle gelmektedir. Erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrozu ayırt etmek için PI ya da 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) gibi intakt membrandan geçemeyen DNA boyaları da kullanılmaktadır. Böylece erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ayrımı yapılabilmektedir.

- Sağlıklı hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)
- Erken apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)
- Geç apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)
- Nekrotik hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

Muse Annexin V & Dead Cell Kiti kullanılmak için, PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri sayılarak 6 kuyulu platelere 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim ile eş zamanlı olarak K13 bileşiği 10, 5 ve 2,5 µM dozlarında ilgili kuyulara uygulandı. Kontrol grubu hücreler sadece besiyeri ile muamele edildi. Hücreler 12 ve 24 saat boyunca inkübatörde tutuldu ve sürenin sonunda K13 uygulanan kuyuların üst besiyeri 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Kontrol grubunun kuyularındaki üst besiyeri ise uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili santrifüj tüplerine toplandıktan sonra 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası santrifüj tüplerinin süpernatantları uzaklaştırıldı. Hücreler 100 µl %1 FBS içeren PBS içerisinde süspanse hâle getirildi ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Örneklere 100 µl Muse Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Vortekslenen örnekler karanlıkta 20 dk oda ısısında inkübe edildi. Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.8. Akım Sitometrisi ile Kaspaz 3/7 Aktivasyon Analizi

Apoptoz sürecinde etkili olan efektör kaspazlardan olan kaspaz 3 ve 7 aktivasyonu kaspaz bağımlı apoptoz ve membran bütünlüğü hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Kaspaz 3/7 testi için PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri Anneksin V testinde olduğu şekilde ekildi, kimyasal uygulaması yapıldı ve sürenin sonunda 50 µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hâle getirildi. Örnek içeren santrifüj tüplerine 5 µl "Caspase 3/7 working reagent" eklendi ve kapakları açık olarak inkübatöre 30 dk süresince bırakıldı. Sürenin sonunda örneklere 150 µl 7-AAD boyası eklendi ve örnekler 5 dk, oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi. Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.9. Akım Sitometrisi ile Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi

Mitokondri membranındaki değişimler hücrenin sağlığı açısından bilgi veren önemli parametrelerden biridir. Pro-apoptotik proteinlerin artması ve anti-apoptotik proteinlere baskın gelmesi sonucu mitokondri membran bütünlüğü bozulabilir ve içsel yolak başlayabilir (Finkel, 2001).

Mitokondri membran testi için PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri Anneksin V testinde olduğu şekilde ekildi, kimyasal uygulaması yapıldı ve sürenin sonunda 100 µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hâle getirildi. Örneklere 95 µl (boya içeren) "working reagent" eklendi hücreler 20 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda tüplere 5 µl 7-AAD boyası eklendikten sonra vorteks yapıldı ve örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.10. Akım Sitometrisi ile DNA Hasarı Analizi

DNA paketlenmesinden görevli olan proteinler histonlardır ve bu DNA / histon kompleksine nükleozom denir. Nükleozomlar 147 baz çiftlik DNA'dan ve birer çift H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden oluşur. H2A varyantları H2A1, H2A2, H2AX, H2AZ'dir (Kinner ve ark., 2008; Rakiman ve ark., 2008). DNA hasar cevabı fizyolojik işlemler sırasında karşılaşılan çeşitli stres sinyallerine cevap olarak veya iyonize radyasyon, DNA'ya zarar veren terapötik ajanlar gibi dışsal işaretlere cevap olarak başlatılabilir. DNA hasarı tepkisi sırasında meydana gelen morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikleri incelemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Hücreler iyonize radyasyona veya DNA'ya zarar veren kemoterapötik ajanlara maruz kaldığında DNA'da çift sarmallı kırıklar (DSB) meydana gelir. Bu

kırılmalar H2AX'in hızlı bir şekilde fosforilasyonuna neden olur. γH2AX'in Ser 139'dan fosforilasyonu çok, hızlı ve DSB ile iyi korele olduğu için oluşan DNA hasarını incelemek için kullanılabilecek en hassas belirteçtir (Sharma ve ark., 2012).

γH2AX DNA hasarı testi için PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri Anneksin V testinde olduğu şekilde ekildi, kimyasal uygulaması yapıldı ve sürenin sonunda 100 µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hâle getirildi. Kit içerisindeki fiksatif kullanılarak (100 µl) örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Ardından örnekler 300 g 5 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar atılarak hücreler kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu (100 µl) ile 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler 300 g 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atılarak kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan "working reagent" (45 µl Assay buffer + 2,5 µl γH2AX antikoru + 2,5 µl Phospho-γH2AX antikoru) ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda hücreler 300 g 5 dk santrifüj edildi ve assay buffer ile sulandırılarak Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.11. Akım Sitometrisi ile Bcl-2 Analizi

Bcl-2 anti-apoptotik proteini içsel yolağın önemli regülatörlerinden biridir. Bcl-2 testi için PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri DNA hasarı testinde olduğu şekilde ekildi, kimyasal uygulaması yapıldı, sürenin sonunda 100 µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hâle getirildi, fiksasyon ve permeabilizasyon aşamalarını gerçekleştirildi. Son aşamada "working reagent" olarak Bcl-2 antikoru ve Phospho-Bcl-2 antikoru içeren assay buffer ile hazırlandı. Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.12. Akım Sitometrisi ile ROS Analizi

ROS fizyolojik durumda az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2 \cdot^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-)'dir. Metabolik yolaklarda enzimatik reaksiyonlar sırasında ara ürün olarak ROS devamlı şekilde oluşabilir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma ve kimyasal maddeler gibi çok çeşitli sebeplerle artabilir. Son derece reaktif olan ROS, hücrenin lipid, protein, karbonhidrat ve DNA gibi tüm önemli bileşiklerine etki edebilirler ve DNA hasarına yol açabilirler (Chio ve Tuveson, 2017; Prasad ve ark., 2017).

ROS testi için PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri Anneksin V testinde olduğu şekilde ekildi, kimyasal uygulaması yapıldı ve sürenin sonunda kit içindeki oksidatif stres solüsyonu (200 µl) ile süspanse hâle getirildi. Hücre süspansiyonu 30 dakika

inkübatörde kapaklar açık şekilde inkübe edildi ve sürenin sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

2.3.13. Western Blot Analizi

PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri 6 kuyulu platelere kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ekim ile eş zamanlı olarak K13 bileşiği 10, 5 ve 2.5 µM dozlarında ilgili kuyulara uygulandı. Kontrol grubu hücreler sadece besiyeri ile muamele edildi. Hücreler 12 ve 24 saat boyunca inkübatörde tutuldu ve sürenin sonunda K13 uygulanan kuyuların üst besiyeri 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Kontrol grubunun kuyularındaki üst besiyeri ise uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili santrifüj tüplerine toplandıktan sonra 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırıldı. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu eklenip, örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 20 dakika 13200 rpm'de 4 °C' de santrifüj edildi. Üst faz yeni santrifüj tüpüne alınarak miktar tayini yapıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -80ºC'de saklandı.

Miktar tayini için bikinkoninik asit (BCA) metodu kullanıldı. BCA metodunun temeli iki adımlı tepkimeye dayanır. Birinci adımda proteinlerin peptit bağlarının sıcaklık ile Cu_2^+ iyonlarını Cu^+'ya indirgemesidir. Cu_2^+ solüsyondaki protein sayısı ile paralel olarak indirgenir. İkinci adımda ise bikinkoninik asidin 2 molekülü Cu^+ iyonu birleşerek 562 nm dalga boyunda emisyonu güçlü, mor renkli kompleks oluştururlar (Wiechelman ve ark., 1988). BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için öncelikle sığır serum albümin (BSA) proteini ilgili konsantrasyonlarda (200-1000 µg/ml) distile su ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. 96 kuyulu plate'in her kuyuya 0, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml olacak şekilde 25 µl BSA ve 5 µl örnek konuldu. Örnekler distile su ile 25 µl'ye tamamlandı ve 5 kat seyreltme yapılmış oldu. Söz konusu seyreltme katsayısı hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200 µl BCA solüsyonu eklendi ve plate 30 dakika 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plate, spektrofotometride 570 nm'de okundu.

Western blot yöntemi için laemmli tamponu (2X) ve 30 µg protein örnekleri 1:1 oranında karıştırılarak 95°C' de 5 dakika bekletilerek proteinler denatüre hâle getirildi. Bio-Rad TGX FastCast ile SDS PAGE hazırlandı. İlk kuyuya protein ladder olmak üzere proteinler bu jel sistemine yüklendi. Örnekler 120 voltta yürütme

tamponuyla beraber yürütüldü. Yürütme sonunda transfer packleri, jel ve nitroselüloz membran transfer tamponunda bir süre bekletildi. Trans-blot turbo transfer sisteminin kasedine sırasıyla bir set transfer packi, membran, jel ve tekrar bir set transfer packi konuldu. 2,5 amper ve 25 voltta 7 dakika süreyle proteinlerin membrana geçişi gerçekleşti. Transfer işlemi sonrası membran 1 saat oda sıcaklığında 1X TBS-T (%0,1 Tween 20 içeren 1X TBS) ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu içerisinde bekletilerek bloklama yapıldı. Bloklama sonunda membranlar primer antikor ile gece boyu 4°C 'de bekletildi. Primer antikor işaretlemesinde sonra membran ikincil antikora alınmadan önce 5 dakika 3 kez 1X TBS-T ile yıkandı. Membranlar primer antikorla uyumlu ikincil antikor ile gece boyunca 4ºC'de inkübe edildi. Membrandaki antikor ile muamele edilmiş proteinlerin bant görüntülemesi ImageQuant LAS 500 ile gerçekleştirildi.

2.3.14. qRT-PCR Analizi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA'daki bölgelerin in vitroda çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. PCR'ın 3 temel basamağı vardır:

1. Amplifiye edilecek DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılması (Denatürasyon, 95°C).

2. Primerlerin DNA'da ilgili bölgelere bağlanması ve uygun sıcaklıkta uzaması. Primerlerin tek zincirli DNA üzerinde komplementer oldukları bölgeyle hidrojen bağları ile eşleştiği sıcaklık derecesi Tm (erime noktası) olarak adlandırılmaktadır ve bu sıcaklık derecesi primer dizisinin baz içeriğine göre değişmektedir. Primerdeki G ve C sayısı artıkça Tm derecesi artmaktadır. Optimal bağlanma sıcaklığı Tm=4(G+C)+2(A+T) şeklinde hesaplanmaktadır ve genellikle Tm değerinin 5°C altı (güven payı) alınarak belirlenmektedir.

3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklıkta (72°C), primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri kullanarak 5'→3' yönünde primerlerin uzaması, tamamlayıcı zincir sentezi (Yılmaz & Devran, 2003).

PCR'in üç basamaktan oluşan birinci amplifikasyon aşaması, sıcaklığın tekrar 95˚C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanmasıyla sonlandırılmaktadır. Böylece tek bir hedef DNA segmenti, 2^n formülüne göre çoğaltılmış olmaktadır.

Real-time PCR, hedef genin amplifikasyonu ile eş zamanlı artan floresan boya ve probların verdiği sinyalin ölçülmesine dayalı bir PCR yöntemidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanabilen ve spesifik olmayan bu boyalar (Syber green 1) DNA'daki artış ile eş zamanlı olarak ışıma verirler (Kubista ve ark., 2006). Ancak floresan ışıma her zaman amplifikasyonla ilişkili olmayabilir. Çünkü primerlerin birbiri ile bağlanmaları (primer dimer) sonucunda da oluşan çift zincirli yapıya söz konusu boyalar bağlanabilmektedirler. Bu durumun üstesinden gelebilmek için erime eğrisi analizleri (melting curve) yapılmaktadır. Erime eğrisi analizinde, sıcaklık kademeli olarak arttırılır ve çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında [melting temperature (Tm)] boya serbest kalmakta ve okunan floresan miktarı da düşmektedir. Denatürasyon gerçekleştiğinde ise floresan sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak hedef DNA'nın Tm derecesi saptanabilmektedir. Çünkü her ürünün kendine özgü uzunluğu mevcuttur ve Tm sıcaklığı her ürün için özeldir. İncelenen örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir (Günel, 2007).

Total RNA izolasyonu için Total RNA Purification Kit kullanılarak yapıldı. PC-3, DU 145 ve LNCaP hücreleri 6 kuyulu platelere kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ekim ile eş zamanlı olarak K13 bileşiği 10 µM dozlarında ilgili kuyulara uygulandı. Kontrol grubu hücreler sadece besiyeri ile muamele edildi. Hücreler 12 saat boyunca inkübatörde tutuldu ve sürenin sonunda K13 uygulanan kuyuların üst besiyeri 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Kontrol grubunun kuyularındaki üst besiyeri ise uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili santrifüj tüplerine toplandıktan sonra 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml PBS ile karıştırılıp 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırıldı. Ardından, 0,6 ml lizis tamponu eklendi ve vortekslendi. Lizis tamponu ile eşit hacimde %70 etanol eklendi görünürde herhangi bir ürün kalmayana kadar tüpler vortekslendi. Lizattan alınan 700 µl kitten çıkan filtreli kolona aktarıldı ve 12000 g'de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem tüm ürün bitene kadar tekrarlandı. Kolonlara 700 µl Yıkama Solüsyonu I eklendi ve 12000 g'de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı. Kolonlara 500 µl Yıkama Solüsyonu II

eklendi ve 12000 g'de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki tüpte biriken sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem bir daha kez tekrarlandı. Kolonlar boş olarak 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüplerine alındılar ve kolonlara 40 µl RNaz içermeyen su eklendi. Tüpler 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA'lar spektrofotometride ölçülerek miktar ve saflıkları belirlendi. İleri analizler için -20°C'de saklandı.

RNA örnekleri, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo) kullanılarak cDNA'ya çevrildi.

- 10X RT Buffer 14 µl
- 25X dNTP Mix (100mM) 5,6 µl
- 10X RT Random Primers 14 µl
- Reverse Transcriptase 7 µl
- Nükleaz içermeyen su 29,4 µl

İlgili PCR tüplerine yukarıdaki karışım 20 µl olacak şekilde dağıtıldı ve örnekler RNA konsantrasyonları eşit olacak şekilde (2000 ng) 20 µl hacimde eklendi. Tüpler Bio-Rad thermal cycler cihazına yerleştirildi. Çevrim için cihaz 25°C'de 10 dakika; 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 5 dakika olacak şekilde ayarlandı. Süre sonunda, örnekler Real-time PCR analizi için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

cDNA örneklerinden, EMT karakterine yönelik (SNAIL1, SNAIL2, ZEB1 ve ZEB2) ve hücre ölümüne yönelik (MCL1, FAS ve TNFR10B) ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR kullanılarak araştırıldı. PCR karışımı her gen için total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde, ilgili genlerin primerleri ile Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) kullanılarak aşağıdaki şekilde hazırlandı. Bu miktarlar 1 örnek için gerekli olan miktarlardır. Çalışmada 8 örnek çevrilirken 8,5 katı alınarak hazırlanmıştır.

- Power SYBR Green PCR Master Mix (2X) 10 µl
- Forward primer 0,2 µl
- Reverse primer 0,2 µl
- Nükleaz içermeyen su 8,1 µl

Hazırlanan bu karışımdan 18,5 µl alınarak PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtıldı ve üzerlerine ilgili cDNA'lardan 1,5 µl eklendi. Plate, StepOne Plus cihazına yerleştirildi ve çevrim koşulu üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda ayarlanarak PCR tamamlandı. Önce 95°C'de 10 dakika aşaması ayarlandı. Ardından 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika 40 döngü olacak şekilde ayarlandı. Melting Curve analizi için 95°C'de 15 saniye, 50°C'de 1 dakika ve 95°C'de 15 saniye aşamaları ayarlandı. Elde edilen sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak StepOne Plus v2.3 (Applied Biosystems) yazılımı ile değerlendirildi.

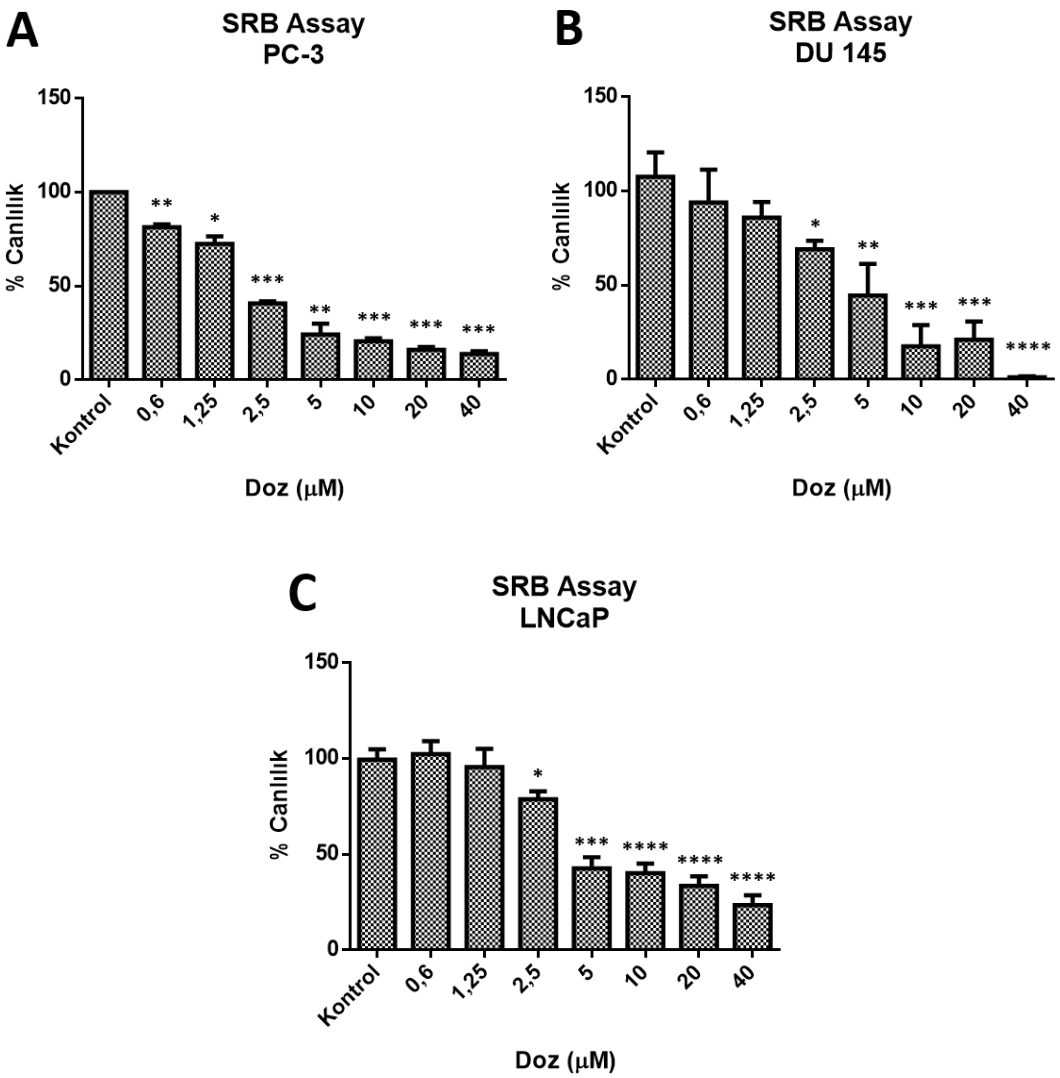
2.3.15. İstatistiksel Analiz

SRB testi ile yapılan canlılık deneyleri "GraphPad Prism" programı kullanılarak grafik oluşturulmuştur. Deney verileri K13 uygulanmış prostat kanseri hücre hatları üzerinde yapılan SRB testi verilerinin en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Veriler "Graph Pad Prism 6" istatistik programı ile analiz edilmiştir (Motulsky, 1999). Grupların karşılaştırılmasında 2 way ANOVA testi kullanılmış ve Bonferroni doğrulama yöntemiyle anlamlı değişimler için p değeri < 0.05 olarak belirlenmiştir.

3.BULGULAR

3.1. SRB CANLILIK TESTİ BULGULARI

PC-3, DU 145 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerine 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0.6-40 μM) K13 bileşiği uygulandı ve hücre canlılığı SRB testi ile belirlendi. SRB analizi sonucunda K13 bileşiği üç hücre hattında da doza bağlı olarak ters orantılı bir şekilde hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya sebep olduğu tespit edildi (Şekil 3.1.). Bu deneyde söz konusu prostat kanseri hücre hatlarında %50 canlılık gösteren dozun belirlenmesi amaçlandı. Üç hücre hattında da %50 canlılığa sebep olan en yakın dozlar olarak 2.5, 5 ve 10 μM dozları seçildi ve ileri analizler bu dozlar uygulanarak devam etti.

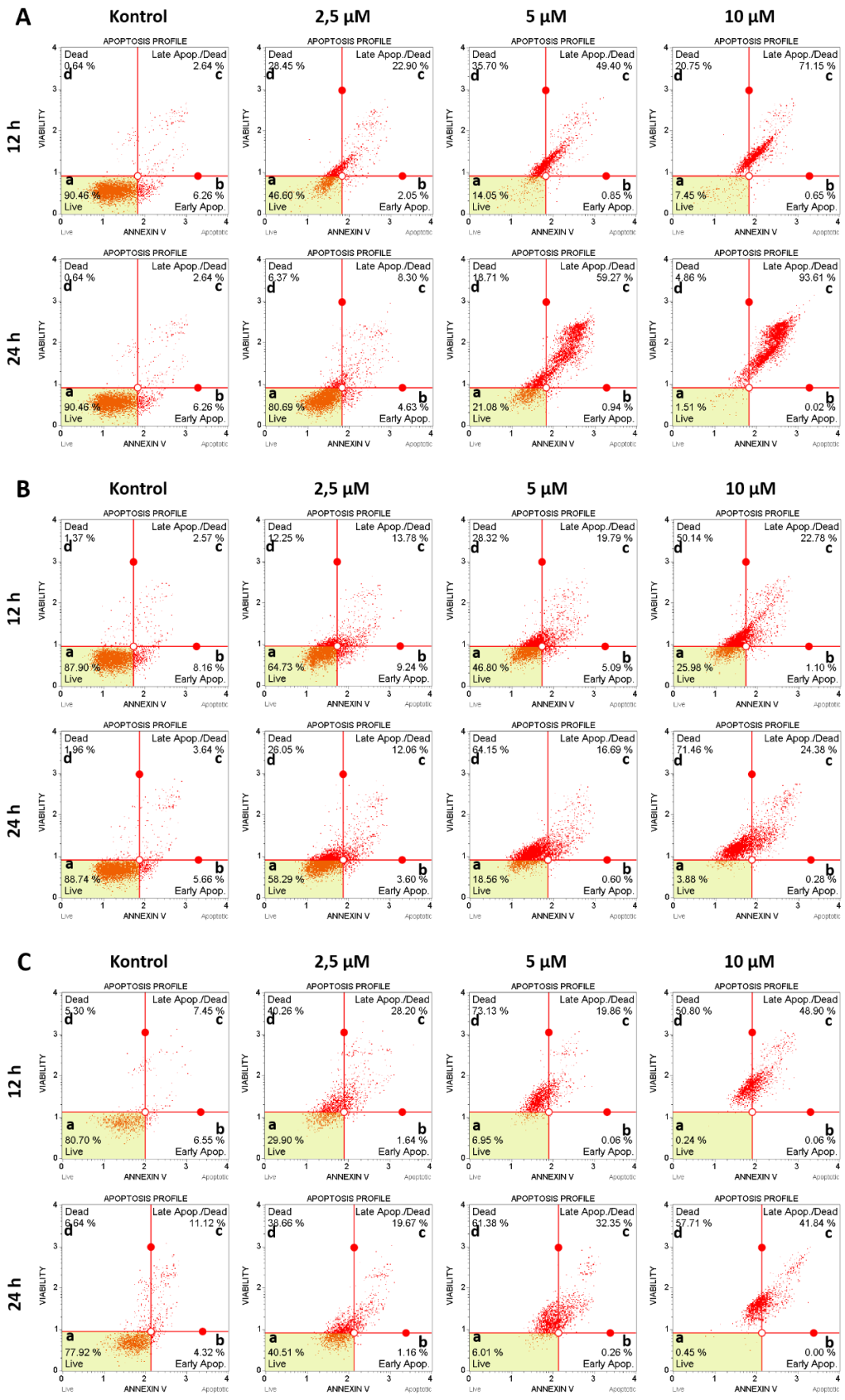


Şekil 3.1. Doza bağlı K13 bileşiği uygulamasının prostat kanseri hücre hatlarında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi. (A) PC-3, (B) DU 145 ve (C) LNCaP hücre hatlarında 0, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 μM dozlarında 48 saat K13 uygulaması sonucu hücre canlılıkları ölçülmüştür (*: $p<0,05$ **:$p<0,01$ ***:$p<0,001$).

3.2. AKIM SİTOMETRİSİ BULGULARI

3.2.1. Anneksin V Testi

K13 bileşiğinin PC-3, DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında sebep olduğu apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde Anneksin-V testi ile araştırıldığında bulunan sonuçlar Şekil 3.2., Tablo 3.1. ve 3.2.'de gösterilmiştir. Anneksin V-FITC ve 7-AAD düşük olan bölge sağlıklı hücreleri (a), Anneksin V-FITC yüksek ve 7-AAD düşük olan bölge erken apoptotik hücreleri (b), Anneksin V-FITC ve 7-AAD yüksek olan bölge geç apoptotik hücreleri (c) ve Anneksin V-FITC düşük ve 7-AAD yüksek olan bölge nekrotik hücreleri (d) göstermektedir. PC-3 hücre hattında K13'ün doza ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. K13 uygulaması sonrası DU 145 ve LNCaP hücrelerinde geç apoptoz ve nekrozun zamana ve doza bağlı arttığı; PC-3 hücrelerine kıyasla bu hücrelerde K13 uygulamasına bağlı olarak daha fazla nekroz gerçekleştiği bulunmuştur. DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında K13 uygulaması sonrası doza ve zamana bağlı nekrotik ölüm ve geç apoptotik evrede artış görülmektedir.



Şekil 3.2. K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (a: sağlıklı hücreler; b: erken apoptotik hücreler; c: geç apoptotik hücreler; d: nekrotik hücreler).

Tablo 3.1. K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

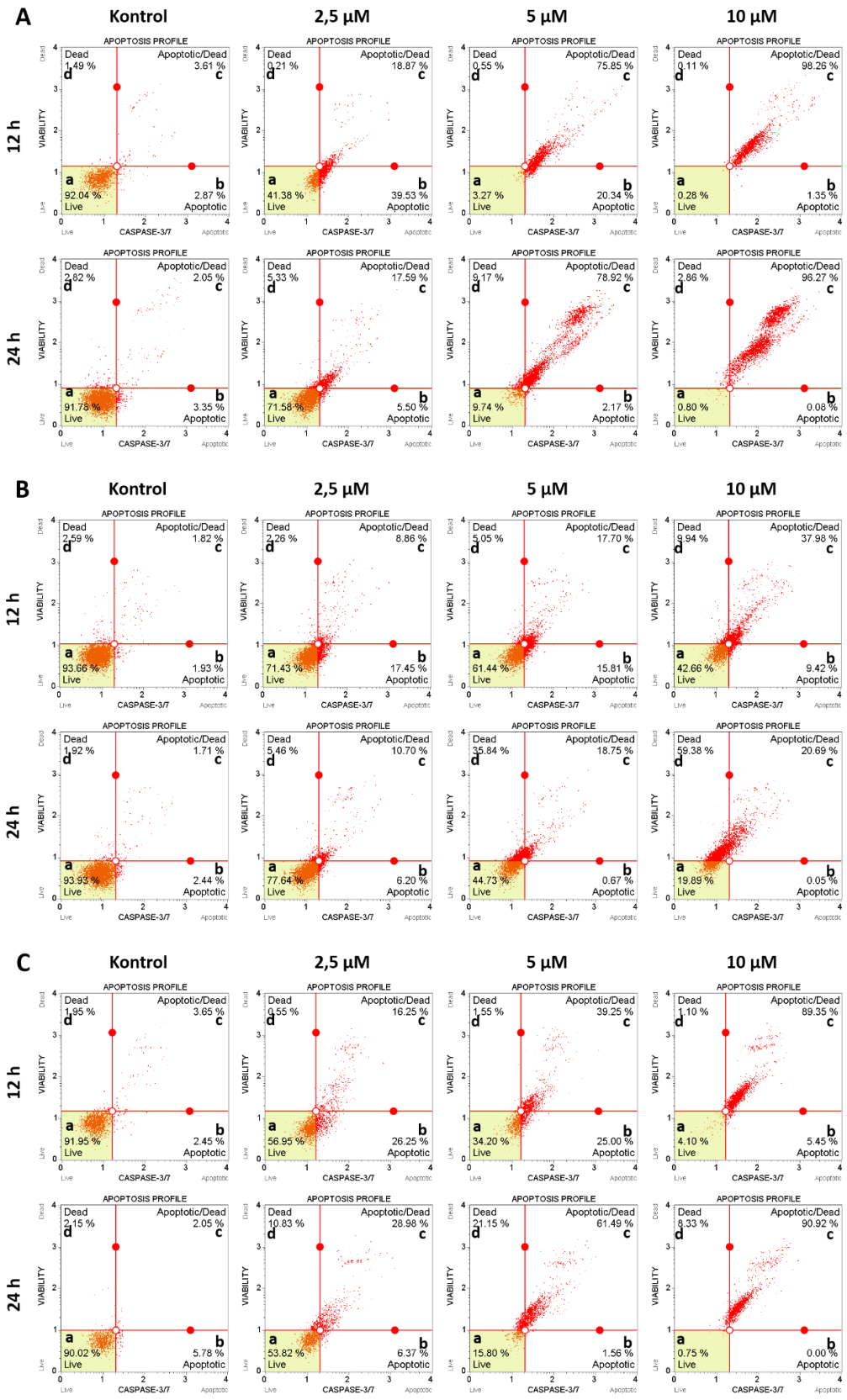
Hücreler	Dozlar	Canlı popülasyon (a)	Erken apoptotik popülasyon (b)	Geç apoptotik popülasyon (c)	Nekrotik popülasyon (d)
PC-3	Kontrol	%90,46	%6,26	%2,64	%0,64
	2,5 µM	%46,60	%2,05	%22,90	%28,45
	5 µM	%14,05	%0,85	%49,90	%35,70
	10 µM	%7,45	%0,65	%71,15	%20,75
DU 145	Kontrol	%87,90	%8,16	%2,57	%1,37
	2,5 µM	%64,73	%9,24	%13,78	%12,25
	5 µM	%46,80	%5,09	%19,79	%28,32
	10 µM	%25,98	%1,10	%22,78	%50,14
LNCaP	Kontrol	%80,70	%6,55	%7,45	%5,30
	2,5 µM	%29,90	%1,64	%28,20	%40,26
	5 µM	%6,95	%0,06	%19,66	%73,13
	10 µM	%0,24	%0,06	%48,90	%50,80

Tablo 2.2. K13 bileşiğinin 24 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

Hücreler	Dozlar	Canlı popülasyon (a)	Erken apoptotik popülasyon (b)	Geç apoptotik popülasyon (c)	Nekrotik popülasyon (d)
PC-3	Kontrol	%90,46	%6,26	%2,64	%0,64
	2,5 µM	%80,69	%4,63	%8,30	%6,37
	5 µM	%21,08	%0,94	%59,27	%18,71
	10 µM	%1,51	%0,02	%93,61	%4,86
DU 145	Kontrol	%88,74	%5,66	%3,64	%1,96
	2,5 µM	%58,29	%3,60	%12,06	%26,05
	5 µM	%18,56	%0,60	%16,69	%64,15
	10 µM	%3,88	%0,28	%24,38	%71,46
LNCaP	Kontrol	%77,92	%4,32	%11,12	%6,64
	2,5 µM	%40,51	%1,16	%19,67	%38,66
	5 µM	%6,01	%0,26	%32,35	%61,38
	10 µM	%0,45	%0,00	%41,84	%57,71

3.2.2. Kaspaz 3/7 Testi

Yapılan SRB ve Anneksin-V deneyleri sonuçları K13 bileşiğinin PC-3, DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında 12 ve 24 saatte apoptoza sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu sebepten apoptoz yolağının efektör kaspazlarından kaspaz 3/7 aktivasyonunun incelenmesi düşünülmüştür. Akım sitometrisinde kaspaz 3/7 değerlendirilmesi sonucunda elde edilen veriler Şekil 3.3., Tablo 3.2. ve 3.3.'de gösterilmiştir. Kaspaz 3/7 ve 7-AAD düşük olan bölge sağlıklı hücreleri (a), Kaspaz 3/7 aktivasyonu yüksek ve 7-AAD düşük olan bölge erken apoptotik hücreleri (b), Kaspaz 3/7 aktivasyonu ve 7-AAD yüksek olan bölge geç apoptotik hücreleri (c) ve Kaspaz 3/7 aktivasyonu düşük ve 7-AAD yüksek olan bölge nekrotik hücreleri (d) göstermektedir. K13 bileşiği uygulanmış PC-3 hücrelerinde anneksin-V deneyi ile uyumlu olarak doz ve zamana bağlı bir şekilde kaspaz 3/7 aktivasyonunda artış görülmektedir. Ayrıca doz arttıkça hücre popülasyonu erken apoptoz ve sonrasında geç apoptoz kadranına kaymaktadır. DU 145 hücre hatlarında yapılan kaspaz 3/7 aktivasyon deneyi sonuçları anneksin-V deneyi ile uyumlu olarak doza ve zamana bağlı artarken, 5 ve 10 µM dozlarının 24 saat sonucunda (anneksin-V deneyince nekrotik hücre ölümü olduğu tespit edilmişti.) kaspaz 3/7 aktivasyonu 12 saat sonucuna kıyasla daha azdır. LNCaP hücre hattı sonuçlarına bakıldığında kaspaz 3/7 aktivasyonu doza ve zamana bağlı arttığı saptanmıştır. 12 saat sonuçlarında doza bağlı olarak popülasyon sırasıyla erken ve geç apoptotik evreye kayarken 24 saat sonuçlarında geç apoptotik popülasyonda dramatik bir artış görülmüştür.



Şekil 3.3. K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması ile kaspaz 3/7 değerlendirmesi sonucu elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (a: sağlıklı hücreler; b: kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler; c: kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler; d: kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler)

Tablo 3.3. K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

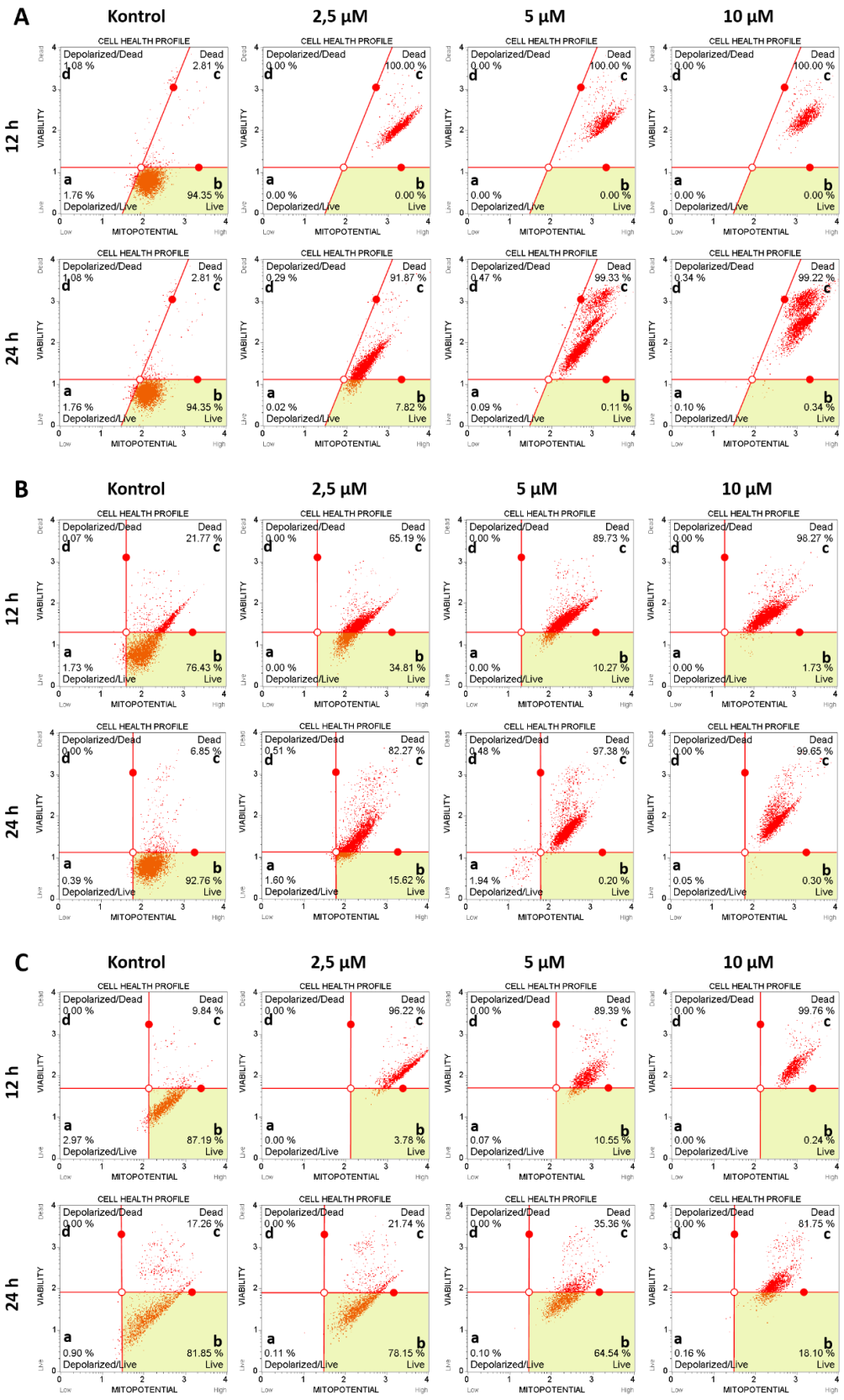
Hücreler	Dozlar	Canlı popülasyon (a)	Erken apoptotik popülasyon (b)	Geç apoptotik popülasyon (c)	Nekrotik popülasyon (d)
PC-3	Kontrol	%92,04	%2,87	%3,61	%1,49
	2,5 µM	%41,36	%39,53	%18,87	%0,21
	5 µM	%3,27	%20,34	%75,85	%0,55
	10 µM	%0,28	%1,35	%98,26	%0,11
DU 145	Kontrol	%93,66	%1,93	%1,82	%2,59
	2,5 µM	%71,43	%17,45	%8,86	%2,26
	5 µM	%61,44	%15,81	%17,70	%5,05
	10 µM	%42,66	%9,42	%37,98	%9,94
LNCaP	Kontrol	%91,95	%2,45	%3,65	%1,95
	2,5 µM	%56,95	%26,25	%16,25	%0,55
	5 µM	%34,20	%25,00	%39,25	%1,55
	10 µM	%4,10	%5,45	%89,35	%1,10

Tablo 3.4. K13 bileşiğinin 24 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

Hücreler	Dozlar	Canlı popülasyon (a)	Erken apoptotik popülasyon (b)	Geç apoptotik popülasyon (c)	Nekrotik popülasyon (d)
PC-3	Kontrol	%91,78	%3,35	%2,05	%2,82
	2,5 µM	%71,58	%5,50	%17,59	%5,33
	5 µM	%9,74	%2,17	%78,92	%9,17
	10 µM	%0,80	%0,08	%96,27	%2,86
DU 145	Kontrol	%93,93	%2,44	%1,71	%1,92
	2,5 µM	%77,64	%6,20	%10,70	%5,46
	5 µM	%44,73	%0,67	%18,75	%35,84
	10 µM	%19,89	%0,05	%20,69	%59,38
LNCaP	Kontrol	%90,02	%5,78	%2,05	%2,15
	2,5 µM	%53,82	%6,37	%28,98	%10,83
	5 µM	%15,80	%1,56	%61,49	%21,15
	10 µM	%0,75	%0,00	%90,92	%8,33

3.2.3. Mitopotential Testi

Apoptotik süreçte mitokondri membran permeabilitesinde değişimler meydana gelebilmektedir. Akım sitometresi ile mitokondri membran potansiyeli kaybı analizleri Şekil 3.4., Tablo 3.5. ve 3.6.'da gösterilmiştir. Histogramlarda mitokondri membranı depolarize hâlde olan ve canlı hücreler (a), sağlıklı hücreler (b), ölü hücreler (c) ve mitokondri membranı depolarize hâlde olan ölü hücreler (d) gösterilmektedir. PC-3 hücre hattında doz ve zamana bağlı olmaksızın K13'ün çok güçlü bir şekilde mitokondri membranını depolarize etmeden hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir. Benzer etki doza bağlı olarak artan şekilde DU 145 ve LNCaP hücre hattında da gözlemlenmiştir.



Şekil 3.4. K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu mitokondri membranı değerlendirmesi sonucu elde edilen sağlıklı mitokondri yüzde değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (a: depolarize mitokondri ve sağlıklı hücreler; b: sağlıklı mitokondri ve sağlıklı hücreler; c: ölü hücreler; d: depolarize mitokondri ve ölü hücreler)

Tablo 3.5. K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

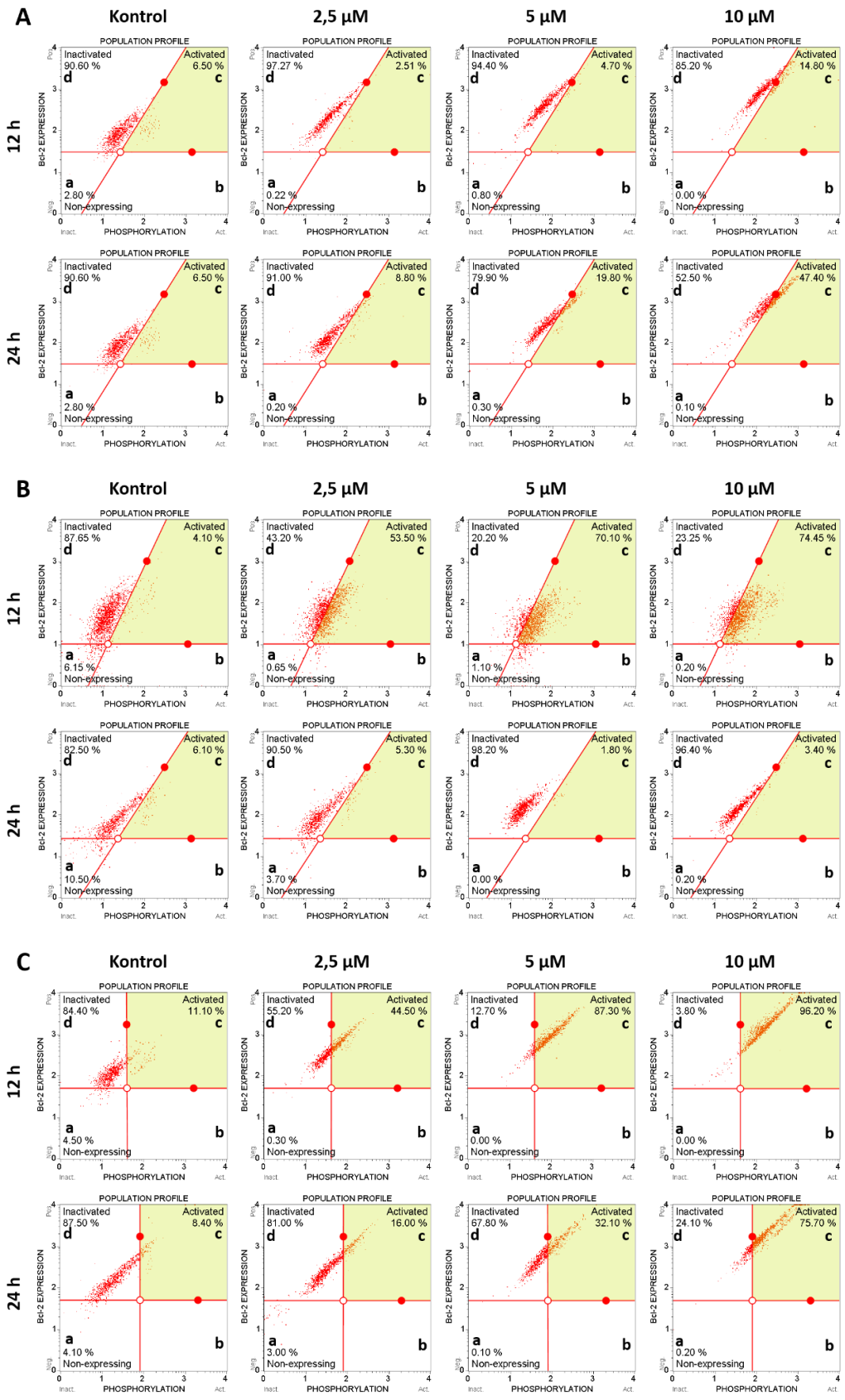
Hücreler	Dozlar	Mitokondri depolarize / Canlı hücreler (a)	Mitokondri sağlıklı / Canlı hücreler (b)	Ölü hücreler (c)	Mitokondri depolarize / Ölü hücreler (d)
PC-3	Kontrol	%1,76	%94,35	%2,81	%1,08
	2,5 µM	%0,00	%0,00	%100,00	%0,00
	5 µM	%0,00	%0,00	%100,00	%0,00
	10 µM	%0,00	%0,00	%100,00	%0,00
DU 145	Kontrol	%1,73	%76,43	%21,77	%0,07
	2,5 µM	%0,00	%34,81	%65,19	%0,00
	5 µM	%0,00	%10,27	%89,73	%0,00
	10 µM	%0,00	%1,73	%98,27	%0,00
LNCaP	Kontrol	%2,97	%87,19	%9,84	%0,00
	2,5 µM	%0,00	%3,78	%96,22	%0,00
	5 µM	%0,07	%10,55	%89,39	%0,00
	10 µM	%0,00	%0,24	%99,76	%0,00

Tablo 3.6. K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

Hücreler	Dozlar	Mitokondri depolarize / Canlı hücreler (a)	Mitokondri sağlıklı / Canlı hücreler (b)	Ölü hücreler (c)	Mitokondri depolarize / Ölü hücreler (d)
PC-3	Kontrol	%1,76	%94,35	%2,81	%1,08
	2,5 µM	%0,02	%7,82	%91,87	%0,29
	5 µM	%0,09	%0,11	%99,33	%0,47
	10 µM	%0,10	%0,34	%99,22	%0,34
DU 145	Kontrol	%0,39	%92,76	%6,85	%0,00
	2,5 µM	%1,60	%15,62	%82,27	%0,51
	5 µM	%1,94	%0,20	%97,38	%0,48
	10 µM	%0,05	%0,30	%99,65	%0,00
LNCaP	Kontrol	%0,90	%81,85	%17,26	%0,00
	2,5 µM	%0,11	%78,15	%21,74	%0,00
	5 µM	%0,10	%64,54	%35,36	%0,00
	10 µM	%0,16	%18,10	%81,75	%0,00

3.2.4. Bcl-2 Testi

Önemli bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2 incelemesi akım sitometrisi ile yapılmıştır. Bu deneyde hem Bcl-2'nin ifade düzeyindeki hem de fosforilasyon (Ser70) seviyesindeki değişim incelenmiştir. Akım sitometrisinde Bcl-2 değerlendirilmesi sonuçları Şekil 3.5., Tablo 3.7. ve 3.8.'de gösterilmiştir. Düşük Bcl-2 ifade seviyesi (a), fosforile Bcl-2 ifadesi (c) ve yüksek Bcl-2 ifade seviyesi (d) şeklinde gösterilmiştir. Deney sonuçları K13 bileşiğinin PC-3 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak Bcl-2 anlatımını arttırdığı tespit edilmiştir. Bcl-2 fosforilasyonu ise özellikle 24 saatlik (tüm dozlarda) ve 12 saatlik 10 μM K13 uygulamasıyla arttığı belirlenmiştir. DU 145 hücre hattında 12 saat K13 uygulaması sonrası doza bağlı olarak Bcl-2 fosforilasyonu artarken Bcl-2 ifade düzeyinde anlamlı bir artış olmadığı; 24 saat K13 uygulaması sonrasında ise doza bağlı olarak Bcl-2 ifade düzeyi artarken fosforilasyon seviyesinde artış olmadığı tespit edilmiştir. LNCaP hücre hattında hem doza hem zamana bağlı olarak Bcl-2 ifade düzeyi ve fosforilasyon seviyesinin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 3.5. K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu Bcl-2 ifadesinin ve fosforilasyonun değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları (a: düşük Bcl-2 ifadesi; c: fosforile Bcl-2; d: yüksek Bcl-2 ifadesi).

Tablo 3.7. K13 bileşiğinin 12 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

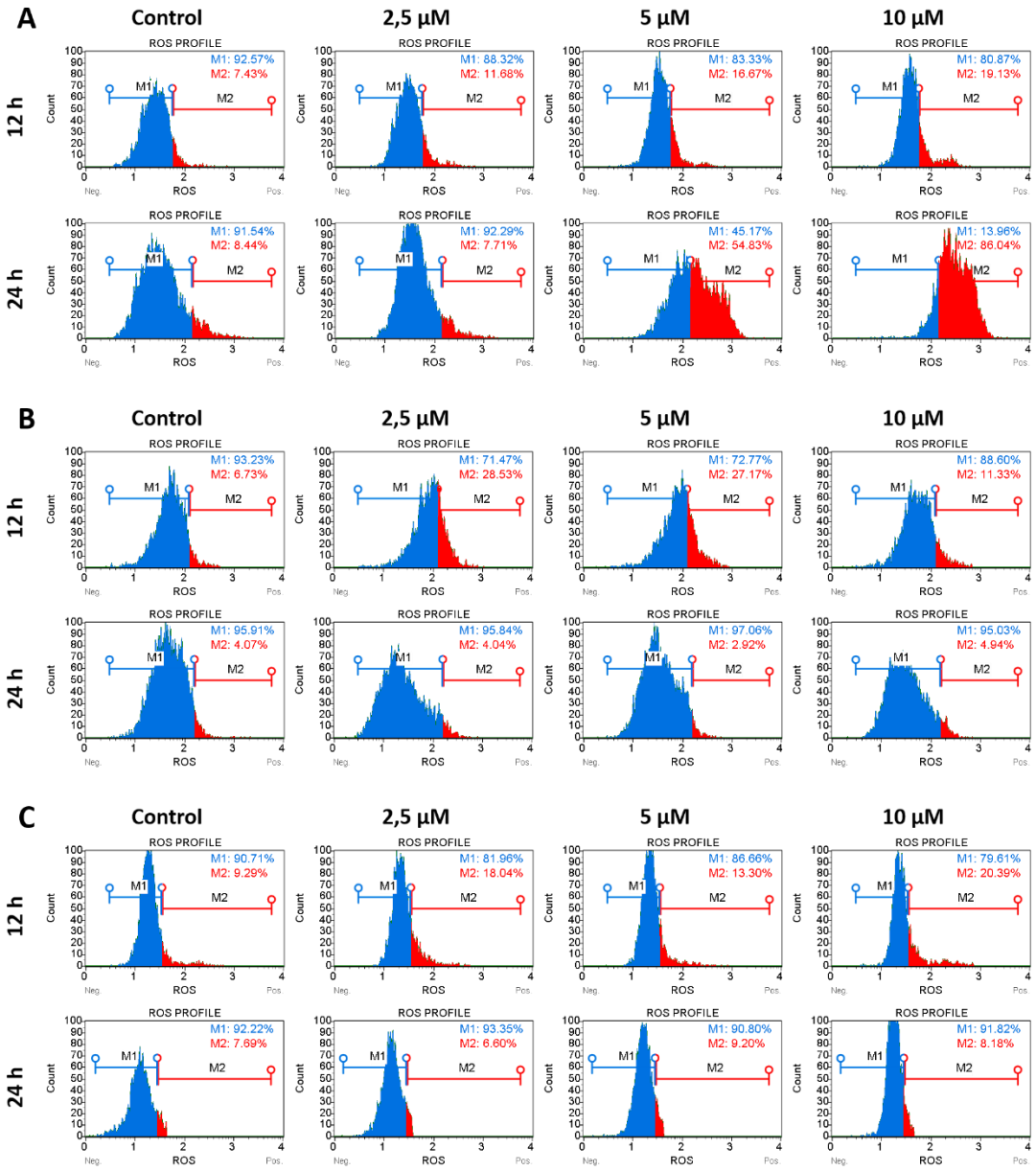
Hücreler	Dozlar	Düşük Bcl-2 ifadesi (a)	Fosforile Bcl-2 (c)	Yüksek Bcl-2 ifadesi (d)
PC-3	Kontrol	%2,80	%6,50	%90,60
	2,5 µM	%0,22	%2,51	%97,27
	5 µM	%0,80	%4,70	%94,40
	10 µM	%0,00	%14,80	%85,20
DU 145	Kontrol	%6,15	%4,10	%87,65
	2,5 µM	%0,65	%53,50	%43,20
	5 µM	%1,10	%70,10	%20,20
	10 µM	%0,20	%74,45	%23,25
LNCaP	Kontrol	%4,50	%11,10	%84,40
	2,5 µM	%0,30	%44,50	%55,20
	5 µM	%0,00	%87,30	%12,70
	10 µM	%0,00	%96,20	%3,80

Tablo 3.8. K13 bileşiğinin 24 saat boyunca uygulaması sonrası PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

Hücreler	Dozlar	Düşük Bcl-2 ifadesi (a)	Fosforile Bcl-2 (c)	Yüksek Bcl-2 ifadesi (d)
PC-3	Kontrol	%2,80	%6,50	%90,60
	2,5 µM	%0,20	%8,80	%91,00
	5 µM	%0,30	%19,80	%79,90
	10 µM	%0,10	%47,40	%52,50
DU 145	Kontrol	%10,50	%6,10	%82,50
	2,5 µM	%3,70	%5,30	%90,50
	5 µM	%0,00	%1,80	%98,20
	10 µM	%0,20	%3,40	%96,40
LNCaP	Kontrol	%4,10	%8,40	%87,50
	2,5 µM	%3,00	%16,00	%81,00
	5 µM	%0,10	%32,10	%67,80
	10 µM	%0,20	%75,70	%24,10

3.2.5. ROS Testi

Naftakinon türevli bileşiklerin hücre içi ROS seviyesini arttırdığı bilindiğinden akım sitometrisinde K13 bileşiğinin prostat kanseri hücrelerinde meydana getirdiği ROS incelenmiştir. Akım sitometrisinde hücre içi ROS değerlendirilmesi sonuçları Şekil 3.6.'dagösterilmiştir. M1 düşük, M2 ise yüksek ROS seviyesini göstermektedir. Deney sonuçlarına göre K13 bileşiği PC-3 hücre hattında hem doza hem zamana bağlı olarak hücre içi ROS seviyesini arttırmaktadır. PC-3 hücrelerine 24 saat K13 uygulaması sonrası ROS seviyesi 2.5, 5 ve 10 µM dozlarında sırasıyla %11,68, %16,67 ve %19,13; 12 saat K13 uygulaması sonrası ise söz konusu dozlarda sırasıyla %7,71, %54,83 ve %86,04 olarak tespit edilmiştir. Özellikle 5 ve 10 µM dozunda 24 saat sonuçlarındaki artış son derece çarpıcıdır. Öte yandan DU 145 ve LNCaP hücrelerinde 12 saat K13 uygulanmış hücre hatlarında her üç dozda da ROS artarken 24 saat K13 uygulaması sonrasında hücre içi ROS miktarında anlamlı bir artış görülmemektedir. DU 145 hücre hattında ROS seviyesi 12 saat K13 uygulaması sonrasında 2.5, 5 ve 10 µM dozlarında sırasıyla %28,53, %27,17 ve %11,33; 24 saat için aynı dozlarda sırasıyla %4,04, %2,92 ve %4,94 olarak tespit edilmiştir. LNCaP hücre hattında 12 saat K13 uygulaması sonrası ROS seviyesi 2.5, 5 ve 10 µM dozlarında sırasıyla %18,04, %13,30 ve %20,39 olarak; 24 saat K13 uygulaması sonrasında ROS seviyesi ise söz konusu dozlarda sırasıyla %6,60, %9,20 ve %8,18 olarak ölçülmüştür.

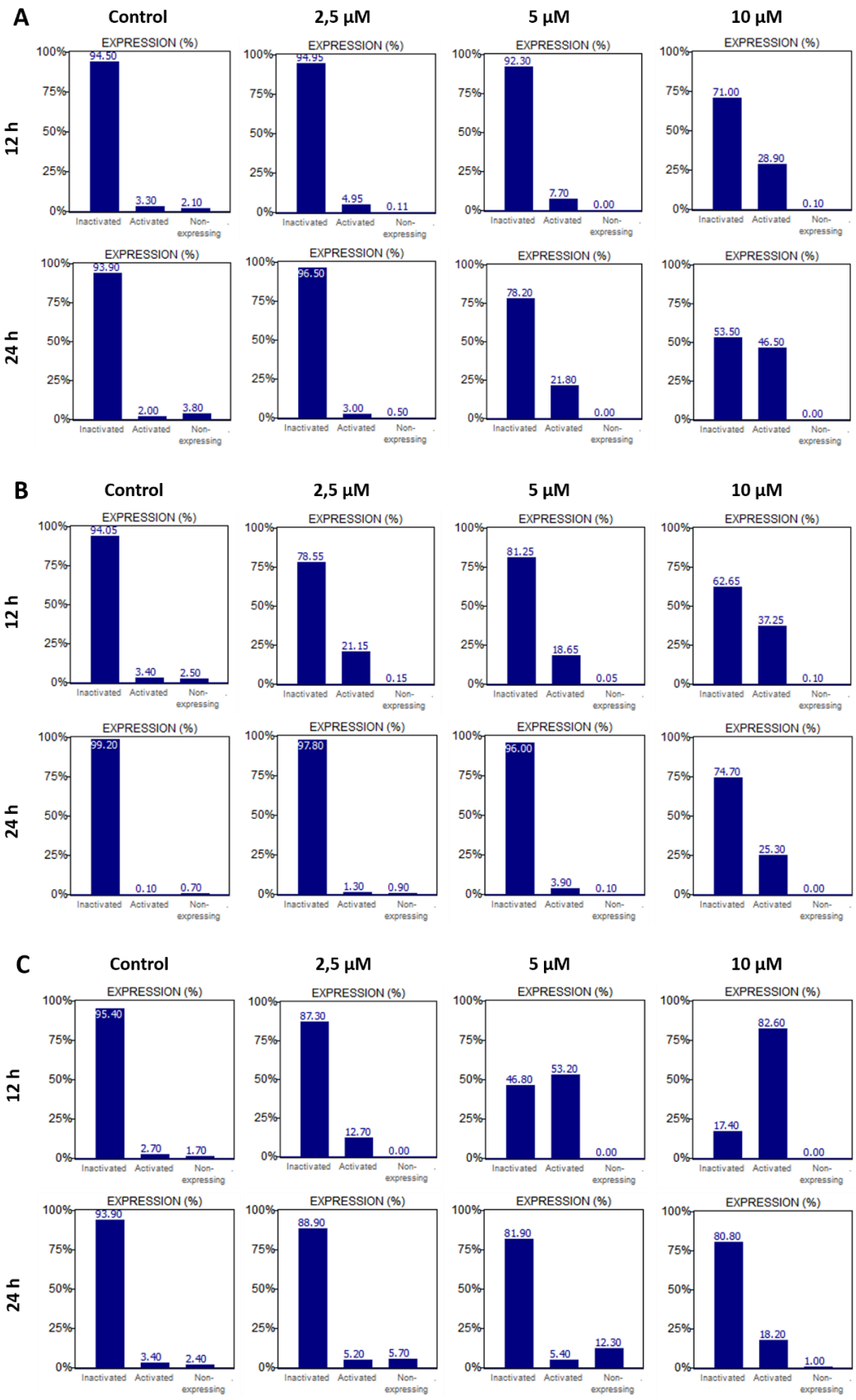


Şekil 3.6. K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu hücre içi ROS değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları

3.2.6. H2AX DNA Hasarı Testi

Naftakinon türevli bileşikler doğrudan ve dolaylı (ROS kaynaklı) olarak DNA hasarına sebep olmaktadır. DNA hasarı incelenmesi için akım sitometrisinde DNA hasarı belirteci olan Histon 2A.X fosforilasyonu incelenmiştir. Akım sitometrisinde hücre içi H2AX değerlendirilmesi sonuçları Şekil 3.7.'de gösterilmiştir. Yapılan ölçümlerde 12 saat K13 uygulaması sonrası 2.5, 5 ve 10 µM dozlarında sırasıyla PC-3 hücre hattında fosforile histon 2A.X %4,95, %7,70 ve %28,90; 24 saat K13 uygulaması sonrası söz konusu dozlarda sırasıyla %3, %21,80 ve %46,50 olarak tespit

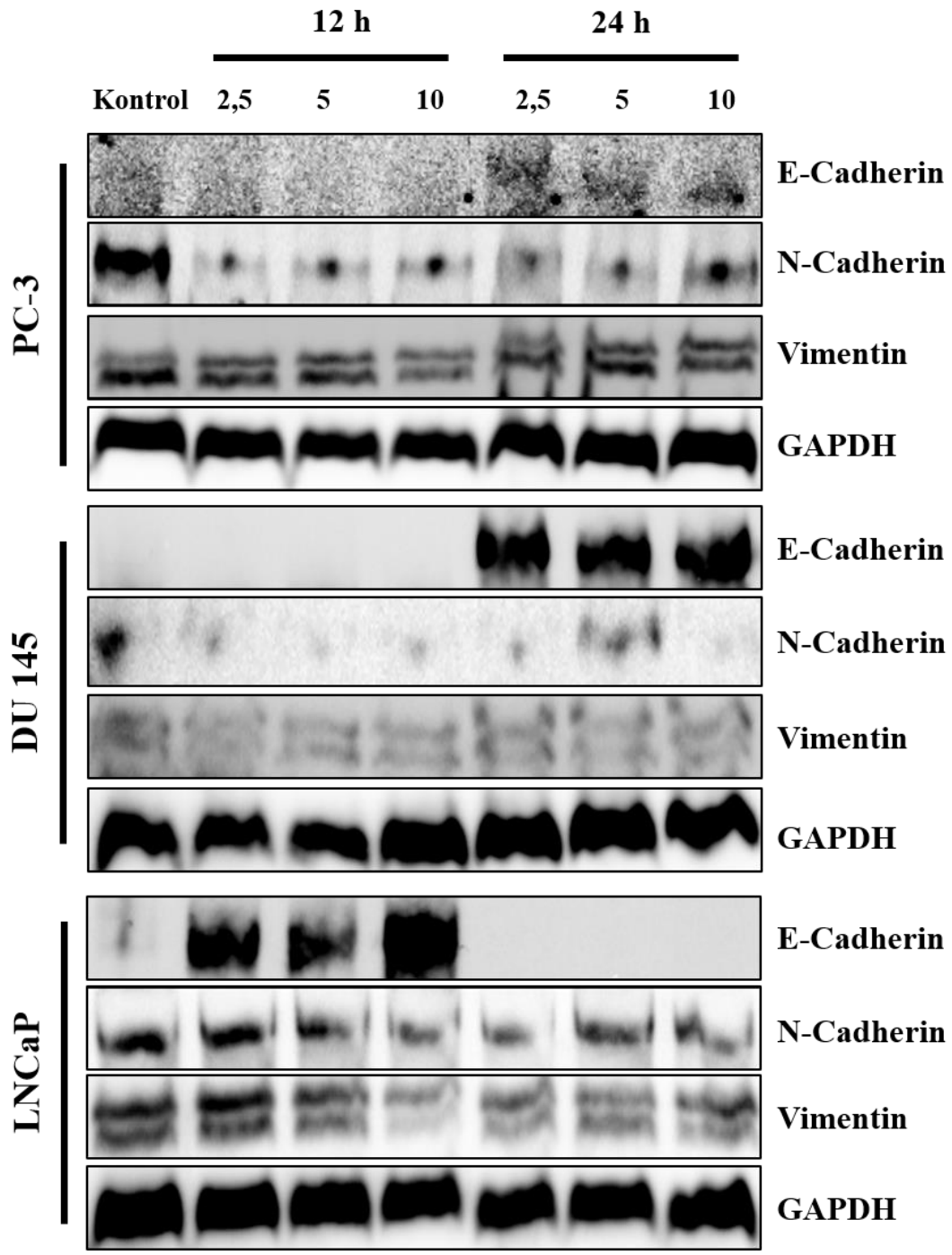
edilmiştir. Bu sonuçlara göre PC-3 hücre hattında K13 bileşiğinin 5 ve 10 µM dozlarında DNA hasarına sebep olduğu ve zamana bağlı hasarın arttığı tespit edilmiştir. DU 145 hücre hattında fosforile H2A.X seviyesi söz konusu dozlarda 12 saat için sırasıyla %21,15, %18,65 ve %37,25; 24 saat içinse %1,30, %3,90 ve %25,30 olarak ölçülmüştür. DU 145 hücrelerinde tüm dozlarda 12 saat K13 uygulaması sonrası DNA hasarı artarken 24 saatte DNA hasarı geri çekilmektedir. Yine de 24 saatte 10 µM dozunda yüksek DNA hasarı görebilmekteyiz. LNCaP hücre hattında K13 uygulaması sonrası H2A.X fosforilasyonu incelendiğinde söz konusu dozlarda 12 saat için sırasıyla %12,70, %53,20 ve %82,60; 24 saat içinse %5,20, %5,40 ve %18,20 olarak ölçülmüştür. LNCaP hücrelerinde K13 bileşiğinin sebep olduğu DNA hasarı 12 saat verilerinde görüldüğü üzere doza bağımlı artmaktadır. Ancak DU 145 hücre hattında önceki sonuçlara paralel olarak bir benzerlik görülmektedir; 24 saat K13 uygulaması sonrasında DNA hasarının geri çekildiği tespit edilmiş ve 24 saatte 10 µM dozunda, DU 145 hücrelerinde olduğu gibi, %18,20 ile yüksek DNA hasarı bulunmuştur.



Şekil 3.7. K13 bileşiğinin 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonlarında PC-3 (A), DU 145 (B) ve LNCaP (C) insan prostat kanseri hücrelerinde uygulanması sonucu DNA hasarı değerlendirmesi sonucu elde edilen değerlerinin 12 ve 24 saatlik histogramları

3.3. WESTERN BLOT BULGULARI

PC-3, DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında K13 bileşiği uygulaması sonrası metastaz ve invazyon ile ilişkilendirilen EMT'ye özgü E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin proteinlerinin ifade düzeyleri incelendi. PC-3 hücre hattında epitel karakter ile ilişkilendirilen E-kaderinin özellikle 24 saatlik K13 uygulaması ile arttığı tespit edilmiştir. Mezenkimal karakter ile ilişkilendirilen N-kaderin ve Vimentin ise K13 uygulaması sonrası PC-3 prostat kanseri hücre hattında doza ve zamana bağlı azaldığı görülmektedir. DU 145 hücre hattında N-kaderin ve Vimentin ifade düzeylerinde belirgin bir değişim görülmezken E-kaderin ifadesi 24 saat K13 uygulaması sonunda üç dozda da dramatik bir biçimde artmıştır. Öte yandan LNCaP prostat kanseri hücre hattında E-kaderin ifadesi 12 saatlik K13 uygulaması ile aşırı şekilde artarken 24 saatte E-kaderin anlatımının geri çekildiği tespit edilmiştir. Mezenkimal karakter belirteçleri olan N-kaderin ve Vimentin ifade düzeylerinin ise zamana ve doza bağlı azaldığı görülmektedir (Şekil 3.8).

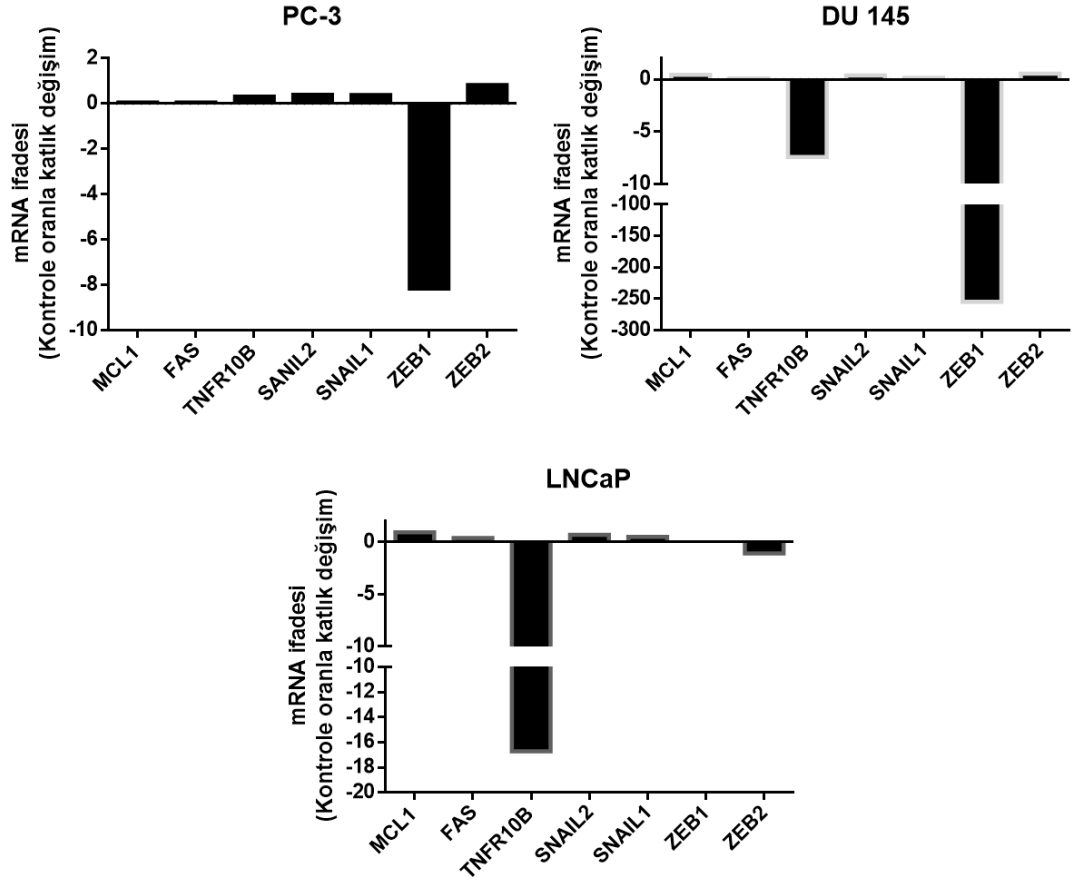


Şekil 3.8. PC-3, DU 145 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, K13 (2.5, 5 ve 10 μM) ile 12 ve 24 saat tedavi sonrasında N-kaderin, E-kaderin ve Vimentin protein ifade düzeylerinin Western blot yöntemiyle alınan sonuçları

3.4. QRT-PCR BULGULARI

PC-3, DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında K13 bileşiği uygulaması sonrası EMT'nin kritik transkripsiyon faktörleri olan Snail, Slug, Zeb1 ve Zeb2'nin yanı sıra ölüm reseptörleri olan Fas ve Ölüm Reseptörü 5 (DR5) ile anti-apoptotik olan Mcl-1 proteinlerinin mRNA düzeyleri incelenmiştir. PC-3 ve DU 145 prostat kanseri hücre

hatlarında K13 bileşiği Zeb1 transkripsiyonunda ciddi oranda azalmaya neden olduğu saptanmıştır. TNFR10B, protein adıyla DR5, DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında 12 saatlik 10 µM dozunda K13 uygulaması sonrası kontrole oranla sırasıyla 7 ve 17 kat azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.9. PC-3, DU 145 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerinde, K13 (10 µM) ile 12 saat tedavi sonrasında EMT ve hücre ölümü ile ilgili genlerin ifade düzeylerinin qRT-PCR yöntemiyle alınan sonuçları

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezde PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücre hatlarında 1,4-naftakinon türevli yeni sentez bir bileşiğin sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda söz konusu bileşiğin sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Literatürde diğer 1,4-naftakinon türevli bileşiklerin de anti-kanser özelliği çalışılmaktadır. Çalışmanın önemli bir özelliği bu çalışmada kullanılan bileşiğin yeni ve dolayısıyla daha önce çalışılmamış olmasıdır. Bu açıdan ele alınacak olursa, bu çalışma K13 bileşiğinin sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Günümüzde kanser tüm dünyada en ciddi hastalıklardan biridir. Kanser hücrelerinin tedaviye direnç geliştirebilmesi onu en önemli sağlık sorunu hâline getirmektedir. Ayrıca salgıladıkları faktörler ile büyümelerini kontrol edebilmelerinin yanı sıra immün sistemden de kaçabilmektedirler (Jones ve ark., 2016; Shaffer ve ark., 2017). Kanser tedavisinde kemoterapi ilaçları ve/veya hedefe yönelik ilaçlar kullanılmasına karşın hâlâ istenilen düzeyde tedavi sonucu alınamamaktadır. Bunun iki temel sebebi vardır: Kanser hücrelerinin moleküler düzeyde birbirinden farklı olması ve ilaca direnç geliştirmesi. 1,4-naftakinon türevli ilaçların klinikte yer alması fakat yukarıda belirtilen sebeplerden yeterince etkili olmaması araştırmacıları yeni 1,4-naftakinon türevli sentezlere yöneltmiştir (Aziz, ve ark. 2008; Bhasin ve ark., 2013; Wang ve ark., 2019).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmada K13 bileşiğinin kanser tedavisinde potansiyel yeni bir ilaç olup olamayacağı araştırılmıştır. Sentezi ve karakterizasyonu İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yapılan K13 bileşiğinin SRB testiyle p53 yoksun ve androjen bağımsız büyüyen PC-3, p53 mutant ve androjen bağımsız büyüyen DU 145 ve p53 doğal tip ve androjen bağımlı büyüyen LNCaP hücre hatları kullanılarak farklı konsantrasyonlarda uygulanarak bağıl hücre canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. K13 bileşiğinin sebep olduğu hücre ölümü incelendiğinden %50'ye en yakın hücre canlılığı değerleri olarak üç farklı doz (2.5, 5 ve 10 μM) seçilmiştir. Bu fark hücrelerin moleküler karakterlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Benzer şekilde 1,4-naftakinon türevli bileşiklerle kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda IC50 değeri olarak 10 µM ve altı dozları sıkça kullanılmıştır (Liu ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerinin DU 145 hücrelerine kıyasla K13 bileşiğine daha hassas olduğu doza bağlı yapılan SRB çalışmasıyla elde edilen bir diğer bulgudur.

SRB testiyle 48 saat için elde edilen IC50 değerleri çalışmanın devamında hücredeki ölüm mekanizmasının incelenmesi açısından 12 ve 24 saat süresince yukarıda bahsedilen üç prostat kanseri hücre hattına uygulanmıştır. İlk olarak hücre ölüm modunun belirlenmesi için Anneksin V/PI değerlendirilmiştir. PC-3 prostat kanseri hücre hattında doza ve zaman bağlı olarak apoptoz artarken DU 145 ve LNCaP prostat kanseri hücre hattında doza ve zamana bağlı olarak sekonder nekrozun (ya da nekrozun) arttığı tespit edilmiştir. DU 145 hücre hattında özellikle 24 saatte ya da 12 saatin 5 ve 10 µM K13 uygulaması dozlarında nekrozun ya da sekonder nekrozun etkili olduğunu görülmektedir. Bazı 1,4-naftakinon türevli bileşiklerin nekroza sebep olabileceği yapılan hem in vitro hem de in vivo deneylerinde de daha önce gösterilmiştir (de Sena Pereira ve ark., 2016; Kanaan ve ark., 2009; Majiene ve ark., 2019; Munday ve ark., 1991). Apoptoz konusunda daha detaylı bilgi edinebilmek için kaspaz 3/7 aktivasyonu incelenmiştir. Anneksin V/PI değerlendirmesiyle korele olarak PC-3 hücre hattında kaspaz 3/7 aktivasyonu dramatik bir şekilde doza ve zaman bağlı arttığı tespit edilmiştir. LNCaP hücre hattında da kaspaz 3/7 aktivasyonunun doza ve zamana bağlı arttığı, özellikle 12 ve 24 saat K13 bileşiğinin 5 ve 10 µM dozlarında ciddi kaspaz 3 ve 7'nin aktive olduğu bulunmuştur. DU 145 hücre hattı incelendiğinde yalnızca K13 bileşiğinin 10 µM dozu 12 saat boyunca uygulandığında hücrelerin %50'sine yakınında kaspaz 3/7 aktivasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu durum apoptoz temelinde gelişen sekonder nekrozu düşündürmektedir. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda benzer durumlar kaspaz aracılı nekroz ya da nekroptoz ile ilişkilendirilebilmektedir (Yoon ve ark., 2014; Junying Yuan ve ark., 2016).

Naftakinon türevli bileşiklerin en önemli ölüm mekanizmalarından birisinin ROS artışı olduğunu önceki bölümlerde de belirtilmişti. PC-3 hücre hattında 5 ve 10 µM dozlarında K13 bileşiğinin hem 12 hem de 24 saat uygulanması sonrası ROS seviyesinin dramatik bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. 1,4-naftakinon türevli bileşiklerin çeşitli hücre hatlarında ROS'ları arttırdığı tespit edilmiştir (McCall ve ark., 2017; Ourique ve ark., 2016). DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında ise yalnızca 12 saat

K13 uygulaması sonrası ROS artışı tespit edilmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta ROS seviyesi tespiti için kullanılan Muse kiti reaktif oksijen türevlerinden yalnızca süperoksit seviyesini ölçebilmektedir (Anonim, 2013). Naftakinon türevli bileşiklerin hücre içi ROS seviyesini arttırdığı ve yapılan bu deneyde her üç hücre hattında da süperoksit seviyesinin artması K13 bileşiğinin farklı doz ve/veya zamanlarda diğer ROS'ları arttırmış olabileceğini düşündürmektedir. Süperoksitler ortaya çıkan ilk ROS'lardır ve süperoksitler hidrojen peroksite, hidroksi radikallerine ve/veya peroksinitrite dönüştürülebilirler (Abedinpour ve ark., 2013). DU 145 ve LNCaP hücre hatlarında 12 saatte tespit edilen süperoksit 24 saatte diğer ROS'lara dönüştürülmüş olabileceğini düşündürmektedir. PC-3 hücre hattında ise hem 12 hem 24 saatte tespit edilen süperoksit seviyesi K13 bileşiğinin ROS arttırıcı etkisinin bu hücre hattında DU 145 ve LNCaP hücre hatlarına kıyasla daha uzun sürdüğünü ve daha güçlü olduğunu göstermektedir. ROS'ların bağ yapma açısından yüksek afiniteye sahip olması onların DNA'ya bağlanıp DNA hasarına sebep olmasına ve hücre içi oksidatif stresi arttırarak homeostazı bozmaktadır. Bunun sonunda p53 ve/veya p38/JNK yolağı üzerinden apoptoz tetiklenmektedir (Matés ve ark., 2012). Ayrıca kinon türevli ilaçların kaspazların aktive olmadığı durumdaki hücre ölümünde nekroz benzeri hücre ölümünü ROS artışına bağlı olarak tetiklediği bir başka çalışmada tespit edilmiştir (Vásquez ve ark., 2012). DU 145 hücre hattında özellikle 24 saatlik K13 uygulaması sonrası tespit edilen hücre ölümü fakat kaspaz 3/7 aktive olmaması bu ölüm modunu düşündürmektedir. ROS artışının tespit edilmesinden sonra mitokondri membran potansiyelindeki değişim incelenmiştir. Her üç hücre hattında da mitokondri membran potansiyelinde bir değişim saptanmamıştır. Bu noktadan hareketle artan ROS mitokondri kaynaklı değil, sitozol kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Sitozol kaynaklı ROS'un apoptozu ya da farklı hücre ölüm yollarını tetiklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Chandra ve ark., 2000; Dawson ve Dawson, 1996; Gil ve ark., 2003; Palit ve ark., 2015).

Apoptozun içsel yolağında görev alan önemli bir anti-apoptotik protein olan bcl-2, serin 70 bölgesinden JNK tarafından fosforillendiği zaman anti-apoptotik özelliği inaktive olmakta ve pro-apoptotiklerle kurduğu heterodimerden ayrılmaktadır (Deng ve ark., 2001; Wei ve ark., 2008; Yamamoto ve ark., 1999). ROS artışına bağlı JNK artışı ve aktivasyonu bilinen bir olgudur (Chambers ve LoGrasso, 2011; Shen ve Liu, 2006; Shi ve ark., 2014). PC-3 ve LNCaP hücre hattında K13 bileşiği dozuna ve

uygulama zamanına bağlı olarak bcl-2'nin hem fosforilasyonu hem de ifade düzeyi arttığı tespit edilmiştir. DU 145 hücre hattında ise 12 saat K13 uygulamasıyla doza bağlı bcl-2 fosforilasyonu artarken; 24 saat K13 uygulamasıyla doza bağlı bcl-2 ifade düzeyi artmaktadır. ROS artışı göz önüne alındığında bcl-2 fosforilasyonunun JNK bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Bcl-2 ifadesindeki artış apoptoza direnç olarak değerlendirilebileceği gibi hücredeki diğer anti- ve pro-apoptotik proteinlerin ifade düzeyleri de bu konuda önem teşkil etmektedir. Anti-apoptotiklerin azalması ve pro-apoptotiklerin artması sonucunda hücre bcl-2 ifadesini arttırmış olabilir. Fakat artan serin 70 fosforilasyonu bcl-2'nin inaktive olmasına sebep olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarda 1,4-naftakinon türevli bileşiklerin DNA hasarına sebep olduğu ve bu hasarın ROS artışı üzerinden olduğu gösterilmiştir (Chien ve ark., 2019; Ourique ve ark., 2015, 2016; Sameni ve Hande, 2016). Bu çalışmada K13 bileşiğinin PC-3 prostat kanseri hücre hattında doza ve zamana bağlı DNA hasarını arttırdığı tespit edilmiştir. DNA hasarındaki bu artış ROS artışı ile koreledir. ROS'lar DNA'daki nükleobazlara bağlanarak yapısını değiştirmekte, bunun sonucunda DNA'da kırılmalar oluşmaktadır (Cadet ve Wagner, 2013; Cadet ve Douki, 2011). LNCaP ve DU 145 prostat kanseri hücre hatlarında 12 saat K13 bileşiği uygulaması sonrası, ROS ile korele olarak, DNA hasarında doza bağlı artış görülmektedir. Fakat bu korelasyon PC-3 hücre hattındaki kadar dramatik değildir. Bunun altında yatan sebep naftakinon türevli bileşiklerin DNA hasar mekanizmasının ROS'un yanı sıra naftakinonlardan meydana gelen semikinonların da DNA'ya bağlanıp çift zincirli kırıklara sebep olmasıdır (Sameni ve Hande, 2016; Sinha ve Chignell, 1979; Wellington, 2015). Bunun yanı sıra naftakinon türevli bileşikler topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA'daki çift zincirli kırıkların tamirini engellemektedir (Chien ve ark., 2019; de Campos-Nebel ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2017; Nitiss ve ark., 2012). Bu çalışmada DNA hasarı tespiti için kullanılan yöntem histon 2AX fosforilasyonunun ölçümüne dayanmaktadır. DU 145 ve LNCaP hücre hattındaki K13 uygulamasının 24 saat sonuçlarındaki fosforilasyonun azalması histon 2AX proteininin defosforile olmasıyla açıklanmaktadır. Yapılan çalışmalarda fosforile histon 2AX'in serbest histon 2AX ile değiştirilemediği ve fosforilasyonu takiben üç saati içinde fosforilasyon seviyesinde en az %50 azalma olduğu belirtilmiştir (Nazarov ve ark., 2003). Ayrıca, H2AX defosforilasyonunda görevli önemli proteinlerden biri WIP1'dir ve WIP1 p53

tarafından regüle edilmektedir (Moon ve ark., 2010). PC-3 hücre hattında TP53 geninde delesyon; DU 145 hücre hattında p53 proteininin DNA bağlanma bölgesinde mutasyon bulunmaktadır. LNCaP hücre hattı ise doğal tip p53 ifade edebilmektedir (Chappell ve ark., 2012). Bu sebeple 12 saat K13 uygulamasına kıyasla 24 saatteki H2AX fosforilasyonundaki azalma doğal tip p53 ifade eden LNCaP hücre hattında daha dramatikken DU 145 prostat kanseri hücre hattında daha azdır. PC-3 hücre hattında ise hem WIP1'in çalışmaması hem de uzun süre devam eden ROS etkisiyle H2AX fosforilasyonu artmaktadır.

Kanserin en önemli sorunlardan birisi de EMT geçirerek hareket kazanmaları ve metastaz yapmalarıdır (Nieto ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında kullanılan K13 bileşiğin EMT üzerine etkisi hem western blot hem de qRT-PCR yöntemleri ile incelenmiştir. Yapılan deneylerde PC-3, DU 145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücre hatlarında K13 bileşiğinin epitelyal karaktere ait belirteçleri arttırdığı ve mezenkimal belirteçleri azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum K13 bileşiğinin MET'i indüklediği, dolayısıyla metastazı engelleyebilme olasılığı olduğuna işaret etmektedir. Prostat kanserinde EMT'nin kötü prognoz ve kastrasyon dirençli hücrelerin metastazı ile olan ilişkisi yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. EMT sırasında epitel belirteçlerin (E-kaderin gibi) azalırken mezenkimal belirteçlerin (N-kaderin gibi) arttığı belirtilmiştir (Grant ve Kyprianou, 2013). Ayrıca EMT'de kritik rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden Zeb1'in kötü prognoz ve agresif tümör karakteri ile olan ilişkisi farklı çalışmalarla ve klinik verilerle ispatlanmıştır (Drake ve ark., 2009; Orellana-Serradell ve ark., 2018; Stemmler ve ark., 2019). Çalışmada kullanılan yeni sentez K13 bileşiğinin Zeb1 mRNA'sını dramatik bir biçimde azaltmasının yanı sıra EMT ile ilişkili protein sonuçları da göz önüne alındığında, söz konusu bileşiğin anti-metastatik etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda benzer şekilde farklı naftakinon türevli bileşiklerin invazyon ve migrasyonu inhibe ettiği, fare modellerinde tümör büyümesi ve metastazı engellediği, MET'i indüklediği gösterilmiştir (Hafeez ve ark., 2013; Liew ve ark., 2014; Reese ve ark., 2010; Sakunrangsit ve ark., 2016; Tsang ve ark., 2019).

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla görülmüştür ki 1,4-naftakinon türevli yeni sentezlenen K13 bileşiği insan prostat hücre hatlarında (PC-3, DU 145 ve LNCaP) farklı ölüm modlarını tetiklemektedir. Bu çalışma K13 bileşiğinin potansiyel bir ilaç adayı olabileceğini ortaya koymuştur. Çalışmada yer almayan farklı tip kanser hücre

hatlarında da denemesi yapılarak olası kullanımı için etki alanı genişletilebileceği düşünülmüştür. Bir sonraki inceleme basamağı olarak bu bileşiğin kliniğe uyarlanabilmesi için in vivo deneylerle farmakokinetik ve farmakodinamik etkilerinin araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

Abedinpour, P., Baron, V. T., Chrastina, A., Welsh, J., & Borgström, P. (2013). The combination of plumbagin with androgen withdrawal causes profound regression of prostate tumors in vivo. *The Prostate*, *73*(5), 489–499. https://doi.org/10.1002/pros.22585

Anonim. (2013). *Muse ® Oxidative Stress Kit User ' s Guide*. *100111*, 1–14. https://doi.org/10.1262/jrd.10-058A

Anonim. (2019). Gleason Score - Prostate Conditions. Tarihinde 10 Mayıs 2019, adresinden erişildi https://www.prostateconditions.org/about-prostate-conditions/prostate-cancer/newly-diagnosed/gleason-score

Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 9–18. https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268

Artandi, Steven E., & DePinho, R. A. (2000). Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nature Medicine*, *6*(8), 852–855. https://doi.org/10.1038/78595

Aziz, M. H., Dreckschmidt, N. E., & Verma, A. K. (2008). Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, *68*(21), 9024–9032. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2494

Başaran, M., Bavbek, S., Çal, Ç., İğdem, Ş., Özen, H., Özgüroğlu, M., … Türkeri, L. (2015). *Prostat Kanseri Yol Haritası: Uluslararası Kılavuzlar ve Klinik Deneyimler Işığında*. Tarihinde adresinden erişildi https://kanser.org/saglik/upload/prostat_kanseri/binder1.pdf

Beer, T. M., Armstrong, A. J., Rathkopf, D. E., Loriot, Y., Sternberg, C. N., Higano, C. S., … PREVAIL Investigators. (2014). Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, *371*(5), 424–433. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1405095

Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of Members of the Cadherin

Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *1*(6), a003129–a003129. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003129

Bhasin, D., Chettiar, S. N., Etter, J. P., Mok, M., & Li, P.-K. (2013). Anticancer activity and SAR studies of substituted 1,4-naphthoquinones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *21*(15), 4662–4669. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.017

Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *6*(8), 611–622. https://doi.org/10.1038/nrg1656

Botelho, F., Pina, F., & Lunet, N. (2010). VEGF and prostatic cancer: a systematic review. *European Journal of Cancer Prevention*, *19*(5), 385–392. https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e32833b48e1

Brandelli, A., Bizani, D., Martinelli, M., Stefani, V., & Gerbase, A. E. (2004). Antimicrobial activity of 1,4-naphthoquinones by metal complexation. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, *40*(2). https://doi.org/10.1590/s1516-93322004000200014

Brandy, Y., Brandy, N., Akinboye, E., Lewis, M., Mouamba, C., Mack, S., … Bakare, O. (2013). Synthesis and characterization of novel unsymmetrical and symmetrical 3-halo- or 3-methoxy-substituted 2-dibenzoylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *18*(2), 1973–1984. https://doi.org/10.3390/molecules18021973

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Cadet, J., & Wagner, J. R. (2013). DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(2), a012559–a012559. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012559

Cadet, Jean, & Douki, T. (2011). Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, *131*(5), 1005–1007. https://doi.org/10.1038/jid.2011.51

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*, *69*(3), 4–10. https://doi.org/10.1159/000088478

Carroll, P. R., Parsons, J. K., Andriole, G., Bahnson, R. R., Barocas, D. A., Catalona, W. J., … National comprehensive cancer network. (2014). Prostate cancer early detection, version 1.2014. Featured updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, *12*(9), 1211–1219; quiz 1219. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25190691

Chambers, J. W., & LoGrasso, P. V. (2011). Mitochondrial c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling Initiates Physiological Changes Resulting in Amplification of Reactive Oxygen Species Generation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(18), 16052–16062. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223602

Chan, F. K.-M., Shisler, J., Bixby, J. G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., … Lenardo, M. J. (2003). A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of biological chemistry*, *278*(51), 51613–51621. https://doi.org/10.1074/jbc.M305633200

Chandra, J., Samali, A., & Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, *29*(3–4), 323–333.

Chappell, W. H., Lehmann, B. D., Terrian, D. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., & McCubrey, J. A. (2012). p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *11*(24), 4579–4588. https://doi.org/10.4161/cc.22852

Chien, C.-M., Yang, J.-C., Wu, P.-H., Wu, C.-Y., Chen, G.-Y., Wu, Y.-C., … Chiu, C.-C. (2019). Phytochemical naphtho[1,2-b] furan-4,5-dione induced topoisomerase II-mediated DNA damage response in human non-small-cell lung cancer. *Phytomedicine*, *54*, 109–119. https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.06.025

Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2017). ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends in Molecular Medicine*, *23*(5), 411–429. https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2017.03.004

Collison, A., Foster, P. S., & Mattes, J. (2009). Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *36*(11), 1049–1053. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05258.x

Cunningham, D., & You, Z. (2015). *In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research*. https://doi.org/10.14440/jbm.2015.63

Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (1996). Free radicals and neuronal cell death. *Cell death and differentiation*, *3*(1), 71–78.

de Campos-Nebel, M., Larripa, I., & González-Cid, M. (2010). Topoisomerase II-Mediated DNA Damage Is Differently Repaired during the Cell Cycle by Non-Homologous End Joining and Homologous Recombination. *PLoS ONE*, *5*(9), e12541. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012541

de Sena Pereira, V. S., Silva de Oliveira, C. B., Fumagalli, F., da Silva Emery, F., da Silva, N. B., & de Andrade-Neto, V. F. (2016). Cytotoxicity, hemolysis and in vivo acute toxicity of 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Toxicology Reports*, *3*, 756–762. https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2016.09.007

DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism*, *7*(1), 11–20. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002

deCathelineau, A. M., & Henson, P. M. (2003). The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays in biochemistry*, *39*, 105–117. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585077

DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, *29*(2), 309–316. https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6

Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P., & May, W. S. (2001). Novel Role for JNK as a Stress-activated Bcl2 Kinase. *Journal of Biological Chemistry*,

276(26), 23681–23688. https://doi.org/10.1074/jbc.M100279200

Deniz, N. G., Ibis, C., Gokmen, Z., Stasevych, M., Novikov, V., Komarovska-Porokhnyavets, O., … Ulukaya, E. (2015). Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Antioxidant and Cytotoxic Activity of Heteroatom-Substituted 1,4-Naphtho- and Benzoquinones. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, *63*(12), 1029–1039. https://doi.org/10.1248/cpb.c15-00607

Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, *24*(17), 2909–2915. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208618

Drake, J. M., Strohbehn, G., Bair, T. B., Moreland, J. G., & Henry, M. D. (2009). ZEB1 Enhances Transendothelial Migration and Represses the Epithelial Phenotype of Prostate Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(8), 2207–2217. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-10-1076

El-Najjar, N., Gali-Muhtasib, H., Ketola, R. A., Vuorela, P., Urtti, A., & Vuorela, H. (2011). The chemical and biological activities of quinones: Overview and implications in analytical detection. *Phytochemistry Reviews*, *10*(3), 353–370. https://doi.org/10.1007/s11101-011-9209-1

Erkisa, M., Karakas, D., & Ulukaya, E. (2019). Cancer Stem Cells: Root of the Evil. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, *24*(1), 69–87. https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2019029512

Ertoy Baydar, D. (2017). *Prostat Kanser Patolojisi*. https://doi.org/10.5152/trs.2017.530

Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, *92*(3), 329–333. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.025

Finkel, E. (2001). The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science (New York, N.Y.)*, *292*(5517), 624–626.

Fujita, K., & Nonomura, N. (2018). Role of Androgen Receptor in Prostate

Cancer: A Review. *The World Journal of Men's Health*, *36*. https://doi.org/10.5534/wjmh.180040

Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*, *14*(10), 1014–1022. https://doi.org/10.1038/ni.2703

Geiger, B., & Yamada, K. M. (2011). Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(5), a005033–a005033. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005033

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, *55*(3), 178–194.

Ghosh, S. K., Ganta, A., & Spanjaard, R. A. (2018). Discovery and cellular stress pathway analysis of 1,4-naphthoquinone derivatives with novel, highly potent broad-spectrum anticancer activity. *Journal of Biomedical Science*, *25*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0408-6

Gil, J., Almeida, S., Oliveira, C. R., & Rego, A. C. (2003). Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *35*(11), 1500–1514. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2003.08.022

Grant, C. M., & Kyprianou, N. (2013). Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Translational andrology and urology*, *2*(3), 202–211. https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.04

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

Gültekin, M., & Boztaş, G. (2014). *Türkiye Kanser İstatistikleri*. Tarihinde adresinden erişildi https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2009kanseraporu-1.pdf

Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *Turkiye Klinikleri*, *27*, 763–767.

Hafeez, B. Bin, Zhong, W., Fischer, J. W., Mustafa, A., Shi, X., Meske, L., … Verma, A. K. (2013). Plumbagin, a medicinal plant (*lumbago zeylanica*)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. *Molecular Oncology*, *7*(3), 428–439. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.12.001

Han, J., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., & Rabinowich, H. (2006). *Interrelated Roles for Mcl-1 and BIM in Regulation of TRAIL-mediated Mitochondrial Apoptosis* *. https://doi.org/10.1074/jbc.M510349200

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Harbour, J. W., & Dean, D. C. (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature Cell Biology*, *2*(4), E65–E67. https://doi.org/10.1038/35008695

Haupt, S., Raghu, D., & Haupt, Y. (2016). Mutant p53 Drives Cancer by Subverting Multiple Tumor Suppression Pathways. *Frontiers in oncology*, *6*, 12. https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00012

Hoffman, B., & Liebermann, D. A. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*, *27*(50), 6462–6472. https://doi.org/10.1038/onc.2008.312

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., … Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8–independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, *1*(6), 489–495. https://doi.org/10.1038/82732

Horwich, A., Hugosson, J., de Reijke, T., Wiegel, T., Fizazi, K., Kataja, V., … Wiegel, T. (2013). Prostate cancer: ESMO Consensus Conference Guidelines 2012. *Annals of Oncology*, *24*(5), 1141–1162. https://doi.org/10.1093/annonc/mds624

Hüttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., & Doan, J. W. (2007). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et biophysica acta*, *1773*(12), 1701–1720. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18240421

Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, *2*(4), 277–288. https://doi.org/10.1038/nrc776

Jardim, G. A. M., Guimarães, T. T., Pinto, M. do C. F. R., Cavalcanti, B. C., de Farias, K. M., Pessoa, C., … da Silva Júnior, E. N. (2015). Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. *MedChemComm*, *6*(1), 120–130. https://doi.org/10.1039/C4MD00371C

Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, *23*(5), 537–548. https://doi.org/10.1101/gad.1756509

Jones, V. S., Huang, R.-Y., Chen, L.-P., Chen, Z.-S., Fu, L., & Huang, R.-P. (2016). Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1865*(2), 255–265. https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2016.03.005

Jouan-Lanhouet, S., Arshad, M. I., Piquet-Pellorce, C., Martin-Chouly, C., Le Moigne-Muller, G., Van Herreweghe, F., … Dimanche-Boitrel, M.-T. (2012). TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death & Differentiation*, *19*(12), 2003–2014. https://doi.org/10.1038/cdd.2012.90

Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*, *9*(4), 239–252. https://doi.org/10.1038/nrc2618

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, *119*(6), 1420–1428. https://doi.org/10.1172/JCI39104

Kanaan, Y. M., Das, J. R., Bakare, L., Enwerem, N. M., Berhe, S., Beyene, D., … Copeland, R. L. (2009). Biological evaluation of 23-dichloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone as an anti-breast cancer agent. *Anticancer Research*, *29*(1), 191–199.

Karaboz, İ., Kayar, E., & Akar, S. (2008). *Flow Sitometri ve Kullanım Alanları*.

Karakaş, D., Akar, R. O., Gökmen, Z., Denİz, N. G., & Ulukaya, E. (2019). *A novel 1 , 4-naphthoquinone-derived compound induces apoptotic cell death in breast*

cancer cells. 1–8. https://doi.org/10.3906/biy-1901-19

Kazerounian, S., Yee, K. O., & Lawler, J. (2008). Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(5), 700–712. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7486-z

Kennedy, S., DiCesare, J. C., & Sheaff, R. J. (2011). Topoisomerase I/II inhibition by a novel naphthoquinone containing a modified anthracycline ring system. *Biochemical and biophysical research communications*, *408*(1), 94–98. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.126

Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, *36*(17), 5678–5694. https://doi.org/10.1093/nar/gkn550

Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, *37*(7), 8471–8486. https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9

Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(7), 393–405. https://doi.org/10.1038/nrm4007

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., … Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, *27*(2–3), 95–125. https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007

Kumar, B. S., Ravi, K., Verma, A. K., Fatima, K., Hasanain, M., Singh, A., … Negi, A. S. (2017). Synthesis of pharmacologically important naphthoquinones and anticancer activity of 2-benzyllawsone through DNA topoisomerase-II inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *25*(4), 1364–1373. https://doi.org/10.1016/J.BMC.2016.12.043

Laster, S. M., Wood, J. G., & Gooding, L. R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *141*(8), 2629–2634.

Liew, K., Yong, P. V. C., Lim, Y. M., Navaratnam, V., & Ho, A. S. H. (2014). 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicology in Vitro*, *28*(3), 335–339. https://doi.org/10.1016/J.TIV.2013.11.008

Linja, M. J., Savinainen, K. J., Saramäki, O. R., Tammela, T. L., Vessella, R. L., & Visakorpi, T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*, *61*(9), 3550–3555. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325816

Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *New England Journal of Medicine*, *370*(5), 455–465. https://doi.org/10.1056/NEJMra1310050

Liu, C., Shen, G. N., Luo, Y. H., Piao, X. J., Jiang, X. Y., Meng, L. Q., … Jin, C. H. (2018). Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROS-mediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *96*(November 2017), 9–19. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.01.004

Lu-Yao, G. L., Albertsen, P. C., Moore, D. F., Shih, W., Lin, Y., DiPaola, R. S., … Yao, S.-L. (2009). Outcomes of Localized Prostate Cancer Following Conservative Management. *JAMA*, *302*(11), 1202. https://doi.org/10.1001/jama.2009.1348

Majiene, D., Kuseliauskyte, J., Stimbirys, A., & Jekabsone, A. (2019). Comparison of the Effect of Native 1,4-Naphthoquinones Plumbagin, Menadione, and Lawsone on Viability, Redox Status, and Mitochondrial Functions of C6 Glioblastoma Cells. *Nutrients*, *11*(6), 1294. https://doi.org/10.3390/nu11061294

Mariño, G., & Kroemer, G. (2013). Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Research*, *23*(11), 1247–1248. https://doi.org/10.1038/cr.2013.115

Martini, F., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B., Ober, W. C., & Garrison, C. W. (2008). *Human anatomy.* Benjamin-Cummings.

Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., & Márquez, J. (2012). Oxidative

stress in apoptosis and cancer: an update. *Archives of Toxicology*, *86*(11), 1649–1665. https://doi.org/10.1007/s00204-012-0906-3

McCall, R., Miles, M., Lascuna, P., Burney, B., Patel, Z., Sidoran, K. J., … Arambula, J. F. (2017). Dual targeting of the cancer antioxidant network with 1,4-naphthoquinone fused Gold(i) N-heterocyclic carbene complexes. *Chemical Science*, *8*(9), 5918–5929. https://doi.org/10.1039/C7SC02153D

Medina, C. B., & Ravichandran, K. S. (2016). Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes. *Cell Death & Differentiation*, *23*(6), 979–989. https://doi.org/10.1038/cdd.2016.13

Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, *6*(12), 924–935. https://doi.org/10.1038/nrc2013

Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., … Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *66*(4), 271–289. https://doi.org/10.3322/caac.21349

Mohler, J. L., Antonarakis, E. S., Armstrong, A. J., Victor, A. D., Davis, B. J., Dorff, T., … Tward, J. (2019). *NCCN Clinical Guidelines in Oncology, Prostate Cancer, Version 2.2019*. Tarihinde adresinden erişildi https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf

Moon, S.-H., Nguyen, T.-A., Darlington, Y., Lu, X., & Donehower, L. A. (2010). Dephosphorylation of γ-H2AX by WIP1: An important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control. *Cell Cycle*, *9*(11), 2092–2096. https://doi.org/10.4161/cc.9.11.11810

Motulsky, H. (1999). *Analyzing Data with GraphPad Prism*.

Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., & Johansson, C. C. (2010). Regulatory T Cells in Cancer. Içinde *Advances in cancer research* (C. 107, ss. 57–117). https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)07003-X

Munday, R., Smith, B. L., & Fowke, E. A. (1991). Haemolytic activity and

nephrotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone in rats. *Journal of applied toxicology : JAT*, *11*(2), 85–90.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, *8*(8), 618–631. https://doi.org/10.1038/nrc2444

Nagata, S. (2005). DNA Degradation in Development and Programmed Cell Death. *Annual Review of Immunology*, *23*(1), 853–875. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811

Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, *36*(1). https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010

Nagata, S., Hanayama, R., & Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell*, *140*(5), 619–630. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.014

Nazarov, I. B., Smirnova, A. N., Krutilina, R. I., Svetlova, M. P., Solovjeva, L. V, Nikiforov, A. A., … Tomilin, N. V. (2003). Dephosphorylation of histone gamma-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. *Radiation research*, *160*(3), 309–317.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(3), 220–228. https://doi.org/10.1038/nrm2858

Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, *166*(1), 21–45. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001

Nitiss, J. L., Soans, E., Berk, J., Seth, A., Mishina, M., & Nitiss, K. C. (2012). *Repair of Topoisomerase II-Mediated DNA Damage: Fixing DNA Damage Arising from a Protein Covalently Trapped on DNA*. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-

0323-4_18

Novais, J. S., Moreira, C. S., Silva, A. C. J. A., Loureiro, R. S., Sá Figueiredo, A. M., Ferreira, V. F., … da Rocha, D. R. (2018). Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram-negative bacteria in biofilms. *Microbial Pathogenesis*, *118*, 105–114. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.024

Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, *194*(4260), 23–28. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840

Orellana-Serradell, O., Herrera, D., Castellon, E., & Contreras, H. (2018). The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. *Asian Journal of Andrology*, *20*(3), 294. https://doi.org/10.4103/aja.aja_61_17

Ostrand-Rosenberg, S., & Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology*, *182*(8), 4499–4506. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740

Ourique, F., Kviecinski, M. R., Felipe, K. B., Correia, J. F. G., Farias, M. S., Castro, L. S. E. P. W., … Pedrosa, R. C. (2015). DNA Damage and Inhibition of Akt Pathway in MCF-7 Cells and Ehrlich Tumor in Mice Treated with 1,4-Naphthoquinones in Combination with Ascorbate. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2015*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2015/495305

Ourique, F., Kviecinski, M. R., Zirbel, G., Castro, L. S. E. P. W., Gomes Castro, A. J., Mena Barreto Silva, F. R., … Pedrosa, R. C. (2016). In vivo inhibition of tumor progression by 5 hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *477*(4), 640–646. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.06.113

Palit, S., Kar, S., Sharma, G., & Das, P. K. (2015). Hesperetin Induces Apoptosis in Breast Carcinoma by Triggering Accumulation of ROS and Activation of ASK1/JNK Pathway. *Journal of Cellular Physiology*, *230*(8), 1729–1739. https://doi.org/10.1002/jcp.24818

Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *282*(5), C947–C970. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001

Perona, R. (2006). Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *8*(2), 77–82. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632420

Pingaew, R., Prachayasittikul, V., Worachartcheewan, A., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., & Prachayasittikul, V. (2015). Novel 1,4-naphthoquinone-based sulfonamides: Synthesis, QSAR, anticancer and antimalarial studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *103*, 446–459. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.001

Prachayasittikul, V., Pingaew, R., Worachartcheewan, A., Sitthimonchai, S., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., … Prachayasittikul, V. (2017). Aromatase inhibitory activity of 1,4-naphthoquinone derivatives and QSAR study. *EXCLI journal*, *16*, 714–726. https://doi.org/10.17179/excli2017-309

Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, *387*, 95–105. https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2016.03.042

Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, *141*(1), 39–51. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014

Raffo, A. J., Perlman, H., Chen, M. W., Day, M. L., Streitman, J. S., & Buttyan, R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer research*, *55*(19), 4438–4445. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7671257

Rakiman, I., Chinnadurai, M., Baraneedharan, U., Paul, S. F. D., & Venkatachalam, P. (2008). γ-H2AX assay : a technique to quantify DNA double strand breaks. *Advanced Biotechnology*, *7*(1), 39–41.

Reese, S., Vidyasagar, A., Jacobson, L., Acun, Z., Esnault, S., Hullett, D., … Djamali, A. (2010). The Pin 1 inhibitor juglone attenuates kidney fibrogenesis via Pin 1-independent mechanisms in the unilateral ureteral occlusion model. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, *3*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1755-1536-3-1

Rivera-Perez, J., Monter-Vera, M., Barrientos-Alvarado, C., Toscano-Garibay, J., Cuesta-Mejïas, T., & Flores-Estrada, J. (2017). Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies. *Oncology Letters*, *15*(1), 1072–1078. https://doi.org/10.3892/ol.2017.7374

Ryan, C. J., Smith, M. R., de Bono, J. S., Molina, A., Logothetis, C. J., de Souza, P., … COU-AA-302 Investigators. (2013). Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, *368*(2), 138–148. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209096

Rysavy, N. M., Shimoda, L. M. N., Dixon, A. M., Speck, M., Stokes, A. J., Turner, H., & Umemoto, E. Y. (2014). Beyond apoptosis: the mechanism and function of phosphatidylserine asymmetry in the membrane of activating mast cells. *Bioarchitecture*, *4*(4–5), 127–137. https://doi.org/10.1080/19490992.2014.995516

Sakunrangsit, N., Kalpongnukul, N., Pisitkun, T., & Ketchart, W. (2016). Plumbagin Enhances Tamoxifen Sensitivity and Inhibits Tumor Invasion in Endocrine Resistant Breast Cancer through EMT Regulation. *Phytotherapy Research*, *30*(12), 1968–1977. https://doi.org/10.1002/ptr.5702

Sameni, S., & Hande, M. P. (2016). Plumbagin triggers DNA damage response, telomere dysfunction and genome instability of human breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *82*, 256–268. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.05.007

Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., & Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, *3*(4), 346–352. https://doi.org/10.1038/35070019

Segawa, K., & Nagata, S. (2015). An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology*, *25*(11), 639–650.

https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003

Shaffer, S. M., Dunagin, M. C., Torborg, S. R., Torre, E. A., Emert, B., Krepler, C., … Raj, A. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature*, *546*(7658), 431–435. https://doi.org/10.1038/nature22794

Shammas, M. A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *14*(1), 28–34. https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834121b1

Shappley, W. V., Kenfield, S. A., Kasperzyk, J. L., Qiu, W., Stampfer, M. J., Sanda, M. G., & Chan, J. M. (2009). Prospective Study of Determinants and Outcomes of Deferred Treatment or Watchful Waiting Among Men With Prostate Cancer in a Nationwide Cohort. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(30), 4980–4985. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.2613

Sharma, A., Singh, K., & Almasan, A. (2012). Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. Içinde *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (C. 920, ss. 613–626). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_40

Shay, J. W., & Wright, W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *21*(6), 349–353. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.10.001

Shen, H.-M., & Liu, Z. (2006). JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(6), 928–939. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.056

Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*, *2*(2), 103–112. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204530

Shi, Y., Nikulenkov, F., Zawacka-Pankau, J., Li, H., Gabdoulline, R., Xu, J., … Selivanova, G. (2014). ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, *21*(4), 612–623. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.186

Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M., & Swartz, M. A. (2010). Induction of Lymphoidlike Stroma and Immune Escape by Tumors That Express the Chemokine CCL21. *Science*, *328*(5979), 749–752. https://doi.org/10.1126/science.1185837

Silva, A. J. M. da, Netto, C. D., Pacienza-Lima, W., Torres-Santos, E. C., Rossi-Bergmann, B., Maurel, S., … Costa, P. R. R. (2009). Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *20*(1), 176–182. https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000100026

Sinha, B. K., & Chignell, C. F. (1979). Binding mode of chemically activated semiquinone free radicals from quinone anticancer agents to DNA. *Chemico-Biological Interactions*, *28*(2–3), 301–308. https://doi.org/10.1016/0009-2797(79)90170-4

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., … Boyd, M. R. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107–1112. https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107

Sommerfeld, H. J., Meeker, A. K., Piatyszek, M. A., Bova, G. S., Shay, J. W., & Coffey, D. S. (1996). Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer research*, *56*(1), 218–222. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8548767

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., … Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, *95*(1), 29–39. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9778245

Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., & Brabletz, T. (2019). Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 102–112. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0196-y

Sun, W., & Yang, J. (2010). Functional mechanisms for human tumor suppressors. *Journal of Cancer*, *1*, 136–140. Tarihinde adresinden erişildi

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922055

Surh, C. D., & Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, *372*(6501), 100–103. https://doi.org/10.1038/372100a0

Susan, E. (2007). Apoptosis: A Reveiw of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 496–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

Tagoug, I., Chalon, A. S. De, & Dumontet, C. (2011). Inhibition of IGF-1 Signalling Enhances the Apoptotic Effect of AS602868, an IKK2 Inhibitor, in Multiple Myeloma Cell Lines. *PLOS ONE*, *6*(7), e22641. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0022641

Tewey, K. M., Chen, G. L., Nelson, E. M., & Liu, L. F. (1984). Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *The Journal of biological chemistry*, *259*(14), 9182–9187.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *65*(2), 87–108. https://doi.org/10.3322/caac.21262

Tsang, N. Y., Chik, W. I., Sze, L. P., Wang, M.-Z., Tsang, S. W., & Zhang, H.-J. (2019). The Use of Naphthoquinones and Furano-naphthoquinones as Antiinvasive Agents. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(38), 5007–5056. https://doi.org/10.2174/0929867324666171006131927

Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, *10*(2), 116–129. https://doi.org/10.1038/nrc2780

Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, *29*(6), 468–480. https://doi.org/10.1002/cbf.1774

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation.

Science, *324*(5930), 1029–1033. https://doi.org/10.1126/science.1160809

Vásquez, D. R., Verrax, J., Valderrama, J. A., & Calderon, P. B. (2012). Aminopyrimidoisoquinolinequinone (APIQ) redox cycling is potentiated by ascorbate and induces oxidative stress leading to necrotic-like cancer cell death. *Investigational New Drugs*, *30*(3), 1003–1011. https://doi.org/10.1007/s10637-011-9661-1

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Craen, M. Van de, Declercq, W., Fiers, W., & Vandenabeele, P. (1998). Dual Signaling of the Fas Receptor: Initiation of Both Apoptotic and Necrotic Cell Death Pathways. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(5), 919–930. https://doi.org/10.1084/JEM.188.5.919

Verma, R. P. (2006). Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: a QSAR study. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, *6*(5), 489–499.

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112–1116. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179

Wang, Y., Luo, Y. H., Piao, X. J., Shen, G. N., Meng, L. Q., Zhang, Y., … Jin, C. H. (2019). Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce reactive oxygen species-mediated apoptosis in liver cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *19*(3), 1654–1664. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9785

Wang, Y., Luo, Y., Piao, X., Shen, G., Meng, L., Zhang, Y., … Jin, C. (2018). Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce reactive oxygen species-mediated apoptosis in liver cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *19*(3), 1654–1664. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9785

Wei, Y., Sinha, S. C., & Levine, B. (2008). Dual Role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy*, *4*(7), 949–951. https://doi.org/10.4161/auto.6788

Wein, A. J., Kavoussi, L. R., Campbell, M. F. (Meredith F., & Walsh, P. C. (2012). *Campbell-Walsh urology*.

Wellington, K. W. (2015). Understanding cancer and the anticancer activities

of naphthoquinones – a review. *RSC Advances*, *5*(26), 20309–20338. https://doi.org/10.1039/C4RA13547D

Wellington, K. W., Kolesnikova, N. I., Hlatshwayo, V., Saha, S. T., Kaur, M., & Motadi, L. R. (2019). Anticancer activity, apoptosis and a structure–activity analysis of a series of 1,4-naphthoquinone-2,3-bis-sulfides. *Investigational New Drugs*. https://doi.org/10.1007/s10637-019-00775-7

Wiechelman, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*, *175*(1), 231–237. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3245570

Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*, *25*(2), 85–101. https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009

Wu, X., Gong, S., Roy-Burman, P., Lee, P., & Culig, Z. (2013). *Current mouse and cell models in prostate cancer research*. https://doi.org/10.1530/ERC-12-0285

Yamamoto, K., Ichijo, H., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and cellular biology*, *19*(12), 8469–8478. https://doi.org/10.1128/mcb.19.12.8469

Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*, *14*(6), 818–829. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.009

Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF-β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, *31*(6), 220–227. https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002

Yang, S. Y., Miah, A., Pabari, A., & Winslet, M. (2011). Growth Factors and their receptors in cancer metastases. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, *16*, 531–538. Tarihinde adresinden erişildi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196186

Yarden, Y., & Ullrich, A. (1988). Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry*, *57*(1), 443–478. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.002303

Yeung, K. T., & Yang, J. (2017). Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular Oncology*, *11*(1), 28–39. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12017@10.1002/(ISSN)1878-0261.TOP-CITED-19

Yılmaz, S., & Devran, Z. (2003). *POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) VE BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE YAYGIN UYGULAMALARI*.

Yoon, S., Park, S. J., Han, J. H., Kang, J. H., Kim, J., Lee, J., … Chwae, Y.-J. (2014). Caspase-dependent cell death-associated release of nucleosome and damage-associated molecular patterns. *Cell Death & Disease*, *5*(10), e1494–e1494. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.450

Yuan, J, Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, *75*(4), 641–652.

Yuan, Junying, Najafov, A., & Py, B. F. (2016). Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell*, *167*(7), 1693–1704. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.047

Zhang, Q., Dong, J., Cui, J., Huang, G., Meng, Q., & Li, S. (2018). Cytotoxicity of Synthesized 1,4-Naphthoquinone Oxime Derivatives on Selected Human Cancer Cell Lines. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *66*(6), 612–619. https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00013

Zumsteg, A., & Christofori, G. (2009). Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Current Opinion in Oncology*, *21*(1), 60–70. https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32831bed7e