



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PC-3 ve LNCaP PROSTAT KANSERİ HÜCRE
HATLARINDA FERULİK ASİTİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Araştırma Görevlisi
Canan EROĞLU**

**Aralık 2014
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PC-3 ve LNCaP PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
FERULİK ASİTİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Araştırma Görevlisi
Canan EROĞLU**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yavuz DODURGA

Denizli, 2014

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Canan EROĞLU tarafından Doç. Dr. Yavuz DODURGA yönetiminde hazırlanan “**PC-3 ve LNCaP Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Ferulik Asitin Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ercan KURAR
(Necmettin Erbakan Üniversitesi)



Danışman: Doç. Dr. Yavuz DODURGA
(Pamukkale Üniversitesi)




Üye: Prof. Dr. Hakan AKÇA
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
(Pamukkale Üniversitesi)

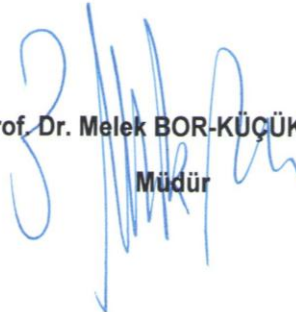


Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

08/11/15 tarih ve 0110 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Melek BOR-KÜÇÜKATAY

Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Canan EROĞLU

İmza :

ÖZET

PC-3 ve LNCaP PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA FERULİK ASİTİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Canan EROĞLU
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Yavuz DODURGA

Aralık 2014, 103 sayfa

Prostat kanserinin altında yatan genetik değişimler ve olası sinyal yolları ile ilgili çeşitli çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve yeni tedavi yöntemleri aranmaktadır. Bu çalışmada, PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında çeşitli besinlerde bulunan, fenolik bir bileşik olan ferulik asitin (FA) hücre döngüsü sinyal iletimi ve apoptoz yollarında gen ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ferulik asitin hücre canlılığına etkisi XTT yöntemi ile belirlenmiş, IC₅₀ dozu PC-3 hücre hattında 48. saatte 300µM, LNCaP hücre hattında ise 48. saatte 500µM olarak saptanmıştır.

Ferulik asitin PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında hücre döngüsü ve apoptoz yollarındaki gen ekspresyonu üzerine etkileri gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. Ferulik asitin PC-3 hücre hattında ATR, ATM, CDKN1A, CDKN1B, E2F4, RB1, TP53, BIK, BAX, CASP1, CASP2, CYCS gen ekspresyonlarında anlamlı artışa, CCND1, CCND2, CCND3, CDK2, CDK4, CDK6, BCL2 gen ekspresyonlarında ise anlamlı azalışa neden olduğu görülmüştür. LNCaP hücre hattında ise CDKN1B, CDKN2B, CASP1, CASP2, CASP8, CYCS, FAS, FASLG, TRADD gen ekspresyonlarında anlamlı artış, CCNF, CCNT1, CDK6, CDK4, BCL2, XIAP gen ekspresyonlarında anlamlı azalış bulunmuştur. Çalışmada bu hücre hatlarında anlamlı değişim görülen bazı genlerin protein değişimleri western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. FA'nın apoptotik etkileri TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiş, PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında sırasıyla 2.5±0.47 ve 4.7±2 kat apoptozu indüklediği gözlenmiştir. PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında sırasıyla FA'nın invazyonu %33.6±0.5 ve %23±1.9, koloni oluşumunu ise %38±0.82 ve %40±1.7 oranında baskıladığı görülmüştür. Sonuç olarak, bulgulara göre PC-3 hücre hattında FA'nın hücre döngüsünü durdurabileceği, LNCaP hücre hattında ise apoptoza neden olabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri, Ferulik Asit, Hücre Döngüsü, Apoptoz.

Bu çalışma, ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT**THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FERULIC ACID ON THE PC-3 and LNCaP PROSTATE CANCER CELL LINES**

Eroğlu, Canan
M.Sc. Thesis in Medical Biology
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Yavuz DODURGA

December 2014, 103 pages

Studies on genetic changes underlying prostate cancer and the possible signaling pathways are getting increased day by day and new treatment methods are being searched for. The present study aims to investigate the effect of ferulic acid, a phenolic compound, found in various aliments, in the PC-3 and LNCaP prostate cancer cell lines, on cell cycle signal transmission and gene expression in apoptosis pathways. The effect of ferulic acid on cell viability was determined via XTT method and the IC₅₀ dose of ferulic acid in PC-3 cell line was found to be 300µM in the 48th hour and in LNCaP cell line it was found to be 500µM in the 48th hour.

The effect ferulic acid in PC-3 and LNCaP cell lines on cell cycle and gene expression in the apoptosis pathways were analised with Real-Time PCR. It was observed that ferulic acid in PC-3 cell line caused a significant increase in the gene expressions of ATR, ATM, CDKN1A, CDKN1B, E2F4, RB1, TP53, BIK, BAX, CASP1, CASP2 and CYCS, and a significant decrease in the gene expressions of CCND1, CCND2, CCND3, CDK2, CDK4, CDK6 and BCL2. On the other hand, in LNCaP cell line, a significant increase was seen in the gene expressions of CDKN1B, CDKN2B, CASP1, CASP2, CASP8, CYCS, FAS, FASLG, TRADD and a decrease in the gene expressions of CCNF, CCNT1, CDK6, CDK4, BCL2 and XIAP. In our study, in these cell lines, protein changes of some genes on which a significant change was observed were evaluated with western blot method. The apoptotic effects of FA were evaluated with TUNEL method and it was observed that FA in PC-3 and LNCaP cell lines induced 2.5±0.47 and 4.7±2 fold apoptosis respectively. Also, it was found that FA in PC-3 and LNCaP cell lines suppressed the invasion in the ratios of %33.6±0.5 and %23±1.9 respectively while it surpressed the colony formation in the ratios of %38±0.82 and %40±1.7 respectively. In conclusion, it is considered that FA in PC-3 cell line may lead to cell cycle arrest while it may cause apoptosis in LNCaP cell line.

Key Words: Prostate cancer, Ferulic Acid, Cell Cycle, Apoptosis.

This study was supported by Instructor Training Program (ÖYP).

TEŞEKKÜR

Akademik hayata gözümü açtığım andan itibaren bilime bakış açımaya yön veren, her zaman her konuda desteğini esirgemeyen sayın hocam ve danışmanım Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya,

Her zaman güler yüzü ile bana mutluluk veren ve her konuda yanımda olduğunu hissettiğim bilimsel deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan sayın hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya,

Yüksek lisans eğitimi boyunca bilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hakan AKÇA başta olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki hocalarıma,

Çok yeni tanıdığım benim için mesafelere aldırış etmeyen tez jürime katılımından dolayı çok mutlu olduğum sayın hocam Doç. Dr. Ercan KURAR'a,

Deneylerimin her aşamasında yanımda olan yardımlarını eksik etmeyen arkadaşım Arş. Gör. Mücahit SEÇME'ye,

Her zaman her konuda yanımda hissettiğim mesafelerin ayıramadığı Denizli'nin bana hediyesi olan canım arkadaşım Pelin ATMACA'ya,

Pamukkale Üniversitesi'ne geldiğim andan beri alışmakta zorlanmaya vakit bırakmayan değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Hatice ORUÇ ve Araş. Gör. Dr. Nazlı ÇİL'e,

Beni canlarından çok sevdiğine emin olduğum beni bu günlere getiren desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım babam Seyfettin EROĞLU, annem Azize EROĞLU'ya,

Her başım sıkıştığında dile getirmeme bile gerek kalmadan yetişen ve onlarla huzur bulduğum çok kıymetli ablalarım, abime ve değerli ailelerine,

Çok Teşekkür Ederim...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Prostat Kanseri	6
2.2.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	9
2.2.1.1. Yaş	10
2.2.1.2. Irk	10
2.2.1.3. Aile Öyküsü.....	10
2.2.1.4. Hormonal Faktörler.....	11
2.2.1.5. Diyetel Faktörler.....	11
2.2.1.6. Sigara ve Alkol Kullanımı.....	11
2.2.1.7. Coğrafik Konum	12
2.2.2. Prostat Kanserinin Oluşumunda ve Progresyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	12
2.2.3. Prostat Kanserinde Belirti ve Semptomlar	15
2.2.4. Prostat Kanserinin Tanısı	16
2.2.4.1. Parmak ile Rektal Muayene (PRM).....	16
2.2.4.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA) Testi	16
2.2.4.3. Transrektal Ultrasonografi (TRUS)	16
2.2.4.4. Biyopsi	16
2.2.5. Prostat Kanseri Tedavisi	17
2.2.6. Prostat Kanserinin Derecelendirilmesi.....	17
2.2.6.1. Serum PSA seviyesi.....	17

2.2.6.2. Gleason Skorlaması	18
2.2.6.3. TNM sistemi.....	18
2.3. Ferulik Asit.....	19
2.4. Hücre Döngüsü.....	23
2.4.1. Siklin ve Siklin Bağımlı Kinaz Aileleri	24
2.4.2.Hücre Döngüsünün Kontrolü	25
2.4.2.1. G1 Kontrol Noktası	26
2.4.2.2. G2 Kontrol Noktası	26
2.4.2.3. M Kontrol Noktası	26
2.4.3. Hücre Döngüsü İnhibitörleri.....	27
2.4.3.1. CDK İnhibitörleri (CKI)	27
2.4.3.1.1. INK4/ ARF Ailesi.....	27
2.4.3.1.2. Cip/Kip (CDK İnhibitör Protein / Kinaz İnhibitör Protein) Ailesi.....	27
2.5. Apoptoz.....	28
2.5.1. Mitokondri/Sitokrom C Aracılı Hücre Ölümü (İntrinsik Yolak)	29
2.5.2. Ölüm Sinyalleri Aracılığı İle Hücre Ölümü (Ekstrinsik Yolak).....	29
2.6. Hücre Hatları	30
2.7. Hipotez	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1. Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	33
3.2. Ferulik Asit.....	35
3.3. Prostat Kanseri Model Hücre Hatlarının Oluşturulması	35
3.3.1. Hücre Hatlarının Dondurulması	36
3.3.2. Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi.....	36
3.3.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması	37
3.4. Ferulik Asitin Hücre Canlılığına Etkisinin Tayini	38
3.5. Hücre Döngüsü ve Apoptoz Gen Ekspresyonları.....	39
3.5.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu	39
3.5.2. cDNA Sentezi	40
3.5.3. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü.....	41
3.6. Protein Ekspresyon Düzeyinin Tayini.....	50
3.6.1. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini	50
3.6.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	51
3.6.3. Western Blot Analizi.....	52
3.7. Ferulik Asitin Apoptotik Etkiliğın Belirlenmesi.....	53
3.8. Hücrelerin İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi.....	54
3.9. Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi	54

3.10. İstatistiksel Analiz.....	55
4. BULGULAR	56
4.1. Ferulik Asitin IC ₅₀ Dozunun Belirlenmesi	56
4.2. Ferulik Asitin Hücre Döngüsü ve Apoptotik Yolak Genlerinin Ekspresyonları Üzerine Etkisi.....	57
4.2.1. Ferulik Asitin PC-3 Hücre Hattında Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi... 58	
4.2.2. Ferulik Asitin LNCaP Hücre Hattında Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi59	
4.3. Ferulik Asitin Protein Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	60
4.4. Ferulik Asitin Apoptoz Üzerine Etkisi.....	61
4.5. Ferulik Asitin Hücre İnvazyonuna Etkisi.....	62
4.6. Ferulik Asitin Koloni Oluşumuna Etkisi	64
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ.....	79
7. KAYNAKLAR	81
8. ÖZGEÇMİŞ	97
9. EKLER.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 1930-2010 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde erkekler arasında görülen kanser türlerine bağlı olarak ölüm oranları	4
Şekil 2.2 1930-2010 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlar arasında görülen kanser türlerine bağlı olarak ölüm oranları	5
Şekil 2.3 Prostatın anatomik yapısı	7
Şekil 2.4 Ferulik asitin kimyasal yapısı	20
Şekil 2.5 Hücre döngüsünün büyüme faktörleriyle düzenlenmesi	24
Şekil 2.6 Siklin ve siklin-bağımlı kinaz kompleksleri.....	25
Şekil 2.7 Hücre döngüsü kontrol noktaları	25
Şekil 2.8 INK4 ve Cip/Kip aileleri	28
Şekil 2.9 Apoptotik sinyal iletim yollarının basamakları	30
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan PC-3 (sol) ve LNCaP (sağ) hücre hatlarının genel görüntüsü	36
Şekil 3.2 XTT'nin formazana dönüşümü	38
Şekil 3.3 Lowry protein standart eğrisi	51
Şekil 4.1 Ferulik asitin PC-3 hücre canlılığına etkisi	56
Şekil 4.2 Ferulik asitin LNCaP hücre canlılığına etkisi	57
Şekil 4.3 PC-3 hücre hattında ferulik asitin CDK4 ve BCL2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi	60
Şekil 4.4 LNCaP hücre hattında ferulik asitin CDK4 ve BCL2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi	61
Şekil 4.5 PC-3 hücre hattında kontrol (sol) ve doz grubu (sağ) hücrelerin TUNEL testi sonuçlarının mikroskop görüntüleri	62
Şekil 4.6 LNCaP hücre hattında kontrol (sol) ve doz grubu (sağ) hücrelerin TUNEL testi sonuçlarının mikroskop görüntüleri	62
Şekil 4.7 PC-3 kontrol ve FA doz invazyon fotoğrafları	63
Şekil 4.8 LNCaP kontrol ve FA doz invazyon fotoğrafları.....	63
Şekil 4.9 Ferulik asitin PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında invazyona etkisi.....	64
Şekil 4.10 PC-3 kontrol ve FA doz koloni fotoğrafları.....	65
Şekil 4.11 LNCaP kontrol ve FA doz koloni fotoğrafları	65
Şekil 4.12 FA'nın PC-3 ve LNCaP hücre hatlarının koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi.....	66

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Türkiye’de yıllara ve cinsiyete göre toplam kanser insidansı.....	5
Tablo 2.2 Türkiye’de yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı	6
Tablo 2.3 Türkiye’de yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı	6
Tablo 2.4 Amerika Birleşik Devletleri’nde cinsiyetlere göre 2014 yılı için farklı tipteki kanser olgularının tahmini sayıları ve ölüm oranları	8
Tablo 2.5 Prostat kanseri için TNM evrelendirme sistemi	18
Tablo 2.6 Ferulik asitin genel özellikleri	19
Tablo 2.7 Ferulik asit ve türevlerinin tedavi edici etkilerinin ana etki mekanizmalarının özeti.....	22
Tablo 2.8 PC-3 ve LNCaP hücre hatlarının özellikleri	31
Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve malzemeler	33
Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	34
Tablo 3.3 cDNA sentezinin ilk aşaması	40
Tablo 3.4 cDNA sentezinin ikinci aşaması.....	40
Tablo 3.5 Hücre döngüsünde görevli genler ve tanımlamaları	41
Tablo 3.6 Apoptozda görevli genler ve tanımlamaları	41
Tablo 3.7 Hücre döngüsü genlerinin plate düzeni.....	44
Tablo 3.8 Apoptoz genlerinin plate düzeni.....	47
Tablo 3.9 Ekspresyon analizi için gerekli karışımın hazırlanması	48
Tablo 3.10 Gerçek Zamanlı PZR Koşulları	48
Tablo 3.11 Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonlarının hazırlanması	51
Tablo 4.1 RNA miktarı ve saflığı.....	57
Tablo 4.2 Ferulik asitin PC-3 hücre hattında hücre döngüsü gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler	58
Tablo 4.3 Ferulik asitin PC-3 hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler	59
Tablo 4.4 Ferulik asitin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler	59
Tablo 4.5 Ferulik asitin LNCaP hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler	60
Tablo 4.6 Ferulik asitin PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında apoptotik etkileri	61
Tablo 4.7 PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında ferulik asitin invazyon kapasitesine etkisi ..	63

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
AR	Androjen Reseptörü
BAX	BCL2-İlişkili X Protein
BCL2	B-hücre CLL/Lenfoma 2
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BIK	BCL2-İlişki Öldürücü (Apoptoz-indükleyici)
CASP1	Kaspaz 1, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP2	Kaspaz 2, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP3	Kaspaz 3, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP4	Kaspaz 4, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP5	Kaspaz 5, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP6	Kaspaz 6, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP7	Kaspaz 7, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP8	Kaspaz 8, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CASP9	Kaspaz 9, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
CAT	Katalaz
CCNA2	Siklin A2
CCNB1	Siklin B1
CCND1	SiklinD1
CCND2	SiklinD2
CCND3	SiklinD3
CDK2	Siklin Bağımlı Kinaz 2
CDK4	Siklin Bağımlı Kinaz 4
CDK6	Siklin Bağımlı Kinaz 6
CDK7	Siklin Bağımlı Kinaz 7
CDKN1A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A
CDKN1B	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
CDKN2B	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2B
cDNA	Komplementer Deoksiribonukleik Asid
COX-2	Siklooksijenaz 2
CRP2	C Reaktif Protein 2
CYCS	Sitokrom c
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E2F4	E2F Transkripsiyon Faktör 4, p107/p130-Bağlayıcı
ERK1/2	Ekstraselüler Sinyal İlişkili Kinaz 1/2
FA	Ferulik Asit
FAS	Fas (TNF Reseptör Süperailisi, Üye 6)
FASLG	Fas Ligand (TNF Süperailisi, Üye 6)
FBS	Fötal Sığır Serumumu
GST-pi	Glutasyon-S-transferaz-pi
H₂O	Su
HER2/ neu	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2
HO-1	Heme-oksijenaz
Hsp70	Isı Şok Proteini 70

IC₅₀	Öldürücü Doz 50
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IGF-BP3	IGF Bağlayıcı Protein
IκB	NFκB İnhibitörü
IKK	IκB Kinaz
IL-6	İnterlökin-6
IL-1β	İnterlökin 1β
KGF	Keratinosit Büyüme Faktörü
MAPK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
NFκB	Nükleer Faktör- Kappa B
NO	Nitrik Oksit
ng	Nanogram
ODC1	Ornitin Dekarboksilaz Geni Şifreleyen
PI3K	Fosfotidil İnozitol-3 Kinaz
PRM	Parmak ile Rektal Muayene
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RABGAP1	RAB <i>GTP_{αz}</i> Aktive Edici Protein 1
RB 1	Retinoblastoma 1
RNA	Ribonükleik Asid
RPM	Dakikada Devir Sayısı
SMC1L1	Kromozoml Yapısal Koruyan 1
sn	Saniye
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT3	Sinyal İletim ve Transkripsiyon Aktivatörü-3
TRUS	Transrektal Ultrasonografi
THD	Tiazolidinedion
TP53	Tümör Protein p53
TRADD	TNFRSF1A-İlişkili Ölüm Domain
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide
XIAP	X-bağlantılı Apoptoz İnhibitörü
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalmasdır. Kanser günümüzde ölüm oranı yüksek olan sağlık sorunları arasında ön sıralarda yer almaktadır. Teknoloji ve bilimin ilerlemesi ile birlikte tanı olanaklarının ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi kanser vakalarının daha erken teşhis edilmesine imkan sağlamaktadır. Kanserde tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu rol oynamaktadır. Genetik ve epigenetik değişimler kanser gelişiminde önemlidir. Kanser kontrolsüz hücre büyümesi ve metastaz özellikleri ile karakterize edilmektedir (Montenegro vd 2014). Kanser ile ilgili yapılan çalışmalar ve moleküler gelişmeler sayesinde de tedavi yöntemleri gelişmekte ve daha az toksik olan tedaviler uygulanmaktadır.

Prostat kanseri, özellikle endüstrileşmiş ülkelerde görülen önemli bir sağlık sorunu olmakla birlikte erkeklerde, akciğer kanserinden sonra ikinci en sık kansere bağlı ölüm nedenidir. Prostat kanseri geç başlangıç yaşı, yavaş ilerlemesi, yüksek insidansı, tanımlanabilir preneoplastik lezyonlar ve risk gruplarından dolayı kemopreventif stratejiler bakımından da önemli bir hastalıktır (Szliszka ve Krol 2011, Cimino vd 2012). Prostat kanseri erkeklerin 70 yaşına kadar yaklaşık 8 erkekten birinin etkilendiği en yaygın kanser türüdür (Jemal vd 2011, Siegel vd 2013). Kemoterapi ve radyoterapi prostat kanseri için önemli tedavi seçenekleridir. Prostat kanseri tanısı için mevcut yöntemler, hastalığın spesifikliğı ve duyarlılığı için sınırlıdır ve daha olumlu prognoza sahip hastalar ile daha yüksek ölüm ve progresif hastalık riskine sahip hastaları ayırt edemeyebilir (Grubb vd 2008, Schroder vd 2009). Kanser tanısı erken konulsa da sık sık metastaz yapabilmektedir. Prostat kanseri metastaz yaptığında ilk 5 yıllık sağkalım oranı %32'lere düşmektedir (Chin ve Reiter 2004, Velcheti vd 2008). Androjen bağımsız prostat kanserinde prognoz kötüdür ve ortalama hayatta kalma süresi 7-12 aydır (Hussain vd 1994, Kantoff vd 1999).

Sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda insanların doğal antioksidan kaynağı olan meyve ve sebzeler, baharatlar ve bitkisel çaylara olan ilgisi artmıştır. Fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkileri nedeni ile sağlık üzerine birçok olumlu etkisi bulunmaktadır. Ayrıca bu bileşikler gıda kalite kontrol kriteri olarak da önem taşımaktadır (Saldamlı

2007). Bu bileşiklerin antiallerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik ve antiviral etkiye sahip olduğu yapılan birçok araştırma ile bulunmuştur (MacDougall 2002). Besinlerde bulunan fenolik bileşikler, genellikle kanser ve antienflamatuar hastalıklar ile ilgili zararlı oksidatif sũreçlerin inhibitörleri ve potansiyel antioksidanları olarak tanımlanırlar (Lee ve Lee 2006, Fresco vd 2009, Fresco vd 2010, Huang vd 2010). Ferulik asit de (4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit) sebze ve meyvelerde bol bulunan sağlık açısından yararlı fenolik bir bileşiktir (D'Archivio vd 2007). Piri, yulaf, kahve, turunçgiller, elma ve yabanmersininde bol miktarda bulunmaktadır (Clifford 1999). Ferulik asitin hem *in vivo* hem de *in vitro* deneysel çalışmalarda dũzenli hũcre bũyũmesi ve proliferasyonu, serbest radikalleri uzaklaştırması, sitoprotektif enzimleri uyarması ve sitotoksik sistemleri inhibe etmesi nedeniyle kanser tedavisinde potansiyel rol oynamaktadır. Klinik öncesi veriler kemoterapi veya radyoterapi sırasında ferulik asitin yardımcı madde olarak kullanılmasının yararlı olacağını göstermiştir (Hemaiswarya ve Doble 2013).

1.1. Amaç

Literatũr taraması yapıldığında, ferulik asitin prostat kanseri üzerine etkilerinin incelendiği az sayıda yayına rastlanmaktadır. Bu alışmada, PC-3 (androjen bağımsız prostat kanseri hũcre hattı) ve LNCaP (androjen bağımlı prostat kanseri hũcre hattı) prostat kanseri hũcre hatları üzerinde ferulik asitin hũcre dũngũsũ, apoptoz, invazyon ve koloni oluşturma kapasiteleri üzerindeki olası etkilerinin çeşitli yöntemlerle araştırılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kanser

Normal dokularda hücre çoğalması organizmanın ihtiyacına göre belirlenmektedir (Lowitz ve Casciato 2007). Kanser, hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalmasıdır. Kontrollü hücre çoğalmasının gerçekleşmesi için de protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler arasında denge olması gerekmektedir. Kanserde mutasyon sonucu gen ifadesi değişmektedir ve hücreler kontrolsüz olarak büyümeye ve bölünmeye başlamaktadır. Bu nedenlerle hücrelerin normal fonksiyonları engellenmektedir. Hücrelerin sürekli çoğalması ile her organ yenilenme göstermektedir. Ancak bu yenilenme sırasında bazı hücreler anormal bir şekilde üreyerek tümör oluşturmaktadır (Kasap vd 2010). Kanseri türleri gerek davranış gerek tedaviye cevap yönünden farklılık göstermektedir. Hücrelerin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkan tümörler benign ya da malin olabilmektedir. Kanseri patolojisinde benign ve malin tümörleri birbirinden ayırt etmek oldukça önemlidir. Çevresindeki normal dokuyu istila etmeyen ve vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştuğu yerde kalan tümörler benign tümörlerdir. Çevresindeki normal dokuyu istila eden ve dolaşım veya lenfatik sistemler aracılığı ile yayılan tümörler ise malin tümörlerdir. Kanseri hücresinin lenf ya da kan yoluyla vücudun diğer bölgelerine giderek gittikleri yerde anormal şekilde çoğalarak kanserin bu şekilde yayılmasına metastaz denilmektedir. Malin tümörler kanser olarak tanımlanmaktadır. Malin tümörlerin yani kanserin yayılma ve metastaz yapma özellikleri kanserin tedavisini zorlaştırmaktadır (Cooper ve Hausman 2006). Kanseri hücrelerinin metastaz ve invazyonunda bu hücrelerin proteaz ve büyüme faktörleri salgılamaları önemli rol oynamaktadır. Proteazlar ekstraselüler matriks yapısını bozarak kanseri hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine yayılmasına yol açmaktadır (Stetler-Stevenson vd 1993). Prostat, meme, akciğer, kolon ve rektum kanserleri görülen kanserlerin yarısından fazlasını oluşturmaktadır.

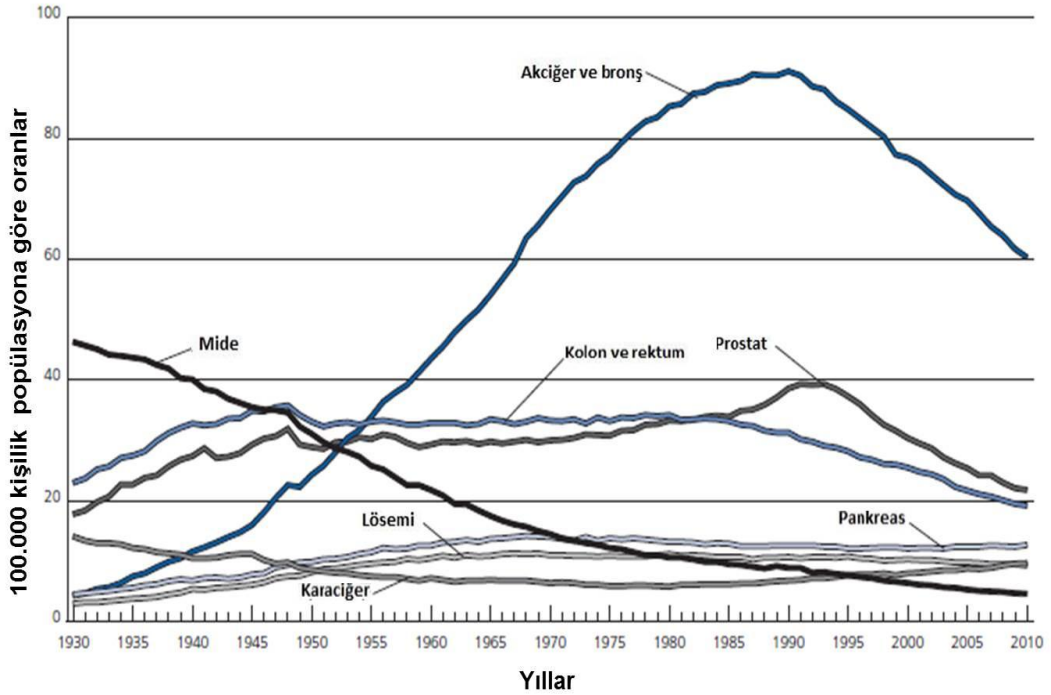
Tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılmaktadır.

Karsinomalar: İnsan kanserlerinin yaklaşık % 90'ını oluşturan ve epitel hücrelerinden köken alan tümörlerdir.

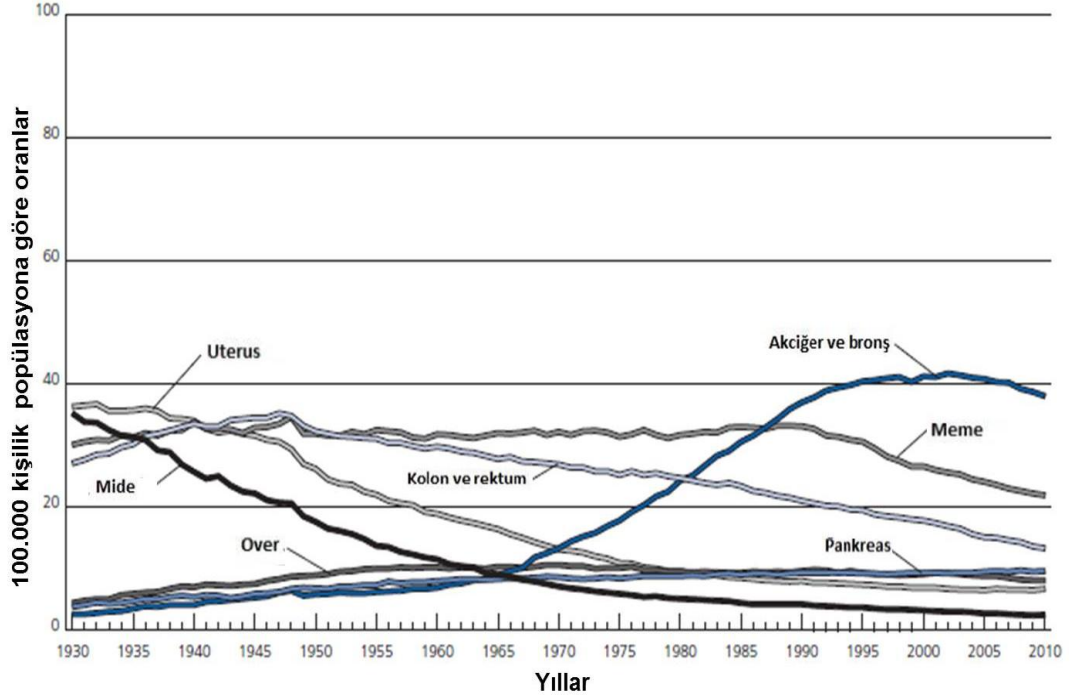
Sarkomlar: İnsanda az görülen kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir.

Lösemi ve Lenfomalar: İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturmaktadır ve kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişmektedirler (Cooper ve Hausman 2006).

Kanser insidans hızı toplumda yüz binde 85 ile 350 arasında değişmektedir ve insidans hızı tür, coğrafik bölge, hastanın yaşı ve cinsiyetine göre farklılıklar göstermektedir (Parkin vd 2005). Giderek artan yaşlı nüfus oranı ve ilerleyen teknoloji ile birlikte çevresel karsinojenlere maruz kalmaya bağlı olarak kanser oranının progresif olarak artmaya devam edeceği öngörülmektedir (Eaton 2003). Kanser Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık görülen ölüm sebepleri arasında yer almaktadır ve kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almakta ve her 4 ölümden birinin sebebinin oluşturmaktadır. 2014 yılında yaklaşık 585.720 Amerikalının kanser nedeniyle yaşamını yitirmesinin söz konusu olduğu değerlendirilmektedir. Bu sayıda günde 1600 Amerikalı'nın kanser nedeniyle yaşamını yitirmesi demektir. Son yıllarda, Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölüm oranlarına bakıldığında çeşitli kanser türleri arasında erkeklerde akciğer kanserinden sonra prostat kanseri, kadınlarda ise akciğer kanserinden sonra meme kanserinin yer aldığı (Şekil 2.1) (Şekil 2.2)'de grafiklerde görüldüğü gibi dikkati çekmektedir (WEB_1).



Şekil 2.1 1930-2010 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde erkekler arasında görülen kanser türlerine bağlı olarak ölüm oranları (WEB_1)



Şekil 2.2 1930-2010 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlar arasında görülen kanser türlerine bağlı olarak ölüm oranları (WEB_1)

Türkiye'deki kanser olgularına dair istatistikleri ise Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın sayfasında bulmak mümkün olup Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Türkiye'de yıllara ve cinsiyete göre toplam kanser insidansı (100.000 kişi ölçeğinde) (WEB_2)

Yıllar	Erkek	Kadın	Toplam
2004	236,3	142,9	189,6
2005	246,5	149,7	198,1
2006	256,4	158,1	207,3
2007	271,7	166,8	219,3
2008	280,5	172,0	226,3
2009*	304,5	182,3	243,4
2010*	330,4	193,2	261,8
2011*	358,4	204,7	281,6

* Bu yıllara ait insidans değerleri tahmini değerlerdir.

Tablo 2.2 Türkiye’de yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı (100.000 kişi ölçeğinde) (WEB_2)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010*	2011*
Meme	34,7	35,0	37,6	35,9	40,7	42,1	43,6	45,1
Tiroid	7,3	9,6	10,8	14,4	16,2	19,7	24,0	29,8
Kolorektal	11,3	11,1	12,5	12,3	13,2	13,9	14,6	15,3
Uterus Korpusu	7,6	7,1	8,4	8,7	8,6	9,5	10,4	11,4
Trake, Akciğer ve Bronş	7,4	7,4	7,7	7,8	8,2	8,7	9,3	9,9
Non-Hodgkin Lenfoma	4,4	4,0	4,9	5,2	5,0	6,0	7,2	8,6
Mide	6,4	6,9	7,6	8,4	7,7	8,0	8,3	8,6
Over	5,8	5,6	5,9	6,5	6,9	7,1	7,3	7,5
Uterus Serviksi	4,5	4,4	4,8	4,3	4,1	4,9	5,9	7,1
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	3,6	4,0	4,6	4,6	4,4	4,5	4,6	4,7

* Bu yıllara ait insidans değerleri tahmini değerlerdir.

Tablo 2.3 Türkiye’de yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı (100.000 kişi ölçeğinde) (WEB_2)

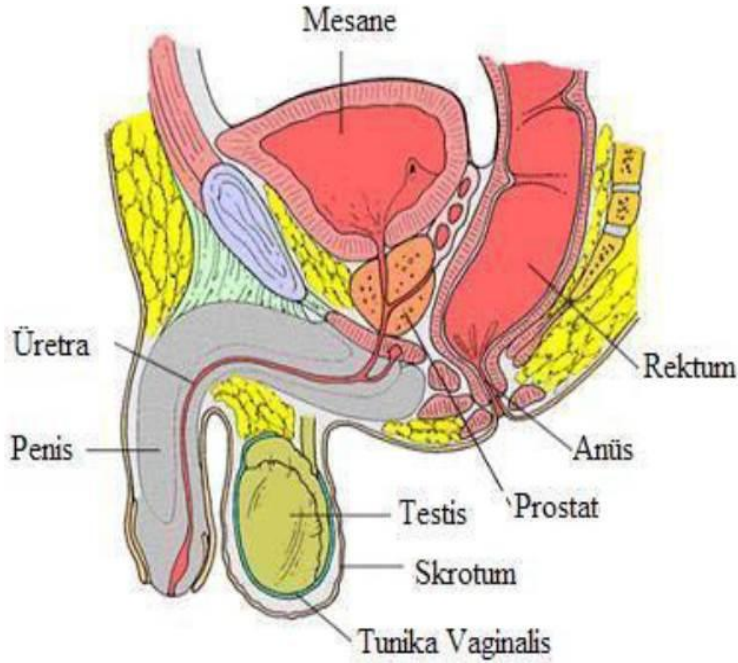
	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010*	2011*
Trake, Akciğer ve Bronş	65,1	65,9	68,9	73,0	69,2	74,1	79,3	84,9
Prostat	24,9	28,6	28,9	32,3	37,6	44,0	51,4	60,0
Mesane	19,3	20,6	21,0	22,5	21,7	23,4	25,3	27,3
Kolorektal	16,5	16,2	18,2	19,1	20,8	22,5	24,3	26,3
Mide	14,1	14,9	14,8	17,3	18,0	19,1	20,3	21,6
Non-Hodgkin Lenfoma	6,3	5,9	6,9	7,6	6,9	8,5	10,4	12,7
Larinks	10,0	8,9	9,7	9,3	9,1	9,5	9,9	10,3
Pankreas	4,0	4,4	5,2	6,3	6,1	6,7	7,3	8,0
Böbrek	4,1	4,1	5,5	5,2	5,8	6,3	6,9	7,5
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	4,7	5,7	5,4	5,8	6,1	6,2	6,3	6,4

* Bu yıllara ait insidans değerleri tahmini değerlerdir.

2.2. Prostat Kanseri

Prostat ilk olarak 1536 yılında bir anatomist olan Niccolò Massa tarafından tanımlanmış ve 1538 yılında da anatomist Andreas Vesalius tarafından resmedilmiştir (Hellerstedt ve Pienta 2002). Normal prostat bezi mesanenin hemen altında üretranın etrafını saran yaklaşık 4x3x3 cm ölçülerinde bir yapıdır (Şekil 2.3). Prostat bezi sperm hareketliliğinde rol alan, birçok protein ve mineralden oluşan seminal sıvıyı

üretmektedir. Seminal sıvı spermeleri kadın üreme kanalına doğru yol alırken korumaktadır (Prscott vd 1998).



Şekil 2.3 Prostatın anatomik yapısı (Staubesand 1990)

Prostat kanserini tıp literatürüne ilk kez 1817 yılında Londra'lı doktor George Langstaff kazandırmıştır. Prostatı radikal perineal prostatektomi tekniği ile ilk kez 1904 yılında Young adında bir cerrah çıkartmıştır. Radikal retropubik prostatektomi tekniğini ilk kez 1945 yılında Millin kullanmıştır. İlerlemiş prostat kanserli hastalarda androjen hormonunun kan dolaşımından uzaklaştırılması için orşiektomi operasyonunu ilk kez 1941 yılında Charles Brenton Huggins uygulamıştır (Abate-Shen ve Shen 2000, Parkin vd 2001, Kumagai vd 2007).

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozularak, organ hacminin malign büyümesi sonucunda oluşmaktadır. Prostat kanseri genellikle uzun süre belirti vermeden ilerlemektedir ve belirtiler hastalar ileri yaşlara geldiğinde ortaya çıkmaktadır. Prostat kanseri, özellikle endüstrileşmiş ülkelerde görülen önemli bir sağlık problemi olmakla birlikte erkeklerde, akciğer kanserinden sonra ikinci en sık kansere bağlı ölüm nedenidir (Szliszka ve Krol 2013). Prostat kanseri özellikle androjen reseptörü hedefleyen ajanlara çeşitli cevaplar veren heterojen bir hastalıktır (Ecstein-Fraisse ve Su 2014). İlerlemekte olan prostat kanserinde standart tedavi tek başına luteinize edici hormon (LSH) salan hormon agonistleri veya luteinize edici hormon (LSH) salan hormon agonistleri artı anti-

androjenlerdir (Takahashi 2014). Yaşam süresince klinik olarak prostat kanser tanısı konulma olasılığı %11.3 iken klinik olarak kanser tanısı alan hastaların da %32'si prostat kanseri nedeniyle hayatlarını kaybetmektedirler (WEB_3). Prostat kanserinin adenokarsinoma, musinöz adenokarsinoma, prostatik duktal adenokarsinoma, saf küçük hücreli adenokarsinoma, skuamöz ve adenoskuamöz kanserler, sarkomatid karsinoma (karsinosarkom), transizyonel hücreli kanserler, malign mezenşimal tümörler, prostatik epitelyal neoplazi (PIN), atipik küçük asiner proliferasyon gibi pek çok türü vardır. %98 görülme sıklığı ile adenokarsinomlar en sık görülen prostat kanseri tipidir (Baltacı 2007).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırma sonucunda, 2014 yılı için tahmin edilen prostat kanseri olgusunun tüm kanser olgularının %27'sini ve ölüm olgusunun ise tüm kanser ölüm olgularının %10'unu oluşturabileceği rapor edilmiştir (Tablo 2.4) (Siegel vd 2014).

Tablo 2.4 Amerika Birleşik Devletleri'nde cinsiyetlere göre 2014 yılı için farklı tipteki kanser olgularının tahmini sayıları ve ölüm oranları (Siegel vd 2014)

Kanser Olgularının Tahmini Sayıları						
	Erkek			Kadın		
Prostat	233.000	%27	Meme	232.670	%29	
Akciğer	116.000	%14	Akciğer	108.210	%13	
Kolon	71.830	%8	Kolon	65.000	%8	
Mesane	56.390	%7	Uterus	52.630	%6	
Melonoma	43.890	%5	Tiroid	47.790	%6	
Böbrek	39.140	%5	Non-hodkin lenfoma	32.530	%4	
Non-hodgkin lenfoma	38.270	%4	Melonoma	32.210	%4	
Farinks	30.220	%4	Böbrek	24.780	%3	
Lösemi	30.100	%4	Pankreas	22.890	%3	
Karaciğer	24.600	%3	Lösemi	22.280	%3	
Tümü	855.220	%100	Tümü	810.320	%100	
Kanser Olgularının Tahmini Ölüm Oranları						
	Erkek			Kadın		
Akciğer	86.930	%28	Akciğer	72.330	%26	
Prostat	29.480	%10	Meme	40.000	%15	
Kolon	26.270	%8	Kolon	24.040	%9	
Pankreas	20.170	%7	Pankreas	19.420	%7	
Karaciğer	15.870	%5	Ovaryum	14.270	%5	
Lösemi	14.040	%5	Lösemi	10.050	%4	
Özofagus	12.450	%4	Uterus	8.590	%3	
Mesane	11.170	%4	Non-Hodgkin lenfoma	8.520	%3	
Non-hodgkin lenfoma	10.470	%3	Karaciğer	7.130	%3	
Böbrek	8.900	%3	Beyin	6.230	%2	
Tümü	310.010	%100	Tümü	275.710	%100	

2.2.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Prostat kanseri, özellikle endüstrileşmiş ülkelerde görülen önemli bir sağlık problemi olmakla birlikte erkeklerde, akciğer kanserinden sonra ikinci en sık kansere bağlı ölüm nedenidir (WEB_4). Gelişmiş ülkelerde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Amerikan Kanser Topluluğu'nun verileri, Amerika'da her altı erkekten birine prostat kanseri teşhisi konulduğunu ve her otuz altı erkekten birisinde bu nedenle yaşamını yitirdiğini göstermektedir (WEB_5). Son yıllarda ilerleyen teknoloji ile birlikte artan tarama çalışmaları sayesinde prostat kanseri tanısı daha erken yaşlarda konulmaktadır. Bu nedenle sessiz prostat kanseri klinik prostat kanserine dönüşmeden tanı konulabilmektedir. Ancak bu erken tanı hastalığın insidansında artışa neden olmuştur. Prostat kanseri görülme sıklığında 1995 yılından günümüze %1.7'lik bir artış gözlenmişken mortalitede %4 azalma görülmüştür (Chan vd 2004). Avrupa'da görülen tüm kanserler arasında prostat kanseri %11'lik bir yere sahiptir (Bray vd 2002). Gelişmiş ülkelerde erkek kanserlerinin %15'ini oluşturmakta ve gelişmekte olan ülkelerde bu oranın %4'lere kadar düştüğü görülmektedir (Parkin vd 2001). Prostat kanseri insidansı ile ilgili Türkiye' de kesin veriler bulunmamakta ancak 1993-1994 yılları arasında yapılan bir çalışmada prostat kanseri insidansı İzmir için yüzbinde 9.1 olarak tespit edilmiştir. Bu oran Doğu Avrupa ülkeleri ile aynı seviyededir ve ABD'nin 1/12'sine denk gelmektedir (Fidaner vd 2001). Yapılan başka bir epidemiyolojik çalışma sonucunda Türkiye'de prostat kanserinin görülme sıklığının 2009 verilerine göre yüzbinde 19 olduğu rapor edilmiştir (WEB_6). Prostat kanserinin görülme sıklığı Avrupa ülkelerinde Norveç'de yüzbinde 24, İspanya'da yüzbinde 13, Hollanda'da yüzbinde 80, Danimarka'da yüzbinde 30.9 olduğu rapor edilmiştir. Bu oranlar Çin ve Japonya'da oldukça düşüktür (Walsh vd 2005). Japonya'da 1992 ile 1995 yılları arasından prostat kanseri mortalitesinin yüzbinde 4 olduğu rapor edilmiştir (Landis vd 1998, Landis vd 1999). 1985 ile 1989 yılları arasında PSA'nın kullanıma girmesiyle prostat kanseri insidansında önceki yıllara göre %2.3'lük yıllık artış ile %6 seviyelerine ulaşmıştır. 1989-1992 yılları arasında artışın %18.4'e ulaştığı rapor edilmiştir. 1992-1995 yılları arasında ise %14'lere gerilediği gösterilmiştir (Hankey vd 1999). Mortalite (ölüm) oranı kansere bağlı insidansa dayanmaktadır. Prostat kanseri erkeklerde görülen kanser ölümlerinin %5.8'inden ve bütün kanser ölümlerinin %3.3'ünden sorumludur. Prostat kanser gelişiminin erken basamakları genellikle genetik yatkınlık, oksidatif hasar ve inflamatuvar değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Kromozomal kayıplar ve telomer kısalmaları da prostat kanserinde ilerlemeye neden olabilmektedir (Gonzalگو ve Isaacs 2003). Prostat kanserinde yaş, ırk, aile öyküsü,

hormonal faktörler, diyetsel faktörler, sigara ve alkol kullanımı ve coğrafik konum gibi çeşitli faktörler risk artışında önemli yer tutmaktadır.

2.2.1.1. Yaş

Prostat kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır ve riski yaş ilerledikçe artış göstermektedir. Ortalama tanı konma yaşı 60 yaş civarındadır (Grönberg 2003). ABD'de prostat kanseri teşhisi yapılan vakaların %70'i 65 yaş ve üzerindeki erkeklerdir (Crawford 2003). Prostat kanserlerinin yaklaşık %95'inde tanı ortalama 72 yaşında olmak üzere 45-89 yaşları arasında konulmaktadır. Prostat kanseri gelişme oranı 39 yaşın altındaki erkeklerde 1/10.000 iken, 40-59 yaş arasındaki erkeklerde bu oran 1/103, 60-79 yaş arasındaki erkeklerde ise 1/8'dir (Catalona vd 1991, Guthman vd 1993).

2.2.1.2. Irk

Afrika kökenli Amerikalı erkeklerin (Afro Amerikalı), prostat kanserine yakalanma insidansı ve bu hastalık nedeniyle yaşamını yitirme oranı diğer ırklardaki erkeklere göre daha yüksek gözükmektedir (WEB_5). Beyazlarda prostat kanser insidansı 156 ve mortalitesi 25/100.000 iken Afrika kökenli Amerikalılarda insidansın 248 ve mortalitenin ise 59/100.000 olduğu gösterilmiştir (Jemal vd 2008). Asya kökenli Amerikan erkeklerinde ise sıklığın en az olduğu rapor edilmiştir. Beyazlarda yaşam süresince prostat kanseri riski %15.5, prostat kanserinden ölme riski %2.9 iken Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayan Afrika kökenlilerde prostat kanseri riski %18.3 prostat kanserinden ölme riski %4.8 olarak hesaplanmıştır (Leach vd 2003). Siyahlarda prostat kanseri hem daha erken yaşta hem de daha ileri evrede teşhis edilmektedir. Prostat kanserinin tüm evrelerindeki 5 yıllık sağkalım oranı siyahlarda %62 beyazlarda ise %72 olarak rapor edilmiştir (Pienta vd 1993, Wingo vd 1995).

2.2.1.3. Aile Öyküsü

Prostat kanseri kalıtsal ve sporadik olmak üzere 2 grup altında toplanabilmektedir. Prostat kanserleri %85 sporadik ve %10-15' i genetik olarak saptanmaktadır. Yapılan bazı analizlerde prostat kanserli hastaların birinci derece yakınlarında daha yüksek sıklıkta prostat kanseri görüldüğü tespit edilmiştir (Carter vd 1992, Bratt 2002). Sporadik prostat kanserlerinde aile öyküsü bulunmamaktadır. Prostat kanserli hastaların aile öyküsü bulunanların aile öyküsü bulunmayanlara göre yaklaşık altı yedi sene önce kanser teşhisi konulduğu yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalara göre, 50'li yaşlardaki erkeklerde görülen kanser

vakalarının yaklaşık %40'ında kalıtsal özellikler önemli rol oynarken, tüm kanser vakalarının %5-10'unda da kalıtsal özellikler önemli rol oynamaktadır. Prostat kanserlerinin de %10'unun kalıtsal olduğu düşünülmektedir (Bratt 2002).

Yapılan araştırmalarda prevalans taraması sonucunda prostat kanseri tanısı konulan tüm erkeklerin %10.5-18'inde pozitif aile hikayesi olduğu görülmüştür (Aprikian vd 1995, Ray vd 2003, Roemeling vd 2006). Erken yaşlarda ortaya çıkan prostat kanserinde ailesel etkinin fazla olduğu, ileri yaşlarda ise sporadik olarak geliştiği düşünülmektedir (Carter vd 1992, Yong vd 2000). Kromozomal bozukluklarda prostat kanserinde önemli yer tutmakla birlikte prostat kanserinde en sık görülen kromozom bozuklukları olarak 7p, 7q, 8q ve Xq'da artıştan, 8p, 10q, 13q ve 16q'da ise azalmadan bahsedilmektedir (Nupponen vd 1998, De Marzo vd 2003, Rubin ve De Marzo 2004).

2.2.1.4. Hormonal Faktörler

Testosteron ve dihidrotestosteron normal prostat büyümesi için gerekli olan hormonlardır. Artan androjen stimülasyonu hücre bölünmesini arttırmaktadır ve bu da prostat karsinogenezine yol açmaktadır (Kyprianou ve Isaacs 1988). Testosteron, östrojenler, insülin, leptin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi hormonlar prostat kanseri gelişiminde rol oynamaktadır (Chan vd 1998).

2.2.1.5. Diyetel Faktörler

Prostat kanseri riski ile diyete bağlı olarak yüksek miktarda yağ alımı arasında bir ilişki bulunmaktadır. Yağ tüketimi ile yağ asitlerinin plazma konsantrasyonları artmaktadır ve bu artışta gonadal steroidlerin globünlere bağlanmasını inhibe edebileceği düşünülmektedir. Uzun süre bu şekilde beslenme, androjenik stimülasyonu artırma nedeniyle prostat kanseri oluşumunu tetikleyebilir (Moorty ve Venugopal 2008). Diyetle alınan fazla miktarda yağ, uzun süreli androjenik uyarı oluşturmaktadır ve kanser riskini arttırmaktadır. Bu hipotez yağda eriyen vitaminler ve çinko gibi eser elementler için de geçerlidir (Walsh vd 2005).

2.2.1.6. Sigara ve Alkol Kullanımı

Sigara kullanımının tüm kanserler ile doğrudan %80 ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak sigaranın prostat kanserine etkisi net olarak açıklanamamıştır. Sigara kullanımı akciğer, mesane ve epitelyal kanserler için risk faktörü olduğu doğrulanmıştır (Reiter ve deKernion 2005). Fazla alkol tüketimi östrojen düzeyini

arttırmakta ve testosteron düzeyini azaltmaktadır. Bu nedenle alkolün prostat kanseri riskini azaltabileceği düşünülmüştür (Breslow vd 1999).

2.2.1.7. Coğrafik Konum

Prostat kanserine çevrenin etkisi ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. ABD' de Çin ve Japonların kendi ülkelerinde yaşayanlar ile kıyaslandığında prostat kanseri insidanslarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum da aynı zamanda beslenme alışkanlıkları ile ilişkilendirilmiştir (Walsh vd 2005).

2.2.2. Prostat Kanserinin Oluşumunda ve Progresyonunda Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

1. Androjen reseptörü'nün (AR) Etkileri

Steroid reseptör gen ailesinin bir üyesi olan androjen reseptörü biyolojik olayların embriyogenezinde rol oynamaktadır. Embriyogenez aşamasında Wolf kanalının ve eksternal genital yapının erkek özelliği kazanmasında rol oynar. Erişkin dönemde ise spermatogenezde rol oynamaktadır (Reiter ve deKernion 2005). AR, dalak ve kemik iliği hariç vücudun tüm dokularında bulunmaktadır (Gilligan vd 2004, Dowsing vd 1999).

AR geni sekiz ekzondan oluşmaktadır. Geniş amino-terminal bölgesi birinci ekzon tarafından kodlanmakta ayrıca, yüksek polimorfik CAG tekrarlarını içermektedir. DNA bağlayıcı bölge ikinci ve üçüncü ekzon tarafından kodlanır. Steroid hormon bağlayıcı bölge ile ilgili bilgi dörtten sekize kadar olan ekzonlar tarafından kodlanmaktadır (Mhatre vd 1993, Coetzee ve Ross 1994). AR gen ürünü diğer genlerin ekspresyonunu aktive etmede ve androjen hormonunun transkripsiyonunda önemli rol oynamaktadır (Kazemi-Esfarjani vd 1995).

AR, Xq11-12'de yer almakla birlikte steroid ve tiroid hormon reseptörü geni süper ailesinin bir üyesidir. Bu nükleer reseptör, hormonu sitoplazmada bağlar ve nükleusa transloke eder. Nükleusta DNA bağlanma sırasında dimerize olan hormon androjene yanıt veren genin promoter bölgesine bağlanır ve transkripsiyonel kompleks oluşturur. AR'lerin tümör progresyonuna etkisi 3 mekanizma ile özetlenebilmektedir (Gürbüz 2010).

A-Reseptör ekspresyonu ve aktivasyonunda artış: AR, hastalığın geç döneminde androjen baskılama tedavisi sonrası gen aktivasyonu için bir hedeftir. AR, androjen yokluğunda progresyon gösteren ileri evre prostat kanserlerinde dominant onkogen olarak rol oynamaktadır. AR'nin aşırı ekspresyonu prostat kanserinin klinik süreci boyunca korunur ve en ileri evre androjen bağımsız hastalarda bile bulunmaktadır (Gürbüz 2010).

B-Nokta mutasyonları: Daha çok, ileri evre prostat kanserlerinde AR geninde nokta mutasyonları saptanmıştır. AR yoğunluğu ile birlikte AR geninde de birtakım değişiklikler görülmektedir. Bu değişimler genellikle nokta mutasyonları ile gerçekleşmektedir. Bu mutasyon sonucunda AR artık sadece androjenler tarafından değil aynı zamanda çok sayıda steroid tarafından aktive edilebilir hale gelmektedir (Gnanapragasam vd 2000). İleri evre prostat kanserinde %21 oranında AR nokta mutasyonu görülmektedir (Marcelli vd 2000).

C-Ligand bağımsız aktivasyon: AR'ler ligand bağımsız olarak farklı bileşenler tarafından aktive edilebilirler. Bu bileşenler büyüme faktörleri, bunların reseptörleri ile ilişkili olan moleküller, sitokinler, peptid hormonlar, nörotransmitterler ve interlökin-6 (IL-6) olabilmektedir (Lattouf vd 2006).

2.Androjenler ve Büyüme Faktörleri

Androjenler prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadırlar. Androjenler; testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion, dehidroepiandrosteron gibi erkek cinsiyet hormon topluluğundan oluşmaktadır (Menteş vd 2002). Prostat dokusunun büyümesi ve fonksiyonlarını yerine getirmesi başta testosteron ve dihidrotestosteron olmak üzere androjenlere bağlıdır (Kambhampati vd 2005).

3.Proliferatif Hücre içi Sinyal Yolakları

Prostat kanserinde hücre içi sinyaller büyüme faktörlerine ve reseptörlerine bağlı olarak artmaktadır. Hücre içi düzenleyici sistemler prototipik kanser yolakları olarak da değerlendirilebilmektedir. Tümör hücresinin çoğalmasında MAPK, fosfotidil inozitol-3 kinaz (PI3K) ve nükleer faktör-kappa B (NFkB) gibi hücre içi yolaklar önemli rol oynamaktadır.

4. Prostat Kanserinde En Sık Saptanan Genetik Değişiklikler

- Telomeraz: Genelde hücrelerin bölünme sayısı sınırlı iken kanser hücreleri sınırsız sayıda bölünmektedirler. Ölümsüzlüğe neden olan mekanizmlardan biri de kromozom uçları olan telomerlerdir. Normal hücrelerde telomerler kısalmaktadır. Ancak bir revers transkriptaz olan telomeraz etkisi ile kanser ve kök hücrelerinde telomerler yenilenebilirler. Bu enzim normal olarak hücrelerin farklılaştıkları durumda gittikçe azalmakta iken birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürmekte ve aktive edilmektedir. Sonuç olarak telomerlerin uzunluğu sabit kalmış olup hücrenin sınırsız sayıda çoğalmasına neden olmaktadır (Lowitz ve Casciato 2007).

- Glutasyon-S-transferaz-pi (GST-pi): Serbest radikalleri inaktive ettiği bilinen bir enzimdir. Prostat kanseri vakalarında bu enzimin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (Song vd 2002).

- PTEN / Akt: PTEN/MMAC tümör baskılayıcı genlerinin, kromozom 10q23'te lokalize olduğu gösterilmiştir. Kromozom 10q'da heterozigozite kaybı prostat kanserinde sıklıkla görülmektedir. 10q'daki kayıp ileri evre hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Reiter ve deKernion 2005).

- myc: Myc prostat kanseri hücrelerinde önemli protoonkogendir. Myc onkogeni 8q24 kromozom bölgesinde yer almaktadır ve çoğalma, farklılaşma ve apoptotik yollarda normal olarak işlev gören bir transkripsiyon faktörüdür (Scaggiante 2008, Neto vd 2010, Min vd 2010).

- Bcl-2: Kanser hücre çoğalması ve apoptoz arasında dengenin bozulması durumunda ortaya çıkmaktadır. Bcl-2 apoptozu engelleyen bir onkogendir. Prostat hücrelerinin özellikle androjen bağımsız olanlarının çoğunda Bcl-2' nin arttığı saptanmıştır (Yoshino vd 2006). Normal prostatta bazal hücreler tarafından eksprese edilen Bcl-2 özellikle androjenden bağımsız tümörlerde olmak üzere, prostat tümörlerinde de eksprese edilmektedir (McDonnel vd 1992).

- p53: Tümör baskılayıcı genlerin en önemlilerinden biridir. p53 mutasyonunun, radikal prostatektomi ve radyoterapi gören hastalarda kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bauer vd 1996). p53 tümör supresör geni hücrede hücre büyümesini ve transformasyonu baskılamaktadır. Proliferasyonu inhibe etmede önemli rol oynamaktadır. G1 fazını bloke etmektedir. p53 genindeki mutasyonlar kanser

oluşumunda en önemli değişikliklerdendir. p53'ün fonksiyon kaybı sonucunda hücre döngüsü ve DNA replikasyonu bozulmaktadır. Sonuçta eksik DNA tamiri ve kontrolsüz büyüme nedeniyle tümör oluşumu gerçekleşmektedir (Van ve Mickisch 1999). Ancak prostat kanserinde p53 mutasyonları az görülmeyle birlikte ileri evrede ve yüksek dereceli, metastatik prostat tümörlerinde daha sık görülmektedir (Grignon ve Hammond 1995, Ross vd 2002).

-VEGF (Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü): En iyi tanımlanmış proangiogenik genlerdendir. VEGF'nin prostat kanserlerinin çoğunda eksprese edildiği gözlenmiş ve ekspresyonundaki artış tümörün yayılması ile korele olduğu saptanmıştır (Latil vd 2000). VEGF androjenler tarafından düzenlenmekte ve androjenlerin prostat kanserini etkilemesi açısından potansiyeldir (Joseph ve Isaacs 1997).

-MMP: Tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazında ekstraselüler matriksin yıkılması için MMP'ler oldukça önemlidir (Wilson vd 2004).

-E-Kaderin: Hücreler arası adezyon proteini olarak tanımlanan E-kaderin 16q23 kromozom bölgesinde yer almaktadır. Prostat kanserinde bu bölgenin kaybolduğu gösterilmiştir. Özellikle kötü diferansiye tümörlerde E-kaderinin azaldığı rapor edilmiştir (Umbas vd 1992).

2.2.3. Prostat Kanserinde Belirti ve Semptomlar

Prostat kanseri erken aşamada herhangi bir belirti vermemektedir. Genellikle üretraya baskı yapacak kadar büyüme gerçekleştiğinde belirti vermektedir. Bu büyüme nedeniyle idrara sık çıkma ve işeme sırasında ağrı veya zayıf idrar akışı görülmektedir. Ancak bu belirtiler her zaman kanser anlamına gelmez ve yaşlılıkla birlikte prostat büyümesi de meydana gelebilir. Prostat kanserinin ileri aşamalarında iştah kaybı, zayıflama ve kemiklerde sürekli ağrı görülebilir (WEB_7).

Prostat kanseri geliştikçe hastalığın vücudun diğer bölgelerine yayılması gibi ek semptomlara neden olabilmektedir. Genellikle omurga kemikleri olmak üzere kemik ağrıları, pelvis ya da kaburga kemiklerinde bu kemiklere yayılmadan dolayı ağrılar görülebilmektedir (Van der Crujisen-Koeter vd 2005).

2.2.4. Prostat Kanserinin Tanısı

Prostat kanserinin tanısında sıklıkla kullanılan dört yöntem bulunmaktadır. Bunlar: Parmak ile rektal muayene (PRM), prostat spesifik antijen (PSA) testi, transrektal ultrasonografi (TRUS) ve biyopsidir. Prostat kanseri şüphesi olan hastalara TRUS ile birlikte biyopsi uygulanması tanı koydurucudur. Prostat biyopsisi tanıyı koymada en kesin metottur (WEB_7).

2.2.4.1. Parmak ile Rektal Muayene (PRM)

Parmak ile rektal muayene, rektumun hemen önünde bulunan prostat bezini hissederek büyüklüğü ve sertliği hakkında bilgi sahibi olmak için yapılmaktadır. Kanser varlığında prostat bezi serttir. Bu yöntem sonrasında kanserin varlığından emin olmak için daha ileri tetkikler yapılmaktadır (WEB_7).

2.2.4.2. Prostat Spesifik Antijen (PSA) Testi

PSA, kallikrein gen ailesinin bir üyesi olup prostat bezinde üretilen kanda bulunan bir proteindir. PSA testi prostat kanseri tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Organa özgüdür ancak kansere özgü değildir ve prostatla ilgili tüm durumlarda yükselebilmektedir. Rektal muayene ile birlikte sıklıkla kullanılan bir testtir. PSA testi ile vücutta prostata özgü antijenlerin seviyesi ölçülmektedir. PSA testinin sonuçları %100 güvenilir olmamasına rağmen prostat kanseri tanısında ve seyrinde önemlidir (Göğüş 2006).

2.2.4.3. Transrektal Ultrasonografi (TRUS)

Prostat kanseri tanısında PRM'ye ek olarak transrektal ultrasonografiden de yararlanılmaktadır. Bu işlem ile ultrasonografik dalgalardan yararlanılarak bir aleti hastanın rektumuna yerleştirilmesi ile prostat büyüklüğü ve iç kesimlerin detaylı görüntüsü alınmaktadır (WEB_7).

2.2.4.4. Biyopsi

Prostat kanseri teşhisinin en kesin yolu rektumdan prostat bezi içerisine uzatılan özel iğneler yardımı ile yapılan biyopsidir.

2.2.5. Prostat Kanseri Tedavisi

Günümüzde prostat kanserinin tedavisi için altı seçenek mevcuttur. Bunlar: aktif olarak gözlem altında tutma, ameliyat, kriyocerrahi, radyasyon terapisi, hormon terapisi ve aşı uygulamasıdır (WEB_7). Organla sınırlı prostat kanserinde ameliyat (radikal prostatektomi), radyoterapi ve takip en önemli tedavi seçenekleridir. Metastatik veya ilerlemiş prostat kanserinde geçici bir etki oluşturan hormon baskılama tedavisi uygulanmaktadır. Erken evrede tanı tedavi bakımından çok önemlidir. Androjen bağımlı tümörler başlangıçta androjen yokluğunda normal prostat epiteli gibi gerilemektedir. Cerrahi ya da medikal kastrasyon uygulamasına rağmen tümör büyümeye devam ediyorsa androjen bağımsız olarak adlandırılmaktadır (William ve Oh 2000). Androjen bağımsız tümörler değişik hormonal yaklaşımlara yanıt verebilirken hormona dirençli dediğimiz tümörler değişik hormonal yaklaşımlara yanıt vermemektedir. Androjen baskılayıcı tedaviler yapıldıktan sonra ilerleyen prostat kanserlerinde en sık kullanılan yöntem antiandrojenlerin geri çekilmesidir. Bu aşamadan sonra ikincil hormonal tedaviler ve sitotoksik kemoterapiler uygulanmaktadır (Calabro ve Sternberg 2007).

2.2.6. Prostat Kanserinin Derecelendirilmesi

Hastalığın biyolojik özellikleri kişiden kişiye değişmektedir. Bu nedenle de tedavinin de kişiye özel olması gerekmektedir. Hastalığın derecelendirilmesi, hem uygun tedavinin uygulanması hem de hastalığın prognozu açısından önemlidir. Prostat kanseri derecelendirilmesinde bazı parametreden söz edilmektedir. Bunlar: Serum PSA seviyesi, Gleason skorlaması ve TNM sistemidir (WEB_5).

2.2.6.1. Serum PSA seviyesi

Prostat spesifik antijen (PSA) insan doku kallikrein ailesinden bir glikoprotein ve bir serin proteazdır. Prostatik doku bütünlüğü bozulması sonucu prostattan kana PSA karışmaktadır. Bu nedenle de serum PSA seviyesi yükselmektedir. Bu yükselme sadece prostat kanseri durumunda değil diğer prostat patolojilerinde ve çeşitli prostat değişikliklerinde de gözlenebilmektedir. Bu nedenle PSA kansere özgüdür denilememekte ancak prostat kanseri seyrinde bir parametre olarak kullanılmaktadır. PSA seviyesi prostat kanseri riski ile ilişkilendirilmektedir. PSA'nın 10 ng/ml'den az olduğu durumda düşük risk, 10-20 ng/ml olduğu durumda orta dereceli risk, 20 ng/ml'den fazla olduğu durumda yüksek dereceli riskten bahsedilmektedir (WEB_5).

2.2.6.2. Gleason Skorlaması

Gleason sistemi patolojik örneklerin incelemesini yapan bir sistemdir. Gleason skorlamasında, tümör büyüklüğü derecelendirilmekte ve tümörün normal doku ile ne kadar benzerlik gösterdiği saptanmaktadır. Gleason skoru 2'den 4'e kadar olan tümörler iyi farklılaşmış ya da düşük grade'li olarak kabul edilmektedir. Gleason skoru 5'den 7'e kadar olan tümörler ılıman özellik gösteren ya da orta gradeli tümör olarak kabul edilmektedir. Gleason skoru 8'den 10'a olan tümörler ise yüksek gradeli tümörler olarak ifade edilirler (WEB_5). Gleason derecesi 1 ve 2 olanlar, küçük düzgün şekilli, araya giren küçük stromayla iyi sınırlı prostat bezleri ile karakterize edilirler (Tanagha ve McAninch 2009).

2.2.6.3. TNM sistemi

Prostat kanseri için TNM evreleme sistemi de kullanılmaktadır. Primer tümör sınıflandırmasını (T evresi) göz önüne alan klinik evrelendirme sistemi parmakla rektal muayene ve transrektal ultrasonun (TRUS) sonuçlarından yararlanır. Ancak biyopsi sonuçlarını göz ardı etmektedir. Prostat tümörlerinin TNM (Tümör-Lenf Nodu-Metastaz) evreleme sistemi aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2.5).

Tablo 2.5 Prostat kanseri için TNM evrelendirme sistemi (Tanagha ve McAninch 2009)

Primer Tümör (T)

Tx → Değerlendirilemez

T0 → Primer tümörün kanıtı yok

Tis → Karsinom in situ (PIN)

T1a → Selim hastalık için rezeke edilen dokunun \leq %5'inde kanser var, normal PRM

T1b → Selim hastalık için rezeke edilen dokunun $>$ %5'inde kanser var, normal PRM

T1c → Sadece yükselmiş PSA ile tespit edilmiş, normal PRM ve TRUS

T2a → PRM ile palpe edilebilir veya TRUS'la sadece tek tarafta görülebilen, prostata sınırlı tümör

T2b → PRM ile palpe edilebilir veya TRUS'la her iki tarafta görülebilen, prostata sınırlı tümör

T3a → Bir veya her iki tarafta ekstrakapsüler yayılım

T3b → Seminal vezikül tutulumu

T4 → Tümörün doğrudan mesane boynu, sfinkter, rektum, levator kasları veya pelvik duvarına yayılır

“Devamı Arkada”

Tablo 2.5 Prostat kanseri için TNM evrelendirme sistemi**Lenf Nodu (N)**

Nx → Değerlendirilemez

N0 → Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1 → Bölgesel bir lenf düğümü veya düğümlerine metastaz

Uzak Metastaz (M)

Mx → Değerlendirilemez

M0 → Uzak metastaz yok

M1a → Bölgesel olmayan lenf nodlarında uzak metastaz

M1b → Kemiğe metastaz

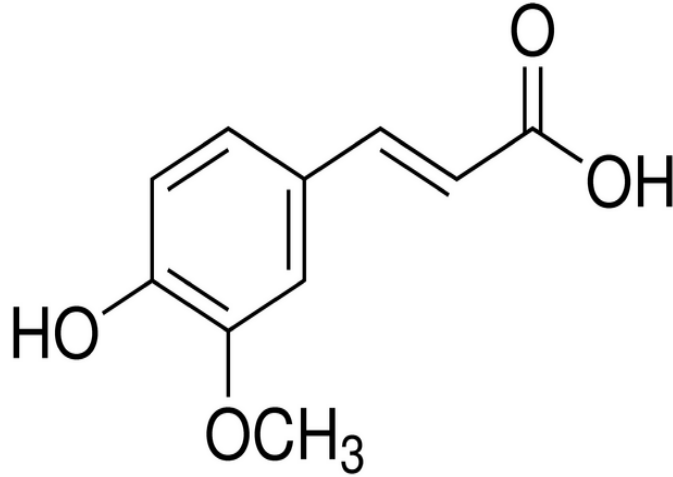
M1c → Diğer alanlara uzak metastaz

2.3. Ferulik Asit

Ferulik asit (FA) sebze ve meyvelerde bol bulunan fenolik bir bileşiktir (D'Archivio vd 2007). Pirinç, yulaf, kahve, turunçgiller, elma ve yaban mersininde bol miktarda bulunmaktadır (Clifford 1999). FA ve diğer yapısal olarak ilişkili hidroksisinnamik asitlerin idrar yolu ile atılmadan önce karaciğer ve bağırsakta glukuronize edildiği ve sülfatlandığı rapor edilmiştir (Wong vd 2010). Ferulik asitin genel özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiş ve kimyasal yapısı gösterilmiştir (Tablo 2.6) (Şekil 2.4).

Tablo 2.6 Ferulik asitin genel özellikleri (WEB_8)

Kimyasal Formül	C₁₀H₁₀O₄
Kimyasal İsimlendirme	4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit
Alternatif isim-kısaltma	FA
Moleküler Ağırlık	194,18 g/mol
Çözünürlük	DMSO, Su
Muhafaza	+4°C
Çalışmada Kullanılan Ferulik Asit Saflığı	% 99
Renk	Açık Sarı
Görünüm	Form: Katı



Şekil 2.4 Ferulik asitin kimyasal yapısı (WEB_8)

Kanserlerin %30-40'ının doğrudan beslenme alışkanlıkları ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Daha çok bitkisel gıdalarla beslenen kişiler daha düşük kansere yakalanma riskine sahip olduğu düşünülmektedir. Fitokimyasallar bakımından zengin diyetler ve düşük kanser oranları arasında ilişkiyi destekleyen kanıtlar artmasına rağmen, çok az fitokimyasalın bu etkilerden sorumlu biyolojik mekanizmaları bilinmektedir (Shuman Moss vd 2014).

Birçok fitokimyasalın antitümör etkisi hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir ve gösterilmeye devam etmektedir. Bu çalışmalar ile birlikte potansiyel koruyucu terapilerin oluşturulması için daha çok çalışma ve zaman gerekmektedir. Bitki polifenollerini karsinogenez, hücre çoğalması, apoptoz, inflamasyon ve anjiyogenez üzerinde etkisi olan fitokimyasalların farklı bir grubudur ve antioksidan özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (Brambilla vd 2008, Calabrese vd 2010). Yeşil çaydan saflaştırılan epigallokateşin gallat ve üzümde saflaştırılan resveratrol gibi birçok bileşik kanserin önlenmesi için klinik deneylerde kullanılmaktadır (Mancuso vd 2009). Ferulik asit esterlerinin meme, akciğer, kolon, merkezi sinir sistemi ve mide kanseri hücre hatlarında hücre çoğalmasını önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir (Jayaprakasam vd 2006).

Ferulik asit fenolik hidroksil grupları ile serbest radikallere karşı proton veya hidrojen iyonları sağlayarak antioksidan etkisini sergiler (Fazary ve Ju 2007). Ferulik asit aynı zamanda aktif oksijen veya süperoksit dismutaza benzer süperoksitin toksisitesine karşı da korur. Ferulik asit ve ferulik asit türevlerinin kimyasal olarak indüklenmiş deri kanseri modellerinde tümör oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (Huang vd 1988, Asanoma vd 1994, Murakami vd 2000, Murakami vd 2000, Burns vd 2013).

Hidroksisinamat ailesinin üyesi olan ferulik asit diyabet, osteoartrit, alzheimer, kalp damar hastalıkları ve kansere karşı faydalı etkiler sağlayabilmektedir (Li vd 2011). Ferulik asit çoğu bitkide yaygın olarak bulunmakta ve tahıl kepeği, toptan tahıl gıdalar, turunçgiller, muz, portakal suyu, kahve, patlıcan, pancar ve lahana gibi gıdaların biyoaktif içeriklerini oluşturmaktadır. Tahıl, sebze, meyve, kahve ve meyve suyu gibi gün içerisinde tüketilen gıdalarla FA alınımı günlük 150-250 mg'a ulaşabilmektedir (Zhao ve Moghadasian 2008). FA Çin'de kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır (Wang ve Ou-Yang 2005). FA'nın anti-enflamatuar (Sakai vd 1999) ve antioksidan (Graf 1992) gibi farmakolojik aktivitelere sahip olduğu ileri sürülmüştür. *In-vivo* çalışmalarda beta-amiloid peptid toksisitesine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu ve hem fertil hem de infertil erkeklerde sperm hareketliliğini ve canlılığını geliştirdiği gösterilmiştir (Zheng ve Zhan 1996). Birçok sebze ve meyve de bulunan FA diyabet ve kanser gibi birçok insan hastalıklarında geniş terapötik etkiye sahiptir (Lin vd 2010). Sodyum ferulatında insan ve hayvan çalışmalarında antitrombotik ve antioksidan aktiviteleri gösterilmiştir (Wang ve Ou-Yang 2005). FA, *Angelica sinensis* gibi Çin bitkileri ve kırmızı üzüm gibi bazı meyvelerden elde edilen yaygın doğal bileşikler ailesi olan bir polifenoldür (Manach vd 2005). FA'nın da içinde bulunduğu bir çok polifenolün meme kanseri hücre hatlarında tümör baskılayıcı ve ayrıca antioksidan aktiviteye sahip olduğunu düşündüren kanıtlar vardır (Keyhanian ve Stahl-Biskup 2007, Menendez vd 2008). Reçinensi bir kovan ürünü olan Polish propolis'in pinobanksan, krisin, methoxyflavanone, p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit ve bunların türevleri olan fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca propolis'in tüm kanser önleyici ve antitümör özelliklerine fenolik bileşiklerin katkı sağladığı bildirilmiştir (Szliszka vd 2011, Szliszka ve Krol 2011, Szliszka vd 2013). FA, reaktif oksijen türlerini uzaklaştırarak ya da hücre döngüsü üzerine etki ederek kanser gelişimini engellemektedir. Ayrıca özellikle Bcl-XL ve BCL2 gibi antiapoptotik proteinleri engelleyerek antiproliferatif ve antimetastatik etki göstermektedir (Manson vd 1997, Karthikeyan vd 2011). Ferulik asit ve türevlerinin tedavi edici etkilerinin ana etki mekanizmaları tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.7).

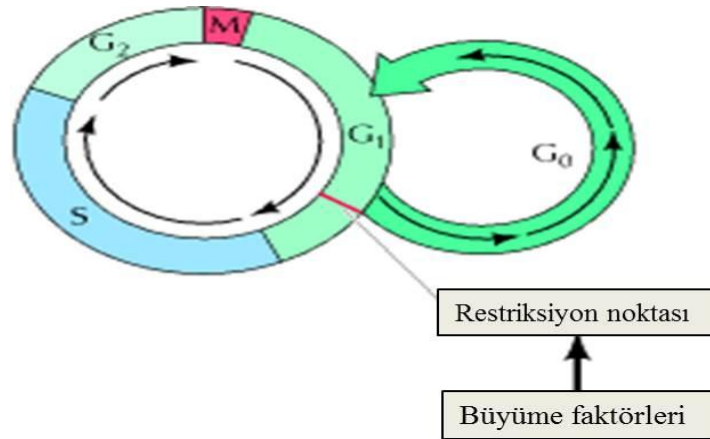
Tablo 2.7 Ferulik asit ve türevlerinin tedavi edici etkilerinin ana etki mekanizmalarının özeti (Mancuso ve Santangelo 2014)

Hastalıklar	Etki Mekanizmaları
Alzheimer Hastalığı	↓Nöroenflamasyon (↓IL-1 β) ↓Apoptoz(↓kaspaz aktivasyonu) ↓ β -sekretaz aktivitesi ↑Sitoprotektif sistemler (ERK1/2, Akt) ↑Antioksidan enzimler (HO-1, Hsp70)
Kanser	↑Sentromer birleşmesi (↑RABGAP1,CRP2) ↑Antioksidan enzimler (↑SOD, CAT) ↑Hücre döngüsünün baskılanması (↑SMC1L1, ↓CCNA2, CCNB1, MYC, ODC1) ↓COX-2 aktivitesi
Kardiyovasküler Hastalıklar	↓Hipertansiyon (↓anjiotensin II, ↑NO sentezi,↓ süperoksit anyonu) ↑Sol ventrikül performansı ↓Potasyum kanallarını ve beta adrenoseptörleri ↑Böbrek fonksiyonları ↓Serum lipidleri
Diyabet	↓NF-kB ↑Plazma insülini ↓Glisemi (↑glikojen sentezi,↑glukokinaz) ↓Maltaz ve sükröz Aktiviteleri ↓Aldoz redüktaz aktivitesi ↓TGF- β ↑Metformin ve THD'nin tedavi edici etkileri

Bitki fitokimyasallarının kanser, kardiyovasküler hastalıklar, enfeksiyon ve inflamasyon gibi bir takım hastalıklar üzerinde önleyici etkisinin olduğu bir çok çalışmada rapor edilmiştir. Bazı *in vitro* çalışmalar gallik asit (Lu vd 2010), kafein (Kawano vd 2012), vanilik asit (Erdem vd 2012) ve ferulik asit (Karthikeyan vd 2011) gibi fitokimyasalların bazı hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiğini bildirmiştir. Günümüzde doğal ürünlerden elde edilen çoğu sitotoksik ajan yeni antikanser ilaçların keşfi için araştırılmaktadır.

2.4. Hücre Döngüsü

Bölünebilme yeteneğine sahip hücreler ekstraselüler sinyaller ve büyüme faktörleri tarafından uyarıldıklarında büyüebilmekte ve bölünebilmektedirler. Çok hücreli organizmalarda ölü ve hasarlı dokunun yenilenmesinde hücre bölünmesi çok önemlidir. Hücrelerin büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesi gerekmektedir; aksi takdirde, organların ve dokuların bütünlüğü uygun olmayan hücre tipleri ve hücre miktarları tarafından bozulabilmektedir. Hücre çoğalmasında normal düzenleme, hücre döngüsü aşamalarını, hücre ölümlerinin programlanmasını ve aşırı büyüme sinyallerine karşı hücrelerin cevaplarını kontrol eden çok sayıda gen tarafından kontrol edilmektedir. Kanseri hücrelerde bu genler mutasyona uğramıştır ve kontrol edilemeyen hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Bir hücre bölünmesinden diğer bir bölünmeye kadar büyüme ve bölünme şeklinde meydana gelen hücre faaliyetlerine hücre döngüsü denir. Hücre döngüsünde bir hücrenin oluşmasından hücrenin tekrar bölünmesine kadar geçen süreç, yani mitotik bölünmeler arasındaki süreç interfaz aşamasıdır. İnterfaz evresi genetik materyalin replike edildiği sentez evresi (S), sentez evresinden önceki evre (G1) ve sonraki evre (G2) olmak üzere 3'e ayrılmaktadır. G1 evresinde yapısal proteinler, RNA ve hücre elemanları (mitokondri, lizozomlar, ribozomlar, vs) sentezlenerek 2 katına çıkar. G1 evresinin sonuna doğru S evresine hazırlık olarak DNA replikasyonu için gerekli olan enzimlerin sentezi yapılır. Bu enzim üretimi de hücreyi sentez evresine girmesi için teşvik eder. G1'i hücrenin kromozomal DNA'sının kopyalandığı S fazı izler. Hücre DNA replikasyonunu tamamladıktan sonra G2 evresine girer. G2 evresi hücrenin bölünmeden önce yoğun protein sentezi yaptığı son basamaktır. Bölünmeye hazırlık olarak hücre mikrotübül organizasyon merkezinden iç ipliklerini oluşturacak mikrofilamentler meydana gelir. Hücre G2 evresinden sonra M evresine girer ve çoğalmış olan kromozomlar yoğunlaştırılır, kardeş kromozomlar zıt kutuplara ayrılır ve hücre ikiye bölünür. M evresi sonunda hücre döngüsü tamamlanmış olur (Klug vd 2009, Kasap vd 2010). Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre döngüsünün aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve dinlenme fazı denilen G0 fazında beklerler. G1 ve G2 kısaltmaları "gap" (ara, boşluk) sözcüğünden dolayı kullanılmaktadır. S fazına da bu fazda DNA sentezlendiği için S fazı denilmiştir. M aşamasında mitoz gerçekleştiği için M aşaması olarak adlandırılmıştır. G0 fazındaki hücreler hücre döngüsü içinde yer almayan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler bu fazda bölünme uyarısı aldıklarında G1 fazına girer ve döngünün ilk fazına girmiş olurlar (Şekil 2.5) (Cooper ve Hausman 2006).



Şekil 2.5 Hücre döngüsünün büyüme faktörleriyle düzenlenmesi (Cooper ve Hausman 2006)

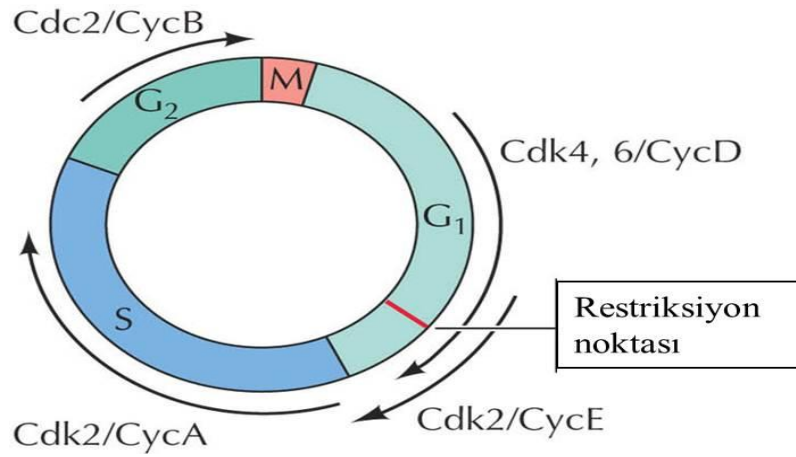
2.4.1. Siklin ve Siklin Bağımlı Kinaz Aileleri

Siklinler hücre döngüsünün çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinler olarak bilinmektedir. Siklinler hücre döngüsü sırasında uygun olan fazda sentezlenir ve görevini tamamladığında yıkılmaktadırlar. Siklin bağımlı kinazlar sadece siklinlere bağlı oldukları durumda aktive olan hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rollere sahip proteinlerdir (Esposito vd 2004). Siklinler spesifik siklin bağımlı kinaz olan tirozin kinazlarla kompleks oluşturmakta, onları aktifleştirmekte ve etkilerini düzenlemektedirler (Lowitz ve Casciato 2007).

Hücre döngüsü siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından düzenlenir. Siklinler (Cyc), siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin (CKI) düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklıdır.

Siklinler bir taraftan sentezlenip bir taraftan da yıkıldıkları için siklinler olarak adlandırılmaktadırlar. G₁'den S'ye geçiş, CycD ile bağlanan Cdk4 ve Cdk6, CycE ile bağlanan Cdk2 tarafından düzenlenmektedir. G₁ de restriksiyon noktasından geçişte Cdk6'nın D tipi siklinlerle (Cyc D1, D2 ve D3) oluşturduğu kompleksler kritik bir role sahiptir. G₁'in ilerleyen evresinde siklin E eksprese edilir ve Cdk2 ile kompleks oluşturur. Bu da G₁'den S'ye geçiş ve DNA sentezinin başlaması için gereklidir. S evresinde sürecin ilerlemesi için Cdk2'nin siklin A ile kompleks oluşturması gerekmektedir. G₂'den M'ye geçiş için Cdc2 (Cdk1) siklin B ile kompleks oluşturmaktadır (Şekil 2.6). Cdk'ların fosforillenmesi ile düzenlenmesinin yanı sıra aktiviteleri, inhibitör proteinlerinin (Cdk inhibitörleri veya CKI olarak adlandırılır)

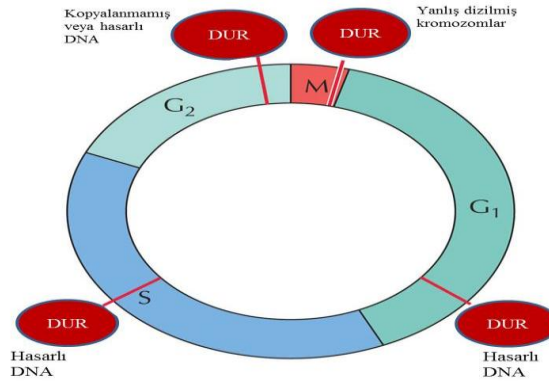
Cdk/Siklin komplekslerine bağlanması ile de kontrol edilebilmektedir. Memeli hücrelerinde Cip/Kip ve INK4 olmak üzere iki Cdk inhibitör ailesi Cdk/siklin komplekslerini düzenler (Cooper ve Hausman 2006).



Şekil 2.6 Siklin ve siklin-bağımlı kinaz kompleksleri (Cooper ve Hausman 2006)

2.4.2. Hücre Döngüsünün Kontrolü

Hücrelerin bölünmek için döngüye girmeleri çevreden gelen dış sinyallere ve iç sinyallere bağlıdır. Büyüme faktörleri ile uyarılan hücrede döngünün değişik evreleri arasında bir ilişki gereklidir. Bu ilişkinin sağlanması için kontrol noktalarına gereksinim vardır. Hücre döngüsünde evreler arasındaki ilişkiyi sağlayan önemli kontrol noktaları vardır. Önceki olaylarda hata varsa bu noktalarda dur işareti verilir ve döngü sonlandırılır (Şekil 2.7). Bu şekilde hasarlı kromozomların replike olması ve yavru hücrelere geçmesi engellenmiş olur (Kasap vd 2010).



Şekil 2.7 Hücre döngüsü kontrol noktaları (Cooper ve Hausman 2006)

2.4.2.1. G1 Kontrol Noktası

G1 kontrol noktası hücre döngüsünün G1 evresinden S evresine geçişini kontrol etmektedir. Uygun büyüme faktörleri varlığında yeterli besin varsa ve hücre yeteri kadar da büyümüşse hücre G1 evresini tamamlayarak S evresine geçer. Hücre bu koşulları sağlayamadığı durumda G0 evresine girer. Hatta bazı araştırmacılar G1 evresindeki kontrolün iki ayrı noktada yapıldığını savunmaktadırlar. Öncelikle hücrenin fizyolojik durumu ile çevresel etkilerin kontrol edildiği bir nokta, bir de DNA hasarlarının kontrol edildiği noktadan bahsedilmektedir. Hücre DNA'sında hasar olduğu durumlarda hasarın giderilmesi için döngü G1 evresinde durdurulur. Memeli hücrelerinde G1 noktasında durma p53 tümör baskılayıcı genin proteini ile sağlanır. DNA hasarı arttıkça p53 proteinin miktarı artar ve hücre döngüsünün G1 kontrol noktasında durmasını sağlar. Yapılan bir seri çalışmalar sonucunda da insan kanserlerinin çoğunda p53 geninin mutasyona uğradığı saptanmıştır. P53 geni mutasyona uğradığında kusurlu DNA olduğu durumlarda bu farkedilmez ve G1 de bekletilmez, böylece kusurlu DNA tamir edilmeden S evresine geçer ve kusurlu gen yavru hücrelere aktarılmış olur. Hasarlı DNA'nın yeni hücrelere aktarılması yeni mutasyonlara da zemin hazırlar (Kasap vd 2010). p53 CDKN1A (p21)'i uyararak ve ardından transkripsiyonel olarak DNA onarım enzimlerini aktive ederek DNA hasarına karşı hücre döngüsünü durdurmaktadır. Tüm tümörlerin yaklaşık %50'sinde p53 geninin mutasyona uğradığı rapor edilmiştir (Harry vd 1997).

2.4.2.2. G2 Kontrol Noktası

G2 kontrol noktasında replike olmamış DNA ve hasarlı olan DNA varlığında döngü durdurulmaktadır. Hücre dışı sinyallere yanıt veren G1 kontrol noktasından farklı olarak G2 kontrol noktası sadece DNA hasarına yanıt vermektedir. G2 kontrol noktası DNA kusursuz şekilde replike olmadan M fazına geçişi önlemektedir. DNA kusursuz şekilde replike olmadığı durumda hücre G2 de bekletilmektedir. Bekleme durumunda replikasyon tamamlanır ve hatalı DNA'nın tamiri sağlanırsa baskı kalkar ve döngü devam eder (Kasap vd 2010).

2.4.2.3. M Kontrol Noktası

Mitoz sonuna doğru görülen bu kontrol noktasında iğ ipliklerinin oluşmasına hem de iğ ipliklerinin sentromere tutunan kinetokorlar ile bağlanması kontrol edilmektedir. İğ iplikleri uygun bir şekilde biçimlendirilmemiş ya da kromozomlar iğ ipliklerine doğru bağlanmamış ise bölünme durdurulur. Kromozomların oğul hücrelere

eksiksiz olarak geçmesi bu noktada kontrol edilmektedir (Klug vd 2009, Kasap vd 2010).

2.4.3. Hücre Döngüsü İnhibitörleri

2.4.3.1. CDK İnhibitörleri (CKI)

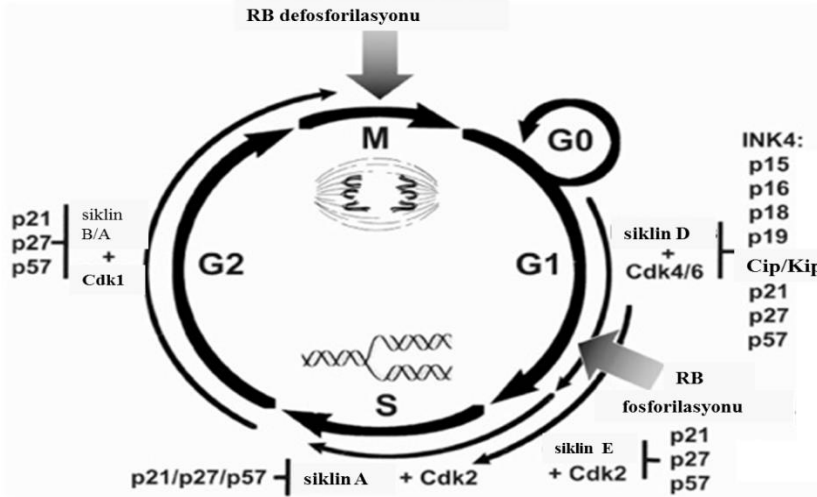
CDK inhibitörleri hücre döngüsünün negatif düzenleyicileridir ve 1993-1995 yıllarında tanımlanmışlardır. Hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumludurlar ve CDK'ların hücre döngüsündeki işlevlerini düzenlemektedirler (Tsihlias vd 1999, Zieske 2000). CDK inhibitörleri DNA hasarı, hücre-hücre teması, sitokin salınımı, hipoksi gibi çeşitli sinyallere cevap olarak birikmektedirler. Memeli hücrelerinde iki CDK inhibitör ailesi, farklı CDK/Siklin komplekslerinin düzenlenmesinde rol oynayan INK4/ARF ve Cip/ Kip aileleridir (Cooper ve Hausman 2006).

2.4.3.1.1. INK4/ ARF Ailesi

CDKN2A (p16), CDKN2B(p15), CDKN2C (p18) ve CDKN2D (p19) INK4/ARF ailesinin üyelerini oluşturmakta ve CDK inhibitörleri olarak tanımlanmaktadır. INK4/ARF ailesi siklin D-Cdk4/6 kompleksinin fosforilasyonunu engellemektedir. Bu ailenin üyeleri Cdk4 ve Cdk6'ya bağlanarak G1'deki restriksiyon noktasından geçişe engel olmaktadır (Şekil 2.8) (Donovan ve Slingerland 2000).

2.4.3.1.2. Cip/Kip (CDK İnhibitör Protein / Kinaz İnhibitör Protein) Ailesi

CDKN1A (p21Cip1), CDKN1B (p27Kip1) ve CDKN1C (p57Kip2), Cip/Kip ailesinin üyelerini oluşturmakta ve CDK inhibitörleri olarak tanımlanmaktadır. Siklin A/CDK2 ve siklin E/CDK2 komplekslerine bağlanarak G1/S kontrol noktasında anahtar rol oynayan RB geninin fosforilasyonunu engeller ve hücre döngüsünün durmasını kontrol etmektedirler. Bu ailenin üyeleri CDK aktivitesini düzenlemekte ve hücre döngüsü baskılanmasını uyarmaktadır (Şekil 2.8) (Zieske 2000). Cip/Kip ailesinin üyeleri CDK2, 4 ve 6'nın siklin A, D ve E ile yaptıkları komplekslere bağlanarak hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi denetlemektedirler. CKI'ların Cip/Kip ailesi hücre döngüsünün farklı evrelerinde hem aktivatör hem de inhibitör olarak rol oynamaktadırlar. Cip/Kip ailesi üyeleri CDK2/siklin A ve CDK2/siklin E komplekslerini baskılamaktadırlar (Cooper ve Hausman 2006).



Şekil 2.8 INK4 ve Cip/Kip aileleri (Donovan ve Slingerland 2000)

2.5. Apoptoz

İlk olarak Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanan apoptoz ya da programlı hücre ölümü fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü ifade etmektedir (Kerr vd 1972). Hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma ile hücre ölümünü kontrol eden aktif bir süreçtir. Apoptoz ayrıca bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde önemli role sahiptir. Kansere gelişimine neden olan mutasyona uğramış DNA'nın bulunduğu hücrelerin apoptoz ile ölmesi oldukça önemlidir. Apoptoz gen ürünleri ilerleyen bilim ile birlikte tanı ve tedavi için potansiyel hedef olmuşlardır ve yeni tedavi biçimlerinin geliştirilmesi için umut vericidir. Çok hücreli organizmalarda genetik hasarın onarılamadığı durumda hasarın ortadan kaldırılması apoptoz aracılığı ile gerçekleşmektedir. Apoptozun gerçekleşmesi genetik hasarın yayılması ve tümör oluşumunu önlemektedir (Güneş 2014).

Apoptotik süreçte kromatin kondenzasyonu, desmozomal bağlantı yıkımı, hücre yüzeyi spesifik yapı taşları kaybı ve diğer hücrelerle bağlantı özelliğinin kaybı önemli rol oynamaktadır (Igney vd 2002, McKnight vd 2005).

Omurgalılarda apoptotik yolda etkili olan proteinler kaspazlar olarak adlandırılmakta ve katalitik bölgelerinde sistein (c) rezidüsü taşıdıkları, hedef proteinleri C-uçlarında bulunan aspartat'dan (asp) kestikleri ve enzim (ase) görevi yaptıkları için kaspaz (caspase) olarak adlandırılmışlardır (Güneş 2014). İnsan hücrelerinde çok sayıda kaspaz tanımlanmıştır ve bu proteinler normal koşullarda hücrenin sitoplazmasında inaktif proenzim formunda bulunmaktadır. Bu inaktif proenzim

formunda kaspazlara prokaspaz denilmektedir. Hücreye ölüm uyarısı geldiğinde proteolitik bir işlem ile prokaspazlar aktif kaspazlara dönüşmektedir. Aktif kaspaz formu oluştuktan yaklaşık bir saat içinde apoptoz gerçekleşmektedir (Shibue ve Taniguchi 2006).

Kaspazlar 3 spesifik gruba ayrılmaktadır. Grup 1 kaspazlar (Kaspaz-1, 4, 5, 13) sitokinlerin maturasyonuna aracılık etmektedirler. Grup 2 kaspazlarda (Kaspaz-2, 3, 7) apoptozun asal efektörleri olarak bilinmektedirler. Grup 3 kaspazlar (Kaspaz-6, 8, 9, 10) grup 2 kaspazların aktivasyonunda görev almaktadır. Granzim-B de kaspazlara ek olarak başka bir proteazdır ve kaspaz aktivasyonunda görev alarak ya da kaspazların yerine fonksiyon göstererek apoptotik sürece katkıda bulunmaktadır (Bok ve Small 2002). Hücre ölümü ile ilgili mekanizmalar Şekil 2.9'da verilmiştir:

2.5.1. Mitokondri/ Sitokrom C Aracılı Hücre Ölümü (İntrinsik Yolak)

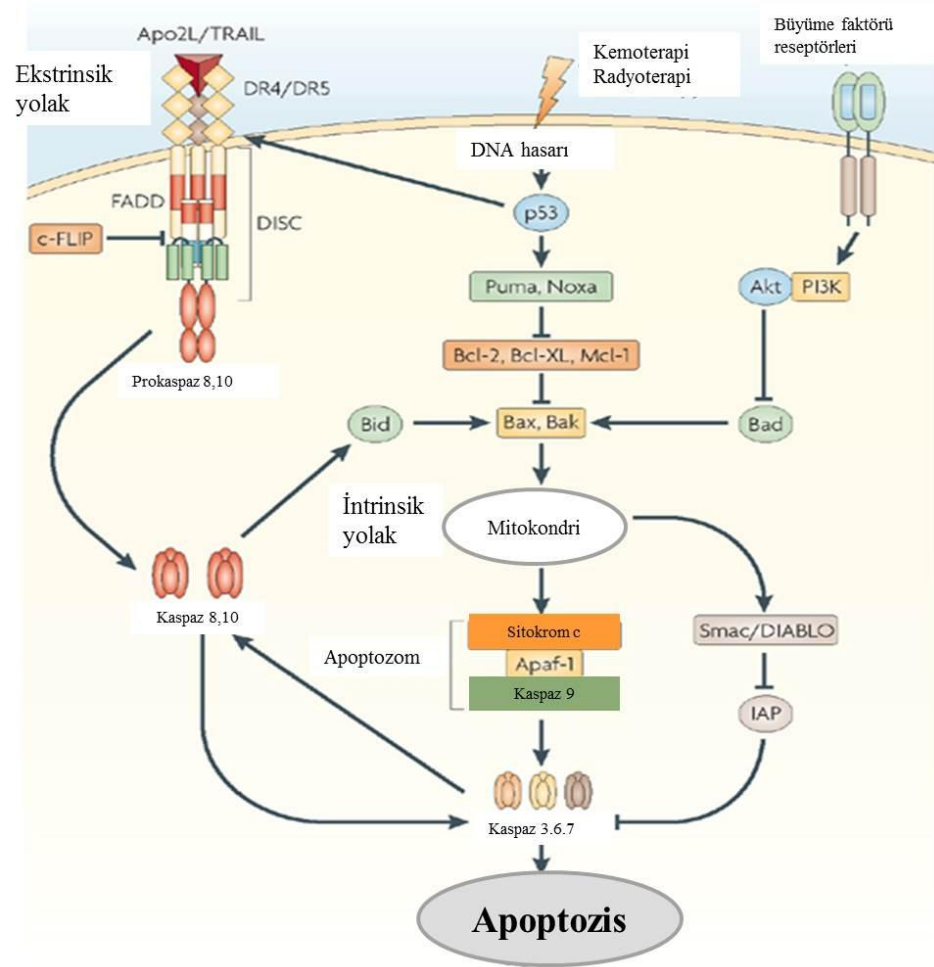
Bu hücre ölüm yoluğı dışarıdan gelen uyarılara (FAS, TNF) duyarlı değildir. DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyarı, apoptozun intrinsik yoluğını mitokondrinin dış membranına etki eden BCL2 ailesi proteinleri aracılığıyla indüklemektedir (Schultz ve Harrington 2003).

BCL2 transmembran bir bölgeye sahiptir ve mitokodri dış zarı, nükleus zarı ve endoplazmik retikulum zarında yer almaktadır. BCL2 her ne kadar apoptozu baskılıyor ise de bu protein ile ilişkili bazı diğer proteinler apoptozu desteklemektedir. Bu proteinlerden biri de Bax'tır. Sağlıklı hücrelerde mitokodrinin zarlar arasında yer alan sitokrom c'nin sitozole geçmesi apoptozu başlatmaktadır. Anti-apoptotik olan BCL2 sitokrom c'nin sitozole geçişini engellerken pro-apoptotik olan Bax, sitokrom c nin sitozole geçişine katkıda bulunmaktadır. Sitokrom c, APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1)'a bağlanır (Güneş 2014). Sitokrom c, APAF-1 ve prokaspaz-9 apoptozomu oluşturur. Prokaspaz-9 apoptozom içinde aktif formuna dönüşür ve kaspaz-9, bu yoluğın başlangıç kaspazıdır. Kaspaz-9, kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7 olmak üzere diğer 3 kaspazı aktive ederek apoptotik süreci tetikler (Igney vd 2002, McKnight vd 2005) (Şekil 2.9).

2.5.2. Ölüm Sinyalleri Aracılığı İle Hücre Ölümü (Ekstrinsik Yolak)

Hücre ölümü, yaşam sinyalleri yokluğunda ortaya çıkıyorsa da, ölüm sinyalleri varlığında da ortaya çıkmaktadır. FAS ligand gibi bir ölüm faktörü ve ya tümör nekroz faktörü (TNF) sırası ile FAS reseptörü ve TNF reseptörü gibi transmembran

ölüm reseptörü tarafından kabul edilir. FAS ligand komşu hücrelerin plazma membranına bağlıdır. Ligand ölüm reseptörlerine bağlandığı zaman yapısal bir değişiklik meydana gelir ve birkaç reseptör bir araya gelir, oligomerizasyon gerçekleşir. Böylelikle hücre dışından gelen moleküllerin bağlanmasıyla kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır (Khosravi-Far ve Esposti 2004). Başlatıcı kaspaz olarak görev alan kaspaz-8 diğer kaspazları (kaspaz-3, 6, 7) aktive eder ve apoptoz gerçekleşir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Apoptotik sinyal iletim yollarının basamakları (Ashkenazi 2008)

2.6. Hücre Hatları

Hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve *in vitro* kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre hattı kullanımının bir takım avantajları bulunmaktadır. Muamele edilmeleri kolaydır ve sınırlı koşullarda bile limitsiz üreyebilme

yeteneğindedirler. Ayrıca, yüksek derecede homojenite gösterirler ve donmuş stoklardan kolaylıkla kullanılabilir hale getirilebilirler. Ancak, bir takım dezavantajları da bulunmaktadır. Hücre hatları sürekli kültürde genotipik ve fenotipik sapmalara eğilimlidirler. Ayrıca, alt kültürler oluşabilir ve zaman içerisinde popülasyonda bulunan daha hızlı büyüyen ve özellikli klonların seçimiyle fenotipik değişikliklere neden olabilirler. Bu çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri tablo 2.8'de gösterilmiştir.

Tablo 2.8 PC-3 ve LNCaP hücre hatlarının özellikleri (WEB_9) (WEB_10)

	PC-3 Hücre Hattı	LNCaP Hücre Hattı
Organizma	<i>Homo sapiens</i> (insan)	<i>Homo sapiens</i> (insan)
Doku	Prostat; kemik metaztazından elde edilmiş	Prostat; sol supraklaviküler lenf nodu metaztazından elde edilmiş
Morfoloji	Epitelyal	Epitelyal
Kültür Özellikleri	Yapışarak üreyen	Yapışarak üreyen
Hastalık	Evre-4, adenokarsinom	Karsinom
Yaş	62 yaş	50 yaş
Cinsiyet	Erkek	Erkek
Etnik Köken	Kafkas	Kafkas
Saklama Koşulları	Sıvı Azot	Sıvı Azot

2.7. Hipotez

Günümüzde sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalarla birlikte doğal antioksidan kaynağı olan meyve, sebze, baharat ve bitkisel çaylara olan ilgi artmıştır. Çalışmada da pirinç, yulaf, kahve, turunçgiller, elma ve yabanmersini başta olmak üzere sebze ve meyvelerde bol bulunan fenolik bir bileşik olan ferulik asit kullanılmıştır. Fenolik bileşikler zararlı oksidatif süreçlerin inhibitörleri ve potansiyel antioksidanları olarak tanımlanmaktadır. Literatür taraması yapıldığında ferulik asitin hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarla serbest radikalleri uzaklaştırma ve sitoprotektif enzimleri uyarma gibi etkilerinden dolayı kanser terapisinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle ferulik asitin prostat kanseri terapisinde önemli olabileceği ve bu etkinin hücre döngüsü ve apoptoz genleri üzerinden etki gösterebileceği hipotezi ile yola çıkılmıştır. Prostat kanseri üzerine etkisi

ayrıca invazyon ve koloni oluřturma yetenekleri ile de ilgili olabileceđi dūřüncesi ile invazyon ve koloni oluřturma kapasitelerinin deđerlendirilmesi planlanmıřtır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada insan androjen bağımsız PC-3 ve androjen bağımlı LNCaP prostat kanseri model hücre hatları stoklarında hatlarında ferulik asitin etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda ferulik asitin etkilerinin hüresel ve moleküler yöntemlerle analiz edilmesi planlanmıştır.

3.1. Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihaz/Malzeme	Marka
Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik)	Biohit
CO2'li inkübatör	Nuaire
Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow	Nuaire
Işık Mikroskobu	Olympus
İnverted Mikroskop	Olympus
Floresan Mikroskobu	Olympus
Steril kültür kapları (Petri) (100x20mm)	Greiner
96 kuyucuklu hücre kültür kabı	Greiner
Matrigel Invasion Chamber	BD Biosciences
Hassas Terazı	Denver Instrument
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Thermo
Santrifüj	Hettich Zentrifugen
Mikro Santrifüj	Hettich Zentrifugen
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen
Yatay Elektroforez Seti	BioRad
Dikey Elektroforez Seti	Wealtec

“Devamı Arkada”

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihaz/Malzeme	Marka
RT- PZR	Applied Biosystems StepOnePlus
Jel görüntüleme sistemi	DNR Bio-Imaging System
-20 Derin Dondurucu	BEKO
No Frost Buzdolabı	BEKO
Ph metre	Metler Toledo MP 220
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	IKA RH basic 2
Vorteks	IKA Yellow Line
Güç Kaynağı	BioRad
Mikrodalga Fırın	BEKO MD1500
Hücre Sayıcı	Nexcellom
-85°C Dondurucu	Nuaire

Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal/sarf	Marka
Tween-20	BioShop
Skim Milk	BioShop
Magnesium Chloride	BioShop
2-Mercaptoetanol	Merck
Bromfenol Mavisi	BioShop
Dietanolamin	BioShop
BCIP	BioShop
Fenazin metosülfat	Sigma
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	BioShop
Tris	BioShop
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma
Akrilamid	Sigma
Amonyum persulfat	Sigma
Coomassie Pırlanta Mavisi	BioShop
Asetik Asit	Merck
N,N-Metilenbisakrilamid	Sigma

"Devamı Arkada"

Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal/sarf	Marka
Glisin	Bioshop
Ferulik asit	Sigma
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics
XTT Reagent-Cell Proliferation Kit	Biological Industries
In Situ Cell Detection Kit	Roche
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Scientific
Trizol	Ambion
Fötal Sığır Serumu (Sıcaklık ile inaktive edilmiş)	Biological Industries
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries
RPMI-1640 Medyum	Biological Industries
DNAaz/RNase free su	Invitrogen
Tripan Mavisi Boyası (%0,5 (w/v) fizyolojik tuz içinde)	Santa Cruz
PBS	Biological Industries
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Roche
96-Kuyucuklu PCR Array Plate	Qiagen
Hoechst	Sigma

3.2. Ferulik Asit

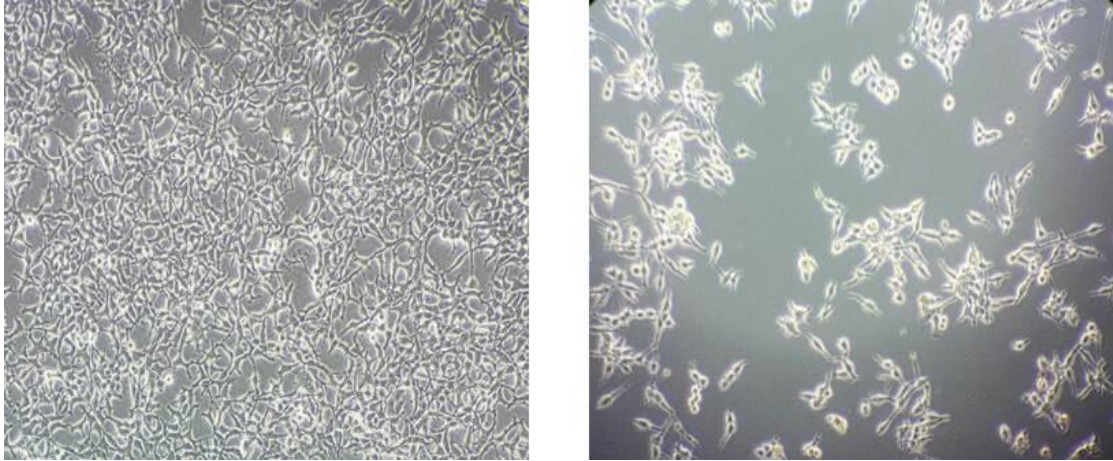
Çalışmada kullanılmış olan ferulik asit ticari olarak satın alınmıştır (Katalog no: 128708 SIGMA). $C_{10}H_{10}O_4$ kimyasal formülüne ve 194,18 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Katı formda bulunan ferulik asit +4°C saklama koşullarında muhafaza edilmiştir.

4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit açık kimyasal formülüne sahip ferulik asit RPMI-1640 besiyeri içinde çözülerek stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stoktan uygun seyreltmeler yapılarak çalışma konsantrasyonları elde edilmiştir.

3.3. Prostat Kanseri Model Hücre Hatlarının Oluşturulması

Çalışmamızda androjen bağımsız PC3 (ATCC® CRL-1435™) ve androjen bağımlı LNCaP (ATCC® CRL-1740™) insan prostat kanseri hücre hatları stoklarımızda mevcut olup stoklarımızdan kullanılmıştır (Şekil 3.1). PC-3 ve LNCaP hücrelerinin

çoğalmalarını sağlamak için %10 fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 100 IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. Hücrelerin proliferasyonu, pasajlanmaları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlenmiş ve hücreler kendileri için uygun kültür ortamı olan 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmişlerdir. Hücrelerin yaşayabilmeleri, büyüebilmeleri ve üreyebilmeleri için *in vitro* koşulların uygun olması ve buldukları ortamların gerekli maddeleri içermeleri gerekmektedir.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan PC-3 (sol) ve LNCaP (sağ) hücre hatlarının genel görüntüsü (10X)

3.3.1. Hücre Hatlarının Dondurulması

- 1- Petrilerde yüzeye yapışarak (monolayer) üremiş olan hücreler tripsin ile muamele edilmiş, yapıştıkları yüzeyden kaldırılması sağlanmış ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj sonrası her bir santrifüj tüpü için 1,5 ml'lik kriyotüpler hazırlanmıştır.
- 2- 9:1 oranında besiyeri-DMSO (Dimetil sülfoksit) karışımından oluşan ortam hazırlanmıştır.
- 3- Tüplerde bulunan süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üzerine hazırlanan besiyeri-DMSO karışımı eklenerek kriyotüplere alınmıştır.
- 4- Hazırlanan kriyotüpler -85°C'ye kaldırılmıştır.

3.3.2. Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

- 1- Derin dondurucuda (-85°C) kriyotüpler içerisinde bulunan %10 DMSO ile dondurulmuş hücre hatları 37°C'ye alınmıştır.

- 2- DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi bulunmaktadır. Bu etkiyi azaltmak amacıyla kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besiyeri ilave edilmiştir. Pastör pipeti yardımıyla karıştırılarak hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alınmıştır.
- 3- Santrifüj tüpü içerisine yaklaşık 10 ml daha besiyeri ilave edilerek 1500 rpm' de 4 dakika santrifüj edilmiştir.
- 4- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin üzerine 8 ml besiyeri eklenerek petrilere alınmıştır.
- 5- Petriler, 37°C'deki %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüve konulmuştur.
- 6- Hücreler bütün petri yüzeyini kaplayana kadar 2 günde bir besiyeri değiştirilmiştir ve petri yüzeyi dolduğunda hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla pasaj yapılmıştır.

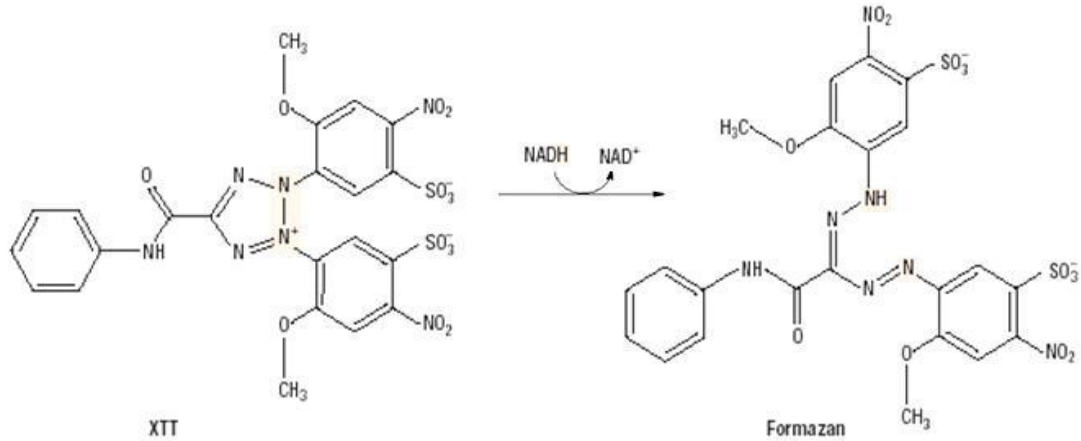
3.3.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması

PC-3 ve LNCaP hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanmasında izlenen basamaklar aşağıda özetlenmiştir:

- 1- RPMI-1640 besiyeri ile üreyen PC-3 ve LNCaP hücreleri, içerisinde 8 ml besiyeri bulunan petrilere ekilmiştir. 37°C'de ve %95 nem, % 5 CO₂'li etüvde iki güne bir ortamları değiştirilerek çoğaltılmıştır.
- 2- Çalışmada kullanılan hücreler yapışarak üreyen hücreler oldukları için hücrelerin pasajlanma öncesinde yapıştıkları yüzeyden kaldırılmaları gerekmektedir. Bu nedenle petrilere bulunan ortam çekilip hücreler PBS ile bir kez yıkanmıştır.
- 3- PBS ile yıkama sonrasında petriye 1.5 ml tripsin ilave edilmiştir. Petriler ortalama 3-4 dakika inkübatörde bekletilmiştir.
- 4- Hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir.
- 5- Petride bulunan tüm hücreler kalktıktan sonra, 3 ml besiyeri ilave edilmiştir.
- 6- Petride bulunan hücre, tripsin ve besiyeri karışımı 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınmış ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.
- 7- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklatılıp oluşan hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.
- 8- Petrilere 8 ml besiyeri konulmuş ve hücre yoğunluğuna bakılarak petrilere hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.
- 9- Petriler hücrelerin çoğaltılması için inkübatöre kaldırılmıştır.

3.4. Ferulik Asitin Hücre Canlılığına Etkisinin Tayini

XTT (2,3- bis- (2- methoxy- 4- nitro- 5- sulfophenyl)- 2H- tetrazolium- 5- carboxanilide) suda eriyebilen bir bileşiktir ve canlı hücrelerce turuncu renkli formazan (Şekil 3.2) bileşenlerine indirgenmektedir. Formazan oluşumu, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Suda çözünebilir özellikte olan boyanın yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga boylarında okutulabilmektedir.



Şekil 3.2 XTT'nin formazana dönüşümü (WEB_11)

Ferulik asit toksisitesi XTT testi ile belirlenmiştir. Toz halinde bulunan ferulik asit 0–2 mM aralığındaki çalışma konsantrasyonları RPMI-1640 besiyeri ile hazırlanmıştır. Aşağıdaki protokol uygulanarak FA'nın hücrelerdeki sitotoksitesini belirlenmiştir.

- 1- Petrilere ekilen ve flask yüzeyini kaplayan hücreler tripsinizasyon işlemi ile petrinin yüzeyinden kaldırılmıştır.
- 2- İşlem sonrasında hücreler üzerine 3 ml besi ortamı ilave edilmiş ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.
- 3- Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir.
- 4- Bir eppendorfa, 400 µl PBS (fosfat tampon tuzu), 100 µl hücre, 1µl tripan mavisi konulmuştur. Daha sonra bu karışımdan 20 µl alınarak hücre sayma lamına konulmuş ve hücre sayıcı cihazında hücreler sayılmıştır.
- 5- Elde edilen hücre sayısına göre her kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde 100'er µl hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plakalara dağıtılmıştır.
- 6- Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenmiştir. Kontrol kuyucukları dışında ferulik asit gruplarına sırasıyla 100 µl içindeki son konsantrasyonları 20µM- 30µM-

50µM- 75µM- 100µM- 150µM- 200µM- 250µM- 300µM- 350µM- 500µM- 750µM- 900µM- 1mM- 2mM dozlarda ferulik asit ilave edilmiştir.

7- 24-48 ve 72 saatin sonunda kuyucukların ortamları çekilmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µL taze besiyeri koyulduktan sonra 50 µL XTT solüsyonu (49 µl reagent solüsyon+1 µL aktivatör solüsyonu) eklenmiştir. XTT solüsyonu eklenmesinden 4 saat sonra çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (\text{Ölçülen optik dansite değeri}) / (\text{Kontrol optik dansite değeri}) \times 100$$

3.5. Hücre Döngüsü ve Apoptoz Gen Ekspresyonları

Prostat kanser hücrelerinin kontrol ve FA doz gruplarında hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyonları Applied Biosystems StepOnePlus gerçek zamanlı PZR ile kantitasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu, Trizol solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulanarak gerçekleştirildi.

- 1- 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına hücreler 2×10^5 /kuyucuk olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat yapışmaları için bekletilmiştir.
- 2- 24 saat sonra uygun FA dozları uygulanmıştır ve 48 saat hücreler inkübe edilmiştir.
- 3- 48 saat sonra her bir kuyucuğa 500 µl trizol konulup kuyucuklar (kazıyıcı) scraper ile kazınmıştır ve her bir kuyucuk ayrı ependorflara aktarılmıştır.
- 4- Daha sonra üzerlerine 100 µl kloroform eklenmiş ve 15 sn vorteks yapılmıştır.
- 5- 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir ve sonrasında 4°C'de 15.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- 6- Santrifüj sonrasında total RNA alınmıştır ve üzerine 250 µl 2-propanol konularak -20 °C de bir gece bekletilmiştir.
- 4 °C de 15.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- 7- Bir gece bekletildikten sonra 4°C'de 15.000 rpm de 15 dakika santrifüj ile devam edilmiştir.

8- Süpernatant kısmı atılıp pelete 500 µl %70'lik etanol eklenip 4 °C'de 15.000 rpm de 15 dk santrifüj edilmiştir.

9- Pelet 50 µl RNAz free su ile çözülmüş ve -20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları nanodropta ölçülmüştür. Nanodrop cihazına 1 µl RNA örneğinden konulup ng/µl cinsinden RNA konsantrasyonu ölçülmüştür. cDNA sentezi sırasında 2 µg RNA kullanılması sağlanmıştır.

3.5.2. cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'lardan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) kullanılarak cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi iki aşamada gerçekleştirilmiştir:

Tablo 3.3 cDNA sentezinin ilk aşaması

Ajan	Hacim	Son Miktar
Su	1 µl	
Total RNA	Değişken	2 µg
“Anchored-oligo” (dT) ₁₈ primeri (50 pmol/µl)	1 µl	2,5 µM

Yukarıdaki karışım hazırlandıktan sonra 65°C' de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşaması sonrasında cDNA sentezinin ikinci aşama Tablo 3.4' de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4 cDNA sentezinin ikinci aşaması

Ajan	Hacim	Son Miktar
Transkriptör RT Reaksiyon Tamponu	4 µl	1 X
Koruyucu RNAz İnhibitörü (40U/µl)	0,5 µl	20 U
Deoksinükleotid karışımı	2 µl	1 Mm
Transkriptör Revers Transkriptaz	0,5 µl	10 U
Son hacim	20 µl	

Elde edilen reaksiyon karışımı 55°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra cDNA'lar elde edilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere 20°C de muhafaza edilmiştir.

3.5.3. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Gerçek Zamanlı PZR, gen ekspresyon ürününün kantitatif olarak analiz edilebildiği bir metoddur. Uzun yıllardır PZR'lerde sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleri ile birleştirilmesiyle gerçek zamanlı PZR'ler geliştirilmiştir. Bu yöntemin en büyük avantajı kantitatif olarak kısa sürede sonuç alınmasıdır. Analiz reaksiyon sırasında gerçekleşmektedir ve yarı kantitatif PZR 'lerde alınan ürünün agaroz jel elektroforezinde görüntülemek gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.

Applied Biosystems StepOnePlus cihazı kullanılarak 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili olarak 84' er genin ekspresyonlarına sisteme uygun hazır panel plate'leri kullanılarak bakılmış olup çalışılan genler Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.5 Hücre döngüsünde görevli genler ve tanımlamaları

Pozisyon	Gen	Tanımlama
A01	ABL1	C-abl Onkogen 1, Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz
A02	ANAPC2	Anafaz Teşvik Edici Kompleks Altünite 2
A03	ATM	Ataxia Telangiectasia Mutasyonu
A04	ATR	Ataxia Telangiectasia ve Rad 3 İlişkili
A05	AURKA	Aurora Kinase A
A06	AURKB	Aurora Kinase B
A07	BCCIP	BRCA2 ve CDKN1A Etkileşimli Protein
A08	BCL2	B-hücre CLL/lenfoma 2
A09	BIRC5	Boculoviral IAP Tekrarlı 5
A10	BRCA1	Meme Kanseri 1, Erken Başlangıçlı
A11	BRCA2	Meme Kanseri 1, Erken Başlangıçlı
A12	CASP3	Caspase 3, Apoptoz İlişkili Sistein Peptidaz
B01	CCNA2	Siklin A2
B02	CCNBI	Siklin B1
B03	CCNB2	Siklin B2
B04	CCNC	Siklin C
B05	CCND 1	Siklin D1
B06	CCND2	Siklin D2
B07	CCND3	Siklin D3
B08	CCNE1	Siklin E1

“Devamı Arkada”

Tablo 3.5 Hücre döngüsünde görevli genler ve tanımlamaları

Pozisyon	Gen	Tanımlama
B09	CCNF	Siklin F
B10	CCNG1	Siklin G1
B11	CCNG2	Siklin G2
B12	CCNH	Siklin H
C01	CCNT1	Siklin T1
C02	CDC16	Hücre Bölünme Döngüsü 16 Homolog (S. <i>cerevisiae</i>)
C03	CDC20	Hücre Bölünme Döngüsü 20 Homoloğu (S. <i>cerevisiae</i>)
C04	CDC25A	Hücre Bölünme Döngüsü 25 Homoloğu A (S. <i>pombe</i>)
C05	CDC25C	Hücre Bölünme Döngüsü 25 Homoloğu C (S. <i>pombe</i>)
C06	CDC34	Hücre Bölünme Döngüsü 34 Homoloğu (S. <i>cerevisiae</i>)
C07	CDC6	Hücre Bölünme Döngüsü 6 Homoloğu (S. <i>cerevisiae</i>)
C08	CDK1	Siklin Bağımlı Kinaz 1
C09	CDK2	Siklin Bağımlı Kinaz 2
C10	CDK4	Siklin Bağımlı Kinaz 4
C11	CDK5R1	Siklin Bağımlı Kinaz 5, Düzenleyici Altünite 1 (p35)
C12	CDK5RAP1	CDK5 Düzenleyici Altünite ile İlişkili Protein 1
D01	CDK6	Siklin Bağımlı Kinaz 6
D02	CDK7	Siklin Bağımlı Kinaz 7
D03	CDK8	Siklin Bağımlı Kinaz 8
D04	CDKN1A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A (p21, CIP1)
D05	CDKN1B	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (p27, KIP1)
D06	CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A (p16, CDK4 inhibitörü)
D07	CDKN2B	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2B (p15, CDK4 inhibitörü)
D08	CDKN3	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 3
D09	CHEK1	CHK1 Kontrol Noktası Homoloğu (S. <i>pombe</i>)
D10	CHEK2	CHK2 Kontrol Noktası Homoloğu (S. <i>pombe</i>)
D11	CKS1 B	CDC28 Protein Kinaz Düzenleyici Altünite 18
D12	CKS2	CDC28 Protein Kinaz Düzenleyici Altünite 2
E01	CUL1	Cullin 1
E02	CUL2	Cullin 2
E03	CUL3	Cullin 3
E04	E2F1	E2F Transkripsiyon Faktör 1
E05	E2F4	E2F Transkripsiyon Faktör 4, p107/p130-Bağlayıcı
E06	GADD45A	Büyüme durdurma ve DNA-hasarı-indükleyici, alfa
E07	GTSE1	G-2 ve S Fazı İfade 1
E08	HUS1	HUS1 Kontrol Noktası Homoloğu (S. <i>pombe</i>)
E09	KNTC1	Kinetokor İlişkili 1
E10	KPNA2	Karyopherin Alfa 2 (RAG kohort 1, impartin alfa 1)
E11	MAD2L1	MAD2 Mitotik Tutuklama Eksikliği-1 (maya)

"Devamı Arkada"

Tablo 3.5 Hücre döngüsünde görevli genler ve tanımlamaları

Pozisyon	Gen	Tanımlama
E12	MAD2L2	MAD2 Mitotik Tutuklama Eksikliği-2 (maya)
F01	MCM2	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 2
F02	MCM3	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 3
F03	MCM4	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 4
F04	MCM5	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 5
F05	MDM2	Mdm2 p53 Bağlayıcı Protein Homoloğu (fare)
F06	MKI67	Monoklonal Antikor Ki-67 Tarafından Tanımlanan Antijen
F07	MNAT1	Trois Homoloğu Menage 1, Siklin H Birleştirme Faktörü (<i>Xenopus laevis</i>)
F08	MRE11A	MRE11 Mayotik Rekombinasyon 11 Homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
F09	NBN	Nibrin
F10	RAD1	RAD1 Homoloğu (<i>S. pombe</i>)
F11	RAD17	RAD17 Homoloğu (<i>S. pombe</i>)
F12	RAD51	RAD51 Homoloğu (<i>S. cerevisiae</i>)
G01	RAD9A	RAD9 Homolog A (<i>S. pombe</i>)
G02	RB 1	Retinoblastoma 1
G03	RBBP8	Retinoblastoma Bağlayıcı Protein 8
G04	RBL1	Retinoblastoma-Benzeri 1 (p107)
G05	RBL2	Retinoblastoma-Benzeri 2 (p130)
G06	SERTAD1	SERTA Domain İçeren 1
G07	SKP2	S-Faz Kinaz-İlişkili Protein 2 (p45)
G08	STMN1	Stathmin 1
G09	TFDP1	Transkripsiyon Faktör Dp-1
G10	TFDP2	Transkripsiyon Faktör Dp-2 (E2F Dimerleştirme Ortağı 2)
G11	TP53	Tümör Protein p53
G12	WEE1	WEE1 Homoloğu (<i>S. pombe</i>)
H01	ACTB	Aktin, Beta
H02	B2M	Beta-2-Mikroglobulin
H03	GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
H04	HPRT1	Hipoksantin Fosforiboziltransferaz 1
H05	RPLPO	Ribosomal Protein, Büyük, PO
H06	HGDC	İnsan Genomik DNA Kontaminasyonu
H07	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H08	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H09	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H10	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H11	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H12	PPC	Pozitif PCR Kontrol

Tablo 3.6 Apoptozda görevli genler ve tanımlamaları

Pozisyon	Sembol	Tanımlama
A01	ABL1	C-abl Onkogen 1, Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz
A02	AIFM1	Apoptoz-İndükleyici Faktör, Mitokondriyal ilişkili, 1
A03	AKT1	V-akt MürinTimus Viral Onkogene Homolog 1
A04	APAF1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
A05	BAD	BCL2-İlişkiliHücre Ölümü Agonisti
A06	BAG1	BCL2-İlişkili Athanogen
A07	BAG3	BCL2- İlişkili Athanogen 3
A08	BAK1	BCL2-Antagonist/killer 1
A09	BAX	BCL2-İlişkili X Protein
A10	BCL10	B-hücre CLL/lenfoma 10
A11	BCL2	B-hücre CLL/lenfoma 2
A12	BCL2A1	BCL2-Bağlantılı Protein A1
B01	BCL2L1	BCL2-like 1
B02	BCL2L10	BCL2-like 10 (Apoptosis Kolaylaştırıcı)
B03	BCL2L11	BCL2-like 11 (Apoptosis Kolaylaştırıcı)
B04	BCL2L2	BCL2-Like 2
B05	BFAR	Bifonksiyonel Apoptosis Düzenleyici
B06	BID	BH3 Etkileşim Domain Ölüm Agonist
B07	BIK	BCL2-İlişki Öldürücü (Apoptosis-indükleyici)
B08	BIRC2	Baculoviral IAP Repeat Containing 2
B09	BIRC3	Baculoviral 1AP Repeat Containing 3
B10	BIRC5	Baculoviral 1AP Repeat Containing 5
B11	BIRC6	Baculoviral IAP Repeat Containing 6
B12	BNIP2	BCL2/adonovirus E1 B 19kDa Etkileşim Protein 2
C01	BNIP3	BCL2/adonovirus E1 B 19kDa Etkileşim Protein 3
C02	BNIP3L	BCL2/adonovirus E18 19kDa Etkileşim Protein 3-like
C03	BRAF	V-raf Mürin Sarkoma Viral Onkogen Homolog B1
C04	CASP1	Caspase 1, Apoptosis-ilişkili Sistein Peptidaz (interleukin 1, beta, convertaz)
C05	CASP10	Caspase 10, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
C06	CASP14	Caspase 14, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
C07	CASP2	Caspase 2, - Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
C08	CASP3	Caspase 3, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
C09	CASP4	Caspase 4, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
C10	CASP5	Caspase 5, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
C11	CASP6	Caspase 6, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
C12	CASP7	Caspase 7, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
D01	CASP8	Caspase 8, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz

"Devamı Arkada"

Tablo 3.6 Apoptozda görevli genler ve tanımlamaları

Pozisyon	Sembol	Tanımlama
D02	CASP9	Caspase 9, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz
D03	CD27	CD27 Molekül
D04	CD40	CD40 Molekül, TNF Reseptör Süperailisi üyesi 5
D05	CD40LG	CD40 Ligand
D06	CD70	CD70 Molekül
D07	CFLAR	CASP8 and MOD-like Apoptosis Düzenleyici
D08	CIDEA	Hücre Ölümü İndükleyici DFFA-like Effektör A
D09	CIDEB	Hücre Ölümü İndükleyici DFFA-like Effector B
D10	CRADD	CASP2 ve RIPK1 Domain İçeren Ölüm Domainli Adaptor
D11	CYCS	Sitokrom c, Somatik
D12	DAPK1	Ölüm İlişkili Protein Kinaz 1
E01	DFFA	DNA Fragmentasyon Faktör, 45kDa, alfa Polipeptid
E02	DIABLO	Diablo, IAP-bağlayıcı Mitokondriyal Protein
E03	FADD	Fas (TNFRSF6)-ilişkili Ölüm Domaini
E04	FAS	Fas (TNF Reseptör Süperailisi, Üye 6)
E05	FASLG	Fas Ligand (TNF süperailisi, üye 6)
E06	GADD45A	Büyümeyi Durdurucu and DNA-hasarı-indükleyebilir, alfa
E07	HRK	Harakiri, BCL2 İlişkili Protein (sadece BH3 domain içerir)
E08	IGF1R	insülin-Benzeri Büyüme Faktör 1 Reseptörü
E09	IL10	İnterlökin 10
E10	LTA	Lenfotoksin Alfa (TNF süperailisi, üye 1)
E11	LTBR	Lenfotoksin Beta Receptor (TNFR süperailisi, üyesi 3)
E12	MCL1	Myeloid Lösemi Hücreci Sekans 1 (BCL2-ilişkili)
F01	NAIP	NLR ailesi, Apoptosis inhibitör Protein
F02	NFKB1	Nükleer Faktör Kappa B 1, Polipeptit Gen Enhansır B-Hücre 1
F03	NOD1	Nükleotit-Bağlayıcı Oligomerizasyon Domain 1 İçeren
F04	NOL3	Nucleolar Protein 3 (Apoptosis Represor ile CARD Domain)
F05	PYCARD	PYD and CARD Domain İçeren
F06	RIPK2	Reseptör-etkileşimli Serine-thronin Kinaz 2
F07	TNF	Tümör Nekroz Factor
F08	TNFRSF10A	Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süperailisi, Üyesi 10a
F09	TNFRSF10B	Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süperailisi, Üyesi 10b
F10	TNFRSF11B	Tümör Nekroz Faktör Receptor Süperailisi, Üyesi 11b
F11	TNFRSF1A	Tümör Nekroz Factor Receptor Süperailisi, Üyesi 1A

"Devamı Arkada"

Tablo 3.6 Apoptozda görevli genler ve tanımlamaları

Pozisyon	Sembol	Tanımlama
F12	TNFRSF1B	Tümör Nekroz Faktör Reseptor Süperailisi, Üyesi 18
G01	TNFRSF21	Tümör Nekroz Faktör Reseptor Süperailisi, Üyesi 21
G02	TNFRSF25	Tümör Nekroz Faktör Reseptor Süperailisi, Üyesi 25
G03	TNFRSF9	Tümör Nekroz Factor Reseptor Süperailisi, Üyesi 9
G04	TNFSF10	Tümör Nekroz Faktör (ligand) Süperailisi, Üye,10
G05	TNFSF8	Tümör Nekroz Faktör (ligand) Süperailisi, Üyesi 8
G06	TP53	Tümör Protein p53
G07	TP53BP2	Tümör Protein p53 Bağlayıcı Protein, 2
G08	TP73	Tümör Protein p73
G09	TRADD	TNFRSF1A-İlişkili Ölüm Domain
G10	TRAF2	TNF Reseptor-İlişkisi Faktör 2
G11	TRAF3	TNF Reseptor-İlişkisi Faktör 3
G12	XIAP	X-bağlantılı apoptoz İnhibitör
H01	ACTB	Aktin, Beta
H02	B2M	Beta-2-mikroglobülin
H03	GAPDH	Gliseraldehid-3-Fosfat – Dehidrogenaz
H04	HPRT1	Hipoksantinfosfo Ribozil Transferaz 1
H05	RPLPO	Ribozomal Protein, Büyük, PO
H06	HGDC	İnsan Genomik DNA Kontaminasyonu
H07	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H08	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H09	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H10	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H11	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H12	PPC	Pozitif PCR Kontrol

Tablo 3.7 Hücre döngüsü genlerinin plate düzeni

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1	ANAPC2	ATM	ATR	AURKA	AURKB	BCCIP	BCL2	BIRC5	BRCA1	BRCA2	CASP3
B	CCNA2	CCNB1	CCNB2	CCNC	CCND1	CCND2	CCND3	CCNE1	CCNF	CCNG1	CCNG2	CCNH
C	CCNT1	CDC16	CDC20	CDC25A	CDC25C	CDC34	CDC6	CDK1	CDK2	CDK4	CDK5R1	CDK5RAP1
D	CDK6	CDK7	CDK8	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2A	CDKN2B	CDKN3	CHEK1	CHEK2	CKS1B	CKS2
E	CUL1	CUL2	CUL3	E2F1	E2F4	GADD45A	GTSE1	HUS1	KNTC1	KPNA2	MAD2L1	MAD2L2
F	MCM2	MCM3	MCM4	MCM5	MDM2	MKI67	MNAT1	MRE11A	NBN	RAD1	RAD17	RAD51
G	RAD9A	RB1	RBBP8	RBL1	RBL2	SERTAD1	SKP2	STMN1	TFDP1	TFD2	TP53	WEE1
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tablo 3.8 Apoptoz genlerinin plate düzeni

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1	AIFM1	AKT1	APAF1	BAD	BAG1	BAG3	BAK1	BAX	BCL10	BCL2	BCL2A1
B	BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11	BCL2L2	BRAF	BID	BIK	BIRC2	BIRC3	BIRC5	BIRC6	BNIP2
C	BNIP3	BNIP3L	BRAF	CASP1	CASP10	CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7
D	CASP8	CASP9	CD27	CD40	CD40LG	CD70	CFLAR	CIDEA	CIDEB	CRADD	CYCS	DAPK1
E	DFFA	DIABLO	FADD	FAS	FASLG	GADD45A	HRK	IGF1R	IL10	LTA	LTBR	MCL1
F	NAIP	NFKB1	NOD1	NOL3	PYCARD	RIPK2	TNF	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF11B	TNFRSF1A	TNFRSF1B
G	TNFRSF21	TNFRSF25	TNFRSF9	TNFRSF10	TNFSF8	TP53	TP53BP2	TP73	TRADD	TRAF2	TRAF3	XIAP
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

StepOnePlus gerçek zamanlı PZR protokolü

Ekspresyon analizi için Tablo 3.9'daki karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3.9 Ekspresyon analizi için gerekli karışımın hazırlanması

Etken	Hacim
Thermo scientific maxima Sybr green PCR Master Mix	750 µl
Diluted cDNA	60 µl
ddH₂O	680 µl
Son Hacim	1490 µl

Tablo 3.9'da görüldüğü gibi hazırlanan karışım hazır mikrolaka (Qiagen PCR Array Katalog No: 330231) kuyucuklarına 15 µl olacak şekilde kabarcık oluşturmadan dağıtılmıştır ve mikrolaka gerçek zamanlı PZR cihazına konulmuştur.

Gerçek Zamanlı PZR Koşulları

PZR'nin denatürasyon, amplifikasyon ve soğutma aşamalarının koşulları aşağıda verilmiştir. Gerçek zamanlı PZR 95°C'de 10 dakika denatürasyon sonrası 40 döngü 95°C'de 15 saniye, 60 °C'de 1 dakika koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo 3.10 Gerçek Zamanlı PZR Koşulları

1. Denatürasyon

Döngü Programı Verileri	Değer
Döngü	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	95
İnkübasyon zamanı (dk)	10
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci hedef derece (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

“Devamı Arkada”

Tablo 3.10 Gerçek Zamanlı PZR Koşulları2. Amplifikasyon

Döngü	Programı	Değer	
Verileri			
Döngü		40	
Analiz Modu		Kantitasyon	
Hedef Dereceleri		<i>Segment 1</i>	<i>Segment 2</i>
Hedef Derece (°C)		95	60
İnkübasyon zamanı (sn)		15	60
Sıcaklık Transisyon Oranı		20.0	20.0
İkinci Hedef Derecesi (°C)		0	0
Basamak derecesi (°C)		0.0	0.0
Döngüler		0	0
Kazanç modu		-	Tek

3. Soğuma

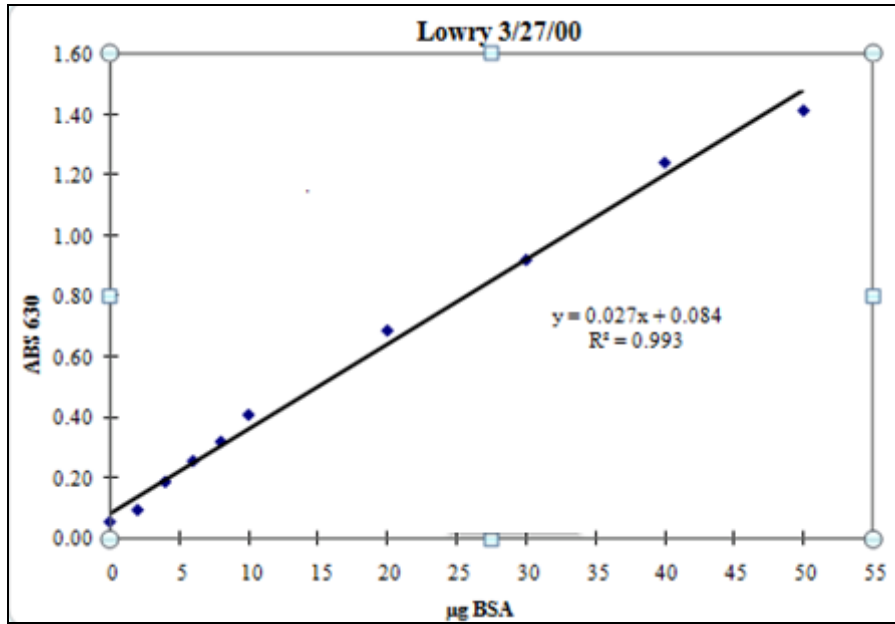
Program Verileri	Değer
Döngü sayısı	1
Analiz Modu	-
Hedef Dereceleri	Segment 1
Hedef Derece (°C)	40
İnkübasyon Zamanı (sn)	30
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0
İkinci Hedef Derece (°C)	0
Basamak derecesi (°C)	0.0
Döngüler	0
Kazanç modu	-

3.6. Protein Ekspresyon Düzeyinin Tayini

3.6.1. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

Protein tayininde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri de Lowry yöntemidir. Alkali koşullarda fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Cocalteau reaktifi) fenolik asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Peptit bağları ile Cu^{+2} arasında biüre reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşmaktadır. Tirozin ve triptofan amino asitleri ile Folin-Ciocalteu ayırıcı tepkimeye girmektedir ve Folin-Ciocalteu ayırıcı indirgenmektedir. İndirgenme sonucunda mavi renkli heteropolimolibden kompleksi meydana gelmektedir ve bu kompleks 600-800 dalga boyu aralığında absorbands piki vermektedir. Protein düzeyleri hücreler ripa solüsyonu (150 mM sodyum klorid, %1 Triton X-100, %0.5 sodyum deoksikolat, %0,1 SDS, 50 mM Tris pH:8, proteinaz inhibitörü) ile toplandıktan sonra aşağıdaki yöntem uygun olarak tespit edilmiştir.

- 1- Ayıraç A [%2'lik Na_2CO_3 (%1 N NaOH'de çözülmüş)], Ayıraç B (%1Na veya K-tartarat), Ayıraç C (%0,5 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Ayıraç D (1N folin ayırıcı) olmak üzere 4 solüsyon hazırlanmıştır.
- 2- Ayıraç A-B-C'den sırasıyla 48-1-1 oranında karıştırılarak yeni bir ayıraç hazırlanmıştır.
- 3- Ayrıca standart için BSA kullanılmış ve konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır.
- 4- Yeni hazırlanan ayıraçtan 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 200 µl olacak şekilde konulmuştur.
- 5- Üzerine ilk kısma her standart için 2 kuyucuk olacak şekilde hazırlanan standartlardan, diğer kuyucuklara 1/5 oranında sulandırılmış numunelerden her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 50 µl koyulmuş ve karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- 6- İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğun üzerine 20 µl folin ayırıcı koyularak 30 dakika bekletilmiş ve beklemeden sonra ELISA okuyucu ile 630 nm dalga boyunda okunmuştur.
- 7- Örneklerin protein düzeyi, aşağıdaki şekilde verilen Standart grafik eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3 Lowry protein standart eğrisi

3.6.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein profilleri dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrıştırılarak elde edilmiştir.

PAGE iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında kesintili bir tampon sisteminde %8.5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 3.11'da gösterildiği sırasıyla hazırlanmıştır.

Tablo 3.11 Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonlarının hazırlanması

1 jel için	Ayrıştırıcı jel (%8.5)	Sıkıştırıcı jel (%4)
Jel çözeltisi (akrilamid, bisakrilamid)	2.85 ml	0.75 ml
Distile su	4.5 ml	2.5 ml

1 jel için	Ayrıştırıcı jel (%8.5)	Sıkıştırıcı jel (%4)
Ayrıştırıcı Tampon (1.5M Tris-HCl pH 8.8)	2.5 ml	-
Sıkıştırıcı Buffer (0.5M Tris-HCl pH 6.8)	-	1.25 ml
%10 SDS	0.15 ml	0.1 ml
APS	0.05 ml	0.025 ml
TEMED	0.0065 ml	0.005 ml
Total	10 ml	5 ml

Analiz edilecek örnekler 4X numune seyreltme tamponu (0.25M Tris-HCl pH: 6.8, %40 Gliserol, %20 β -merkaptoetanol, %8 SDS, %0.01 Bromfenol mavisi, distile su) Tris ile 3:1 oranında (3 örnek 1 tampon) seyreltilmiştir. 2 dakika 100°C'de inkübe edilmiştir. Tank 1X elektrot tamponu (2.5 mM Tris, 19.2 mM Glisin, SDS) ile doldurulmuştur. 25 μ l (100 μ g hücre lizatları) protein örneklerinden kuyucuklara yüklenmiştir.

Sıkıştırıcı jel üzerinde 10 mA'lık sabit akım yürütme işlemi yapılmıştır. Boya ayrıştırıcı jele ulaştığında akım 20 mA'e çıkarılmıştır. Boya jelin tabanına ulaştığında güç kaynağı kapatılmıştır.

3.6.3. Western Blot Analizi

Western blot analizi için elektroforezi takiben jel transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içerisinde 10 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Elektroforetik transfer MiniVE-blot sistemiyle ıslak transfer yapılmıştır.

Membranın proteine (jelle) temas eden kısmı üstte olacak şekilde bloklama solüsyonuna (1M Tris HCl, NaCl, %0.05 Tween 20, Distile su, Skim milk) alınmıştır ve 40-50 dk çalkalanmıştır. Jelin transfer olup olmadığına bakmak için jel boyama solüsyonuna alınmıştır. Beklemeden sonra boya uzaklaştırılmıştır. Membran bloklamadan çıkartıldıktan sonra CDK4 ve BCL2 genlerinin protein ifadelerine bakmak amacıyla jeller 1/5000 oranında sulandırılmış 1. antikora (anti-mouse Beta aktin, CDK4, BCL2; Santa Cruz) alınmıştır. Bir gece 1. antikorda bekletilmiştir. Süre sonunda 3x5' TBST ile yıkama yapılmıştır. Membran 1/5000 oranında 2. Antikora (Santa Cruz) alınmış ve 1 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde tekrar 3x5' TBST ile yıkama yapılmıştır. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için substrat çözeltisi alkale fosfataz (ALP) (Tris-HCl, pH:8.8, NaCl, MgCl₂, ZnCl₂, Dietanolamin, Nitroblue tetrazolyum, fenazin metasülfat ve bromokloroindoilfosfat) ile inkübe edilmiştir. Görüntü elde edildikten sonra membran havada kurutulmuş, alüminyum folyo ile kaplanmış ve karanlıkta saklanmıştır. Oluşan protein bandlarının densitometrik analizleri Scion Image Analyser yazılımı ile belirlenmiştir.

3.7. Ferulik Asitin Apoptotik Etkinliğin Belirlenmesi

Apoptozun tespiti için en sık kullanılan yöntemlerden biri TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) yöntemidir. Bu yöntem apoptoz işareti olan DNA fragmentasyonunu belirlemek için değerli bir metoddur. Ca/Mg bağımlı endonükleazların aktivasyonundan sonraki DNA degradasyonu apoptozun karakteristik özelliklerinden biridir. Nükleer DNA fragmentasyonu, çoğu hücrede biyokimyasal bir belirteçtir. TUNEL sistemi apoptotik hücrelerin *in situ* olarak hızlı ve basit tespit edilmesini sağlamaktadır. TUNEL testinde Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (TdT) olarak bilinen bir enzim DNA'nın fragmente noktalarını tanımlar. TdT 3'-OH DNA uçlarına önceden etiketlenmiş dUTP nükleotidlerin ilavesini katalizlemektedir. dUTP işaretili DNA floresans mikroskop ile gözlemlenebilmekte veya flow sitometri ile kantite edilebilmektedir.

Yöntem:

- 1- Petrilerde bulunan hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmıştır.
- 2- 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra hücreler sayılmış ve üzerinde 8 odacık bulunan lamlara (BD Falcon Culture Sledes; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue cluture treated Glass Slide) 10^4 hücre /odacık olacak şekilde hücreler ekilmiştir.
- 3- 24 saat hücrelerin yapışması için beklenmiş ve 24 saat sonrasında PC-3 kontrol için 4 odacığın besiyeri değiştirilmiştir ve PC-3 doz içinde besiyeri çekildikten sonra 4 odacığa uygun dozlar uygulanmıştır. LNCaP hücreleri için de aynı protokol uygulanmıştır.
- 4- IC₅₀ dozu ve süresince hücreler CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir.
- 5- İnkübasyon sonunda besiyeri çekilmiş ve hücreler PBS ile bir defa yıkanmıştır.
- 6- 500 µl fiksasyon solüsyonu (pH: 7.4 PBS içerisinde %4 paraformaldehit) hücrelerin üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
- 7- Fiksasyon solüsyonu çekilmiş ve PBS ile iki kez yıkama yapılmıştır
- 8- Bloking solüsyonu (metanol içinde %3 H₂O₂) ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve 10 dakika sonunda PBS ile yıkama yapılmıştır.
- 9- Buz üzerinde hücrelerin üzerine permeabilizasyon (%0.1 triton-X100 olacak şekilde % 0.1 sodyum sitrat) solüsyonu eklenmiş ve 2 dakika sonunda çekilip PBS ile yıkanmıştır.
- 10- 1 adet örnek için 1.7 µl enzim ve 15.3 µl Label solüsyonu olacak şekilde 17 µl solüsyon eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

11- Süre sonunda solüsyonlar çekilmiş ve PBS ile yıkama sonrasında %50 gliserol içeren Hoechst (100 µg/ml) boyası eklenmiştir.

12- Lamel kapatılıp floresans mikroskopta (Olympus) 20x büyütmede görüntülenmiştir.

3.8. Hücrelerin İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi

PC-3 ve LNCaP hücrelerinin invazyon kapasitesi “BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-ınvazyon odaları” (BD Biosciences) kullanılarak 24-kuyucuklu kültür plakları içerisinde araştırılmıştır. Bu invazyon kapları sayesinde *in vitro* koşullar altında hücrelerin invaziv özellikleri saptanabilmektedir. Bu invazyon odacıkları 8 µm çaplı porlar içeren membrana sahiptir ve membran da matrijel matriksile kaplıdır. Matrijel membran invaziv karakterde olan hücrelerle olmayan hücrelerin ayırt edilmesini sağlamaktadır. İnvaziv hücreler bu membran sayesinde membranın diğer tarafına geçerken invaziv olmayan hücreler membranın diğer tarafına geçememektedir.

Her kuyucukta $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde PC-3 ve LNCaP hücreleri 500 µl serum içermeyen RPMI-1640 içerisine ekilmiştir ve doz gruplarına uygun dozlar uygulanmıştır. İnvazyon odacıklarının altına ise serum içeren 750 µl besiyeri konulmuştur. Belirlenen doz süresi sonunda, membranın üst kısmında kalan invaze olmamış hücreler kulak pamuğu çubuğu ile silinerek temizlenmiştir. Membranın alt yüzeyine göç etmiş hücre miktarı ise kristal violet boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda sayılarak değerlendirilmiştir. % invazyon hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\%Invazyon = \frac{\text{Matrijel matriks bazal membrandaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membranındaki hücre sayısı}} \times 100$$

3.9. Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi

PC-3 ve LNCaP hücreleri tripsinize edilerek sayılmıştır. Kontrol ve doz grubu hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra doz gruplarına uygun dozlar uygulanmış ve besiyeri 3 günde bir değiştirilmiştir. On gün sonra koloniler oluşmuştur. Koloni oluşumunu görüntülemek için boyama işlemine geçilmiştir. Besiyeri çekilmiştir ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyon için hücreler metanol ile 2 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler kristal viole ile 2 dakika boyanmıştır ve distile su ile 2

kez yıkanmıştır. Kontrol ve doz grupları kolonileri sayılmış kendi aralarında ortalamaları hesaplanmıştır.

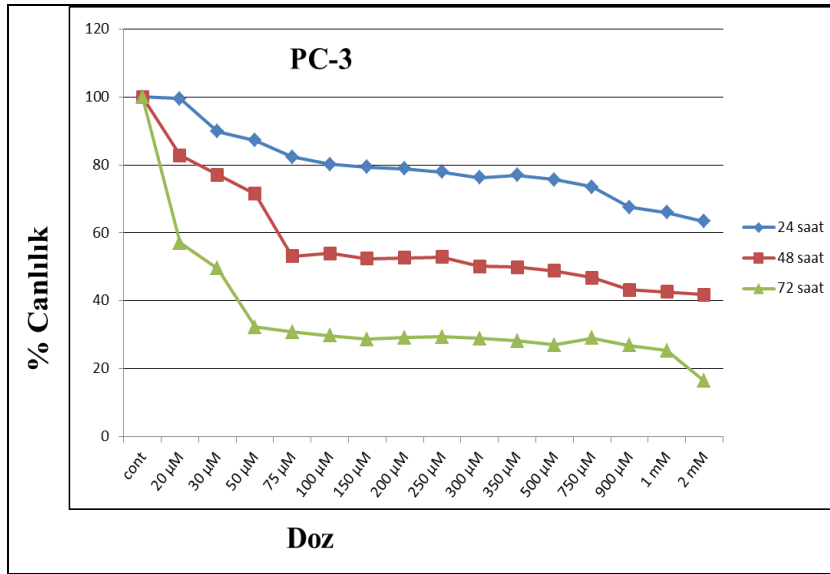
3.10. İstatistiksel Analiz

Genlerin kantitasyon değerlerinin istatistiksel analizi için $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ metodu ile “RT² Profiler™ Pcr Array Data Analysis” olarak isimlendirilen web tabanlı program ile Volcano Plot analizi yapılmıştır. Kontrol ve doz gruplarının karşılaştırılması “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan “*Student t-test*” analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca parametrik ve non-parametrik analizler Minitab 15.0 istatistiksel analiz programı ile yapılmıştır.

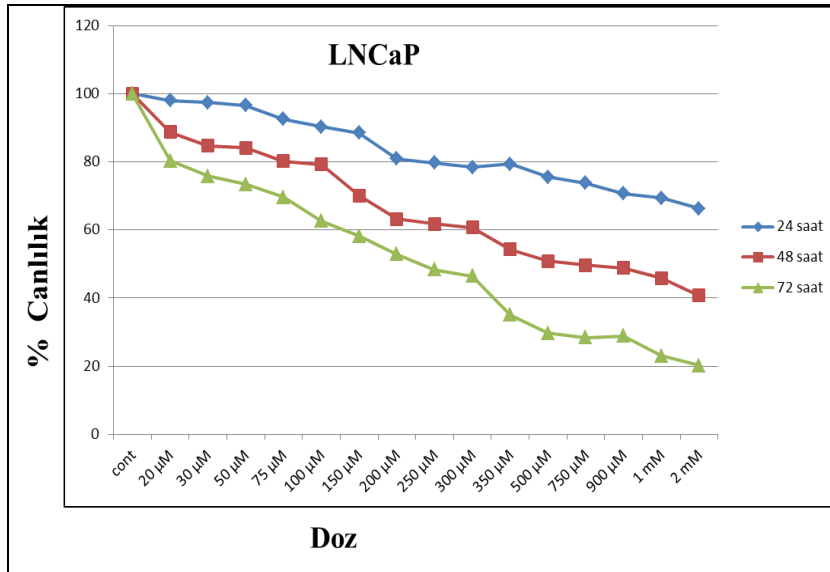
4. BULGULAR

4.1. Ferulik Asitin IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında ferulik asitin 20 µM- 30 µM- 50 µM- 75 µM- 100 µM- 150 µM- 200 µM- 250 µM- 300 µM- 350 µM- 500 µM- 750 µM- 900 µM- 1 mM- 2 mM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası sitotoksitesi XTT testi ile değerlendirilmiştir. PC-3 hücre hattında ferulik asitin IC₅₀ dozu 300 µM 48 saat, LNCaP hücre hattında 500 µM 48 saat olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1) (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Ferulik asitin PC-3 hücre canlılığına etkisi



Şekil 4.2 Ferulik asitin LNCaP hücre canlılığına etkisi

4.2. Ferulik Asitin Hücre Döngüsü ve Apoptotik Yolak Genlerinin Ekspresyonları Üzerine Etkisi

PC-3 kontrol, PC-3 doz, LNCaP kontrol ve LNCaP doz gruplarından total RNA Trizol solüsyonu kullanılarak izole edilmiş olup RNA miktarları ve saflığı Tablo 4.1'de görüldüğü gibi her iki hücre hattında da uygun saflıkta RNA'ların elde edildiği bulunmuştur. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) kullanılarak da komplementer DNA (cDNA) sentezleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1 RNA miktarı ve saflığı

Hücre Hattı	Grup	260/280 OD	RNA (ng/µl)
PC-3	Kontrol	1,96	2157,6
	FA (300 µM)	1,89	406,4
LNCaP	Kontrol	1,91	443,2
	FA (500 µM)	1,88	414,3

Elde edilen cDNA'lar 96 kuyucuklu plate'lere uygun karışımlar hazırlanarak StepOnePlus Gerçek zamanlı PZR'de Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da da verildiği gibi hücre döngüsünde ve apoptozda görev alan 168 genin ekspresyonu kontrol ve doz gruplarında kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

4.2.1. Ferulik Asitin PC-3 Hücre Hattında Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında ferulik asitin etkileri doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre hücre döngüsü genlerinden ATR, ATM, CDKN1A, CDKN1B, E2F4, RB1, TP53'ün sırasıyla 14.5151, 284.283, 18.0796, 296.876, 73.4801, 73.9291, 1166.0394 kat ekspresyonunun arttığı, CCND1, CCND2, CCND3, CDK2, CDK4, CDK6'nın sırasıyla 1175.9754, 294.8818, 18.2396, 35.7573, 9.0795, 1185.5571 kat anlamlı derecede ekspresyonun azaldığı görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 4.2). Hücre döngüsü genlerinden anlamlı artış ve azalış göstermeyen genler Ek-1'de verilmiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.2 Ferulik asitin PC-3 hücre hattında hücre döngüsü gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler

Gen	Artış	p-değeri	Gen	Azalış	p-değeri
ATR	14.5151±0.45	0.000	CCND1	-1175.9754±0.16	0.001227
ATM	284.283±0.37	0.000	CCND2	-294.8818±0.2	0.017
CDKN1A	18.0796±0.18	0.0129	CCND3	-18.2396±0.12	0.0223
CDKN1B	296.876±0.21	0.02224	CDK2	-35.7573±0.4	0.0019
E2F4	73.4801±0.15	0.000443	CDK4	-9.0795±0.39	0.0000091
RB1	73.9291±0.17	0.028	CDK6	-1185.5571±0.21	0.000084
TP53	1166.0394±0.27	0.0337			

PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında ferulik asitin etkileri doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre apoptoz genlerinden BIK, BAX, CASP1, CASP2, CYCS'nin sırasıyla 4.5839, 5.256, 18.6663, 9.1843, 9.1538 kat ekspresyonunun arttığı, BCL2'nin 9.356 kat ekspresyonunun azaldığı görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 4.3). Apoptoz genlerinden anlamlı artış ve azalış göstermeyen genler Ek-2'de verilmiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.3 Ferulik asitin PC-3 hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler

Gen	Artış	p-değeri	Gen	Azalış	p-değeri
BIK	4.5839 ±0.29	0.02114	BCL2	-9.356±0.19	0.000011
BAX	5.256±0.3	0.000339			
CASP1	18.6663±0.27	0.0054			
CASP2	9.1843±0.35	0.0147			
CYCS	9.1538±0.23	0.0117			

4.2.2. Ferulik Asitin LNCaP Hücre Hattında Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında ferulik asitin etkileri doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre hücre döngüsü genlerinden CDKN1B, CDKN2B'nin sırasıyla 2.6397, 10.4652 kat ekspresyonunun arttığı, CCNF, CCNT1, CDK6, CDK4'ün sırasıyla 3.0436, 5.2203, 21.0319, 8.025 kat ekspresyonunun azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.4). Hücre döngüsü genlerinden anlamlı artış ve azalış göstermeyen genler Ek-3'de verilmiştir ($p > 0.05$).

Tablo 4.4 Ferulik asitin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler

Gen	Artış	p-değeri	Gen	Azalış	p-değeri
CDKN1B	2.6397±0.18	0.0447	CCNF	-3.0436±0.33	0.0079
CDKN2B	10.4652±0.2	0.000533	CCNT1	-5.2203±0.41	0.04229
			CDK6	-21.0319±0.25	0.00663
			CDK4	-8.025±0.27	0.000073

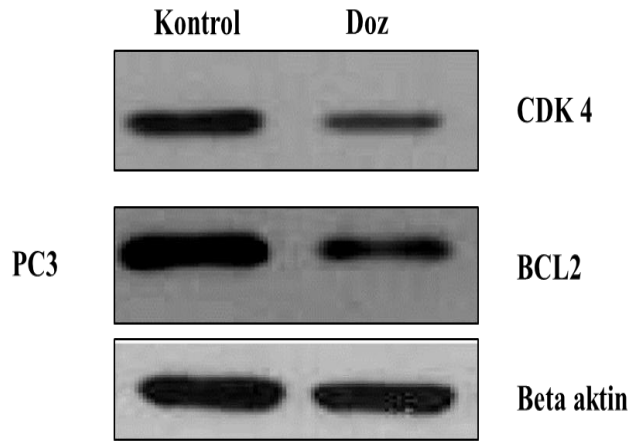
LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında ferulik asitin etkileri doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre apoptoz genlerinden CASP1, CASP2, CASP8, CYCS, FAS, FASLG, TRADD'ın sırasıyla 55.4755, 3.4851, 6.9203, 6.9774, 3.5007, 55.414, 3.3628 kat ekspresyonunun arttığı, BCL2, XIAP'ın sırasıyla 13.9127, 6.8028 kat ekspresyonunun azaldığı görülmüştür ($P < 0.05$) (Tablo 4.5). Apoptoz genlerinden anlamlı artış ve azalış göstermeyen genler Ek-4'de verilmiştir ($p > 0.05$).

Tablo 4.5 Ferulik asitin LNCaP hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler

Gen	Artış	p-değeri	Gen	Azalış	p-değeri
CASP1	55.4755 ±0.42	0.0465	BCL2	-13.9127±0.14	0.00032
CASP2	3.4851±0.3	0.03325	XIAP	-6.8028±0.4	0.0472
CASP8	6.9203±0.23	0.0259			
CYCS	6.9774±0.43	0.0489			
FAS	3.5007±0.21	0.049			
FASLG	55.414±0.17	0.0486			
TRADD	3.3628±0.19	0.0492			

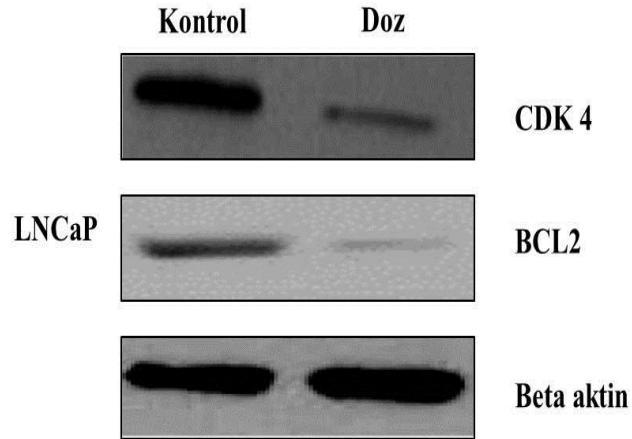
4.3. Ferulik Asitin Protein Ekspresyon Düzeyine Etkisi

Çalışmamızda, her iki hücre hattında hücre döngüsü ve apoptozda görev alan genlerden, ekspresyon analizleri sonucunda anlamlı olarak değerlendirilen birer gen değişimi protein düzeyinde western blot analizi ile gösterilmiştir. PC3 hücre hattında BCL2 ve CDK4 genlerinin protein düzeyindeki değişimi Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Elde edilen protein sonuçlarının ekspresyon sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3 PC-3 hücre hattında ferulik asitin CDK4 ve BCL2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi

LNCaP hücre hattında CDK4 ve BCL2 genlerinin protein düzeyindeki değişimi Şekil 4.4' de gösterilmiştir. Elde edilen protein sonuçlarının ekspresyon sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4 LNCaP hücre hattında ferulik asitin CDK4 ve BCL2 protein ekspresyon düzeylerine etkisi

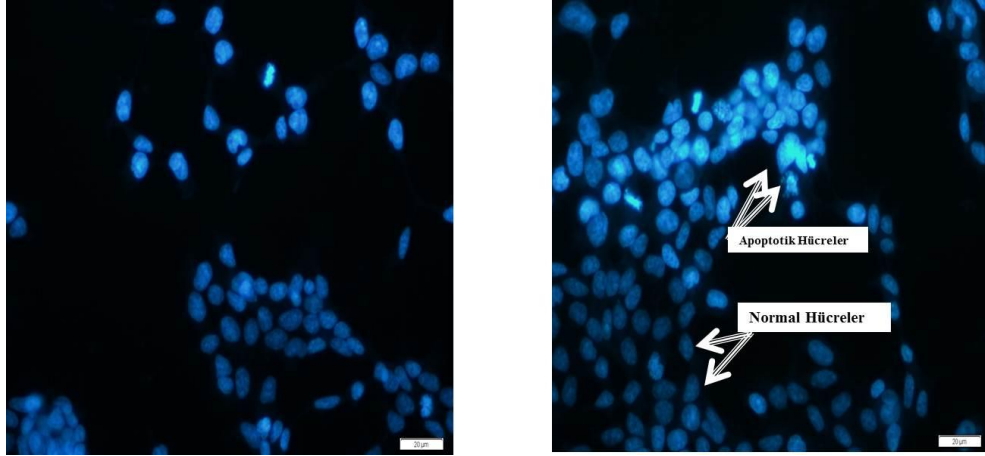
4.4. Ferulik Asitin Apoptoz Üzerine Etkisi

300 μ M FA dozuna maruz bırakılan PC-3 ve 500 μ M FA dozuna maruz bırakılan LNCaP hücrelerine ve kontrol hücrelerine TUNEL testi yapılarak FA'nın apoptoz üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Canlı hücreler, apoptotik hücelere oranlanarak apoptoz oranı bulunmuştur. FA'nın PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında sırasıyla 2.5 ± 0.47 ve 4.7 ± 2 kat apoptozu indüklediği gözlenmiştir (Tablo 4.6).

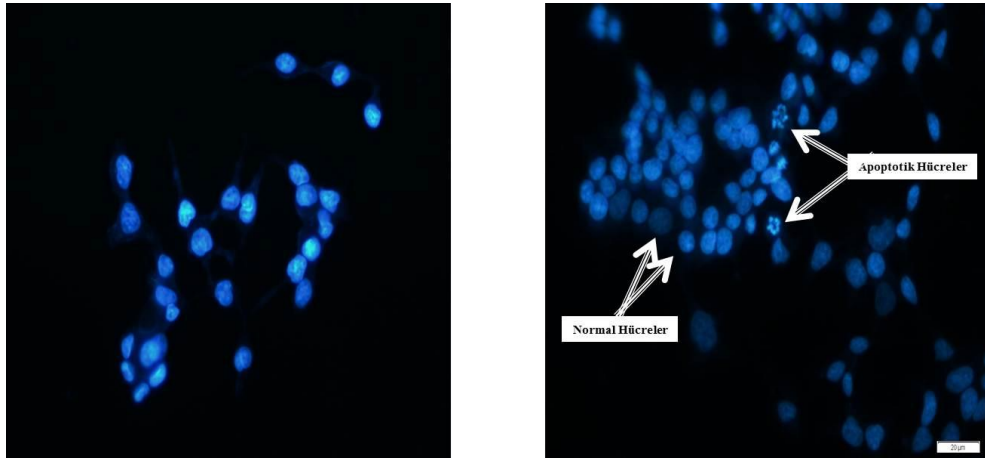
Tablo 4.6 Ferulik asitin PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında apoptotik etkileri

Hücre	Grup	Apoptoz(%)	Apoptotik İndeks
PC-3	Kontrol	12 ± 1.5	2.5 ± 0.47
	IC_{50}	39.7 ± 1.52	
LNCaP	Kontrol	7 ± 1.7	4.7 ± 2
	IC_{50}	37.6 ± 2.5	

Ferulik asitin PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında IC_{50} dozunun apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Şekil 4.5) (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 PC-3 hücre hattında kontrol (sol) ve doz grubu (sağ) hücrelerin TUNEL testi sonuçlarının mikroskop görüntüleri

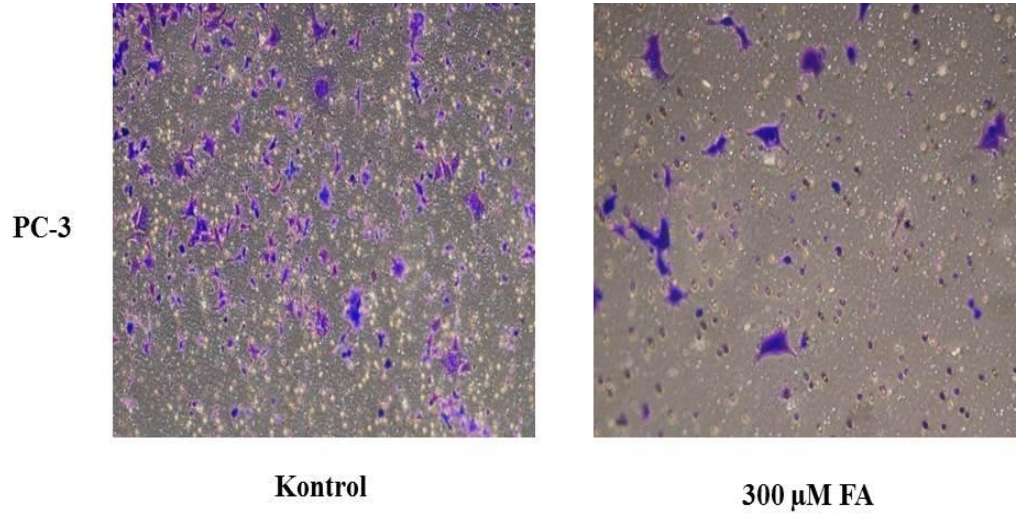


Şekil 4.6 LNCaP hücre hattında kontrol (sol) ve doz grubu (sağ) hücrelerin TUNEL testi sonuçlarının mikroskop görüntüleri

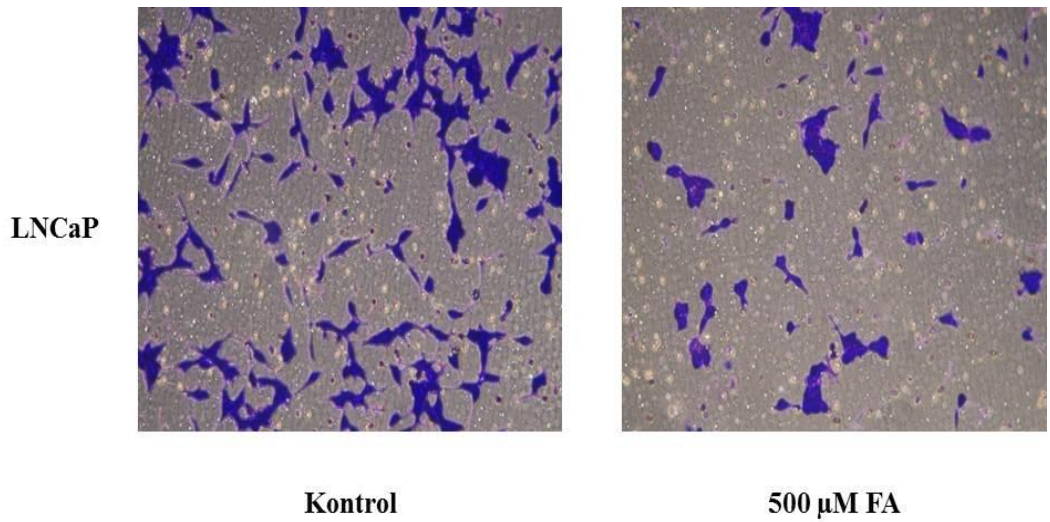
4.5. Ferulik Asitin Hücre İnvazyonuna Etkisi

İnvazyon odacıklarının diğer tarafına geçen hücreler mikroskop altında sayılmıştır. PC-3 ve LNCaP hücrelerinin invazyonunun mikroskop görüntüsü verilmiştir (Şekil 4.7) (Şekil 4.8). PC-3 hücre hattında kontrol grubunun invazyon oranı 51.2 ± 1.5 olarak hesaplanmış ve doz grubunda ise bu oran 33.3 ± 0.6 olarak bulunmuştur. LNCaP hücre hattında kontrol grubunun invazyon oranı 63.5 ± 2.3 iken doz grubunda bu oran 48.8 ± 1.5 olarak bulunmuştur (Tablo 4.7), (Şekil 4.9).

PC-3 hücrelerinde kontrole göre FA'nın invazyonu 33.6 ± 0.5 , LNCaP hücrelerinde ise 23 ± 1.9 oranında baskılanmıştır.



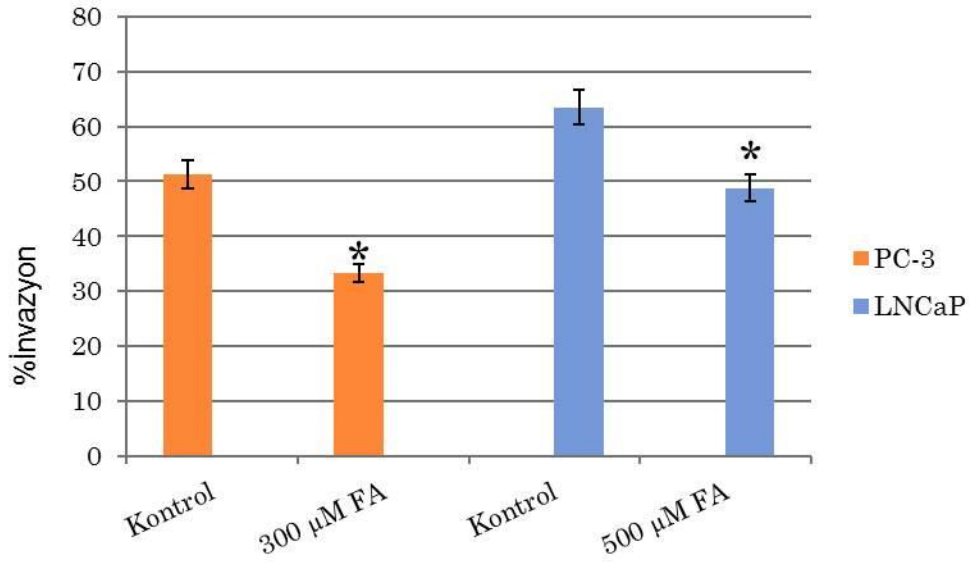
Şekil 4.7 PC-3 kontrol ve FA doz invazyon fotoğrafları



Şekil 4.8 LNCaP kontrol ve FA doz invazyon fotoğrafları

Tablo 4.7 PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında ferulik asitin invazyon kapasitesine etkisi

Grup	%İnvazyon
PC-3 Kontrol	51.2 \pm 1.5
PC-3 300 μ M (IC_{50}) FA dozu	33.3 \pm 0.6
LNCaP Kontrol	63.5 \pm 2.3
LNCaP 500 μ M(IC_{50}) FA dozu	48.8 \pm 1.5

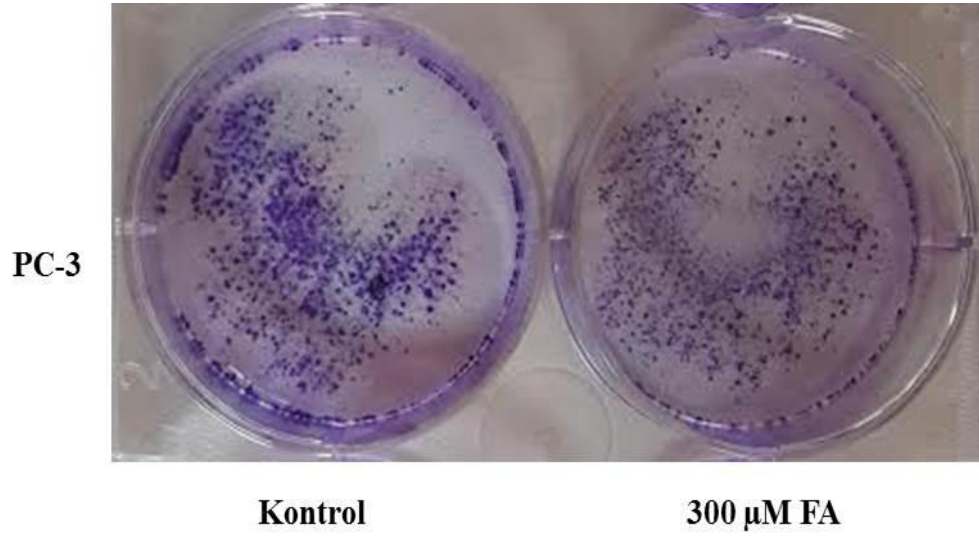


Şekil 4.9 Ferulik asitin PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında invazyona etkisi. *: Kontrol grubundan farklı.

4.6. Ferulik Asitin Koloni Oluşumuna Etkisi

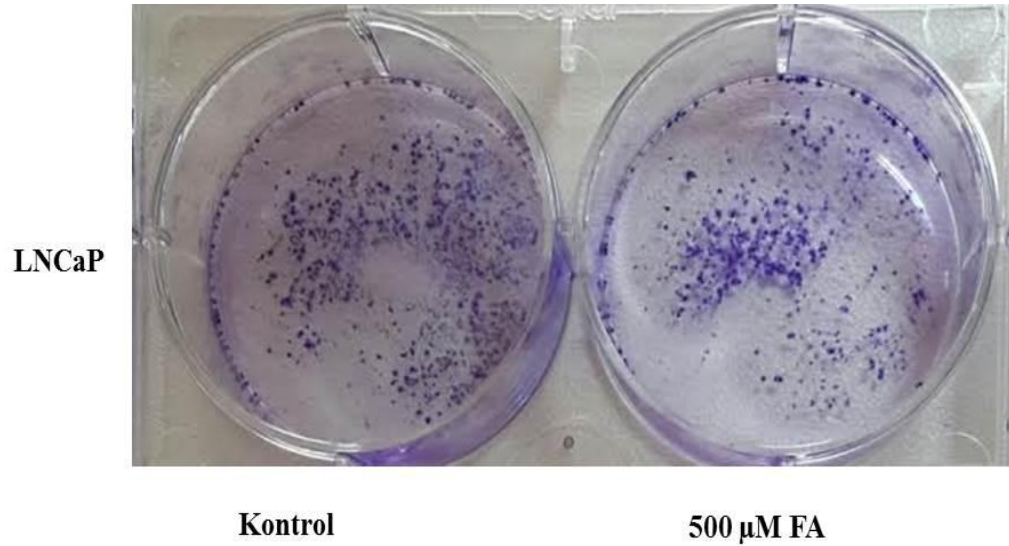
Başlangıçta 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler 10 gün sonra kristal viyole ile boyanmış ve koloniler sayılarak ortalamaları hesaplanmıştır.

PC-3 hücre hattı kontrol grubu koloni sayılarının ortalaması 210 ± 3 iken doz grubunda ortalama koloni sayısı 130 ± 2.6 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10). PC-3 hücre hattı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz grubunda koloni oluşumununun $\%38 \pm 0.82$ oranında baskılandığı görülmektedir.

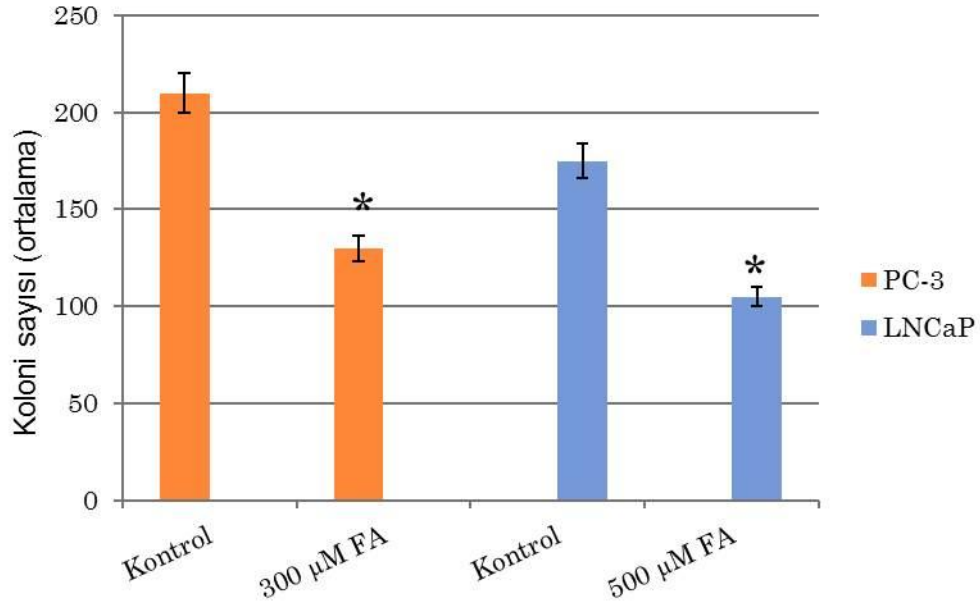


Şekil 4.10 PC-3 kontrol ve FA doz koloni fotoğrafları

LNCaP hücre hattı kontrol grubu koloni sayılarının ortalaması 175 ± 1.5 iken doz grubunda ortalama koloni sayısı 105 ± 2 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11). LNCaP hücre hattında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doz grubunda koloni oluşumunun $\% 40 \pm 1.7$ baskılandığı görülmektedir.



Şekil 4.11 LNCaP kontrol ve FA doz koloni fotoğrafları



Şekil 4.12 FA'nın PC-3 ve LNCaP hücre hatlarının koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi. *: Kontrol grubundan farklı.

5. TARTIŞMA

Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, onkogenlerin aktivasyonu ve epigenetik değişimler kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Montenegro vd 2014). Günümüzde moleküler gelişmelerle birlikte en önemli sağlık problemlerinden olan kanser ile ilgili yapılan çalışmalar artmakta, tedavi yöntemleri gelişmekte ve daha az toksik tedaviler uygulanmaktadır. Prostat kanseri erkeklerde en sık rastlanılan kanser türlerinden biridir ve tüm kanserlerin %32'sini oluşturmaktadır. Akciğer kanserinden sonra en sık görülen ölüm nedenidir. İlerleyen yaşlarda sık görülen prostat kanserinin riski yaş artıkça artmaktadır ve 80 yaşın üzerinde en yüksek oranda görülmektedir. Prostat kanseri belirtilerinin geç farkedilmesi ve yavaş ilerlemesi de prostat kanserinin mortalitesinde önemlidir.

İlerleyen bilim ve teknoloji ile birlikte kansere karşı savaşta bilim insanları klasik tedavi yöntemlerinin yanı sıra tamamlayıcı tedavi yöntemleride geliştirmektedirler. Sentetik antioksidanların da toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalarla birlikte doğal antioksidan kaynağı olan meyve, sebze, baharat ve bitkisel çaylara ilgi artmıştır. Fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkileri olduğu bilinmekle birlikte bu bileşiklerin antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antipatojenik ve antiviral etkiye sahip olduğunu kanıtlayan birçok çalışma vardır (MacDougall 2002, Saldamlı 2007). Fenolik bileşikler aynı zamanda zararlı oksidatif süreçlerin inhibitörleri ve potansiyel antioksidanları olarak tanımlanmaktadır. Çalışmamızda kullanılan fenolik bir bileşik olan ferulik asit pirinç, yulaf, kahve, turunçgiller, elma ve yabanmersini başta olmak üzere sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır (Clifford 1999, D'Archivio vd 2007). Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarla ferulik asitin serbest radikalleri uzaklaştırması, sitoprotektif enzimleri uyarması ve sitotoksik sistemleri inhibe etmesi nedeniyle kanser terapisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Hemaiswarya ve Doble 2013). Bu çalışmada erkeklerde çok yüksek insidansa sahip prostat kanserine ışık tutmak amacıyla fenolik bir bileşik olan FA'nın etkisinin araştırılması ve moleküler mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.

Ferulik asitin kanser üzerine etkisinin araştırılması ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışmalar olmakla birlikte bazı çalışmalar yapılmıştır. Kanski ve ark. ferulik asitin antioksidan potansiyeli sayesinde reaktif oksijen türleri aracılığı ile nöronal hasarı azalttığını göstermişlerdir (Kanski vd 2002). Peng ve ark. yaptıkları bir araştırmada, T24 mesane kanseri hücrelerinde 2 mM dozda ferulik asitin sitotoksik etkisi 3 boyutlu kültürlerin 2 boyutlu kültürlerden farklı biyolojik davranış sergilediği gösterilmiştir. Sonuçta 3 boyutlu kültürde apoptotik oran %64 iken 2 boyutlu kültürde %76 olarak bulunmuştur (Peng vd 2013). Yapılan bir çalışma sonucunda ferulik asitin U87MG insan glioblastoma kanseri hücre hatlarında apoptotik yolağı aktive ederek sitotoksik etkiye neden olduğu ve ferulik asit yüklü nano yapı taşıyıcıların bu etkiyi önemli derecede arttırdığı rapor edilmiştir (Carbone vd 2014). Janicke ve ark. tarafından 2011'de yapılan çalışma sonucunda ferulik asitin (150 μ M 24 saat) Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde antiproliferatif etki sergilediği görülmüş ve hücre döngüsünün S fazında hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir (Janicke vd 2011). Ferulik asitin T47D meme kanseri hücrelerinde ve ECV304 endotelial hücrelerde büyümeyi inhibe ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Kampa vd 2004, Hou vd 2004). Hemaiswarya ve Doble tarafından yapılan bir çalışmada FA'nın HeLa insan serviks kanseri hücrelerinde IC_{50} dozu 320 μ M bulunmuştur (Hemaiswarya ve Doble 2013). Çalışmamız sonucunda da PC-3 hücre hattında ferulik asitin IC_{50} dozunun 300 μ M 48 saat (Şekil 4.1), LNCaP hücre hattında 500 μ M 48 saat (Şekil 4.2) olduğu saptanmıştır.

ATR geni kromozom 3q22-q24 bölgesinde lokalize olmakla birlikte fosfotidilinositol-3 (PI3) ve fosfotidilinositol-4 (PI4) ailesinin bir üyesidir. ATR geni PI3 kinaz gen ailesinden olan ATM geni ile sıkı bir ilişki içindedir. ATM proteini bir serin/treonin kinazdır. ATM ve ATR DNA hasarına yanıtta p53 ve MDM2 (p53 bağlanma protein homoloğu) proteinlerinin fosforilasyonunda ve hücrel sinyalizasyonda önemli rol oynamaktadırlar (Gatei vd 2003, Cho vd 2005). ATM ve ATR genleri genellikle DNA hasarında birlikte aktivite göstermekte ve aşağı yönde diğer genlerin aktivasyonunda rol oynamaktadırlar. ATM genellikle DNA çift zincir kırıklarına cevapta, ATR ise diğer tip DNA hasarlarına karşı cevapta önemlidir. ATM ve ATR'nin hücrel stres yokluğunda aktive olmadığı ancak hücrel stres varlığında aktif olduğu gösterilmiştir (Shiloh ve Kastan 2001, Takagaki vd 2005).

DNA hasarına cevapta temel ve en önemli aşama DNA tamir genlerinin oynadığı roldür (Ciccio ve Elledge 2010). DNA hasarına cevapta DNA hasarı bağımlı PI3 kinazlar: ATM, ATR'ler ilk protein efektörleridir (Meyer vd 2007). ATM mutasyonları

prostat kanseri riskinin artması ve hastalığın agresifliği ile ilişkilendirilmiştir (Silva vd 2012).

ATM'nin prostat kanserinde rolünü belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada normal prostat dokusu, yüksek gradeli prostat intraepitelyal neoplazi (PIN) ve karsinoma dokusu alanları immunohistokimyasal analizler ile incelenmiştir. ATM'nin normal prostat dokusu ve karsinoma dokusu ile karşılaştırıldığında PIN'lerde daha yüksek oranda aktive edildiği rapor edilmiştir. PIN genellikle prostat kanserinin öncüleri olarak kabul edilmektedir ve prostat tümörünün erken aşamalarında ATM aktivasyonunun, ATM aktivasyonunun zayıflaması ile meydana gelen kanser ilerlemesini baskıladığı düşünülmüştür (Fan vd 2006).

p53 tümör supresör geni kromozom 17p13.1'de lokalizedir. Bu gen; apoptozun kontrolü, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre büyümesinin durdurulması, genotoksik ya da hücrel strese yanıt olarak farklılaşma, tümör anjiyogenezinin kontrolü, DNA tamirinde rol oynayan bir çok genin regülasyonunda önemlidir (WEB_12).

Prostat kanserinin ilerlemesi sırasında Akt ve c-Myc gibi çeşitli onkogenik sinyaller aktive edilmekle birlikte BRCA1/2 ve p53 gibi DNA hasarına yanıtta görev alan genler prostat kanserinde mutasyona uğrayabilmektedir (Karanika vd 2014).

Prostat kanserinin erken aşamalarında p53 mutasyonu ya da kayıpları düşük olmasına rağmen, p53 mutasyonları prostat kanserinin geç aşamalarında sık görülmektedir. Ayrıca mutant p53, p53 ailesinin bir üyesi olan p63'e bağlanarak kanser hücre invazyonunu indüklemektedir (Kubota vd 1995, Muller vd 2013).

Morris ve ark tarafından yapılan bir çalışmada LNCaP prostat kanseri hücre hattında p53'ün wild tipte olduğu ancak p53 inhibitörü İASPP'lerin (inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53) yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. Metastatik prostat kanserlerinin çoğu wild tip p53 eksprese etmektedir. Bu çalışmada İASPP'lerin p53 fonksiyonlarını inaktive edebileceği ve prostat kanserinin ilerlemesine neden olabileceği rapor edilmiştir. *In vivo* çalışmalar ile invaze olmuş prostat hücrelerinde İASPP'lerin yüksek oranda ifade olduğu gösterilmiştir (Morris vd 2014).

Çalışmada DNA hasarına bağlı hücre döngüsünün işleyiş mekanizmasında önemli rol oynayan ATM, ATR ve p53 gen ekspresyonları incelenmiş ve androjen bağımsız olan PC-3 hücre hattında kontrol grubuna göre FA'nın ATM, ATR ve p53 gen ekspresyonlarında sırası ile 284.283, 14.5151, 1166.0394 kat anlamlı bir artışa neden olduğu görülmüştür (ATM p=0.000 ATR p=0.000 ve p53 p=0,0337). LNCaP hücre

hattında ATM, ATR ve p53 gen ekspresyonunda anlamlı değişim bulunamamıştır. Bu sonuçlar FA'nın prostat kanseri hücre hatlarında antiproliferatif etkiye neden olan genlerin ekspresyon artışlarının hücre sel yanıtı da güçlendirdiğini düşündürmektedir.

Hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında görev alan CDK'ların düzenleyicisi olarak görev alan siklinler, hücre döngüsünün belirli aşamalarında sentezlenmekte ve sonra yıkıma uğramaktadırlar.

Sırasıyla kromozom 11q13, 12p13 ve 6p21 bölgesine lokalize olan Siklin D1 (CCND1), siklin D2 (CCND2) ve siklin D3 (CCND3), CDK'ların düzenlenmesinden sorumludur. Çoğunlukla CDK4/6 ile ilişkilidirler ve hücre döngüsünün G1 fazında ve G1/S geçişinde önemli rol oynamaktadırlar (WEB_12).

Hou ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ECV304 endotelial hücrelerde FA'nın (80 µM) GO/G1 fazında hücreleri durdurucu etki yaptığı flow sitometri çalışmaları ile gösterilmiştir. Ayrıca, CCND1 proteininde ve RB protein fosforilasyonunda azalma CDKN1A (P21) protein ifadesinde artış olduğu gösterilmiş ve hücre döngüsünde ilerlemeyi durdurma ile ilişkilendirilmiştir (Hou vd 2004).

Hou ve ark. nın yaptığı çalışmanın sonuçlarının aksine Wang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise ECV304 endotelial hücrelerde ferulik asitin doz bağımlı olarak (0.1 µg/ml-10 µg/ml) hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Flow sitometrik analizler ile GO/G1 aşamasında hücrelerin azaldığı, S aşamasında ise hücrelerde önemli artış görülmüştür. FA'nın bu etkisi CCND1 ve VEGF'nin mRNA seviyesinde artışı ile ilişkilendirilmiştir (Wang vd 2011).

Siklin D2 (CCND2)'nin insan mide (Mermelshtein vd 2005), prostat (Dong vd 2010), ovaryum ve testis (Susaki vd 2007) tümörlerinde aşırı eksprese olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir.

Nikoleishvili ve ark. benign ve malign prostat dokularında p27 (CDKN1B) ve siklin D3 (CCND3) aktivitesini immunohistokimyasal olarak değerlendirmişlerdir. Dokular klinik parametrelere göre ayrıldığında p27'nin ekspresyonunun prostat kanser dokusu ile karşılaştırıldığında BPH'de daha yüksek olduğu görülmüştür. CCND3 ve serum PSA seviyesinin pozitif korele olduğu gösterilmiş ve Gleason skoru arttıkça CCND3 ekspresyonun da arttığı rapor edilmiştir (Nikoleishvili vd 2008).

Androjenlerin etkisi AR ve prostat kanser hücrelerinde G1/S geçişinin kritik düzenleyicileri olan AR koaktivatörleri aracılığıyla meydana gelmektedir (Knudsen vd 1998, Balk ve Knudsen 2008). Bu süreçte CCND1 ve CCND3'un önemli role sahip

olduğu Xu ve ark. tarafından gösterilmiştir. Androjen yokluğunda prostat kanseri hücreleri CCND1 ve CCND3 ifadesinin kaybı ve CDK4 aktivitesinin zayıflamasına RB tümör baskılayıcı genin aktivasyonunun da eşlik etmesi ile erken G1 fazında durmaktadır (Knudsen vd 1998, Xu vd 2006). RB prostat adenokarsinomalarının %30-60'ında farklı mekanizmalar ile kayıptır veya inaktiftir (Brooks vd 1995, Ittmann ve Wiczorek 1996, Tricoli vd 1996, Jarrard vd 2002).

Mesane kanseri ile yapılan bir çalışmada RB kaybının tümör büyümesini artırdığı sonucuna varılmıştır (Chatterjee vd 2004). Başka bir çalışmada da meme kanserinde RB ekspresyonunun azalması veya yokluğunun tümör hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu immunohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir (Ogawa vd 1998).

Bu çalışmada PC-3 prostat kanseri hücre hattında FA doz grubunda kontrole göre CCND1, CCND2 ve CCND3 gen ekspresyonlarının sırası ile 1175.9754, 294.8818, 18.2396 kat azaldığı RB1 gen ekspresyonunda 73.9291 kat arttığı görülmüştür (CCND1 p=0.001227, CCND2 p=0.017, CCND3 p=0.0223 ve RB1 p=0,028). LNCaP hücre hattında bu genlerde anlamlı değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar FA'nın prostat kanseri hücre hattında G1/S evresinde hücre döngüsü durdurulmasında önemli olan genlerdeki ekspresyonun azalmasından dolayı hücre döngüsünün durdurulmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Siklin F (CCNF) kromozom 16p13.3'de lokalizedir ve en büyük (87 kDa) siklidir. Siklin F CDK'lara bağlanmamakta ve onları aktive etmemektedir. Ancak diğer siklinler gibi hücre döngüsünde salınmakta ve G2'de en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Siklin F hücre döngüsünün G2 fazı boyunca sentrioller ile ilişkilidir (D'Angiolella vd 2010).

Bu çalışmada LNCaP hücre hattında kontrole göre doz grubunda CCNF gen ekspresyonunda 3.0436 kat azalış saptanmıştır (CCNF p=0.0079). PC-3 hücre hattında anlamlı değişim görülmemiştir.

Siklin T1 (CCNT1) kromozom 12q13.11 bölgesine lokalizedir. Bu gen yüksek oranda korunmuş siklin C alt ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. Bu genin aşırı ekspresyonu tümör büyümesi ile ilişkilendirilmiştir. CDK9 aktivasyonu CDK9/CCNT1 kompleksinin oluşumu başlatmaktadır (WEB_12).

Çalışmanın sonucunda LNCaP hücre hattında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında FA doz grubunda CCNT1 gen ekspresyonunda 5.2203 kat azalış görülmüştür (p=0.04229).

Hücre döngüsü ilerlemesinde görev alan CDK2, CDK4 ve CDK6 sırasıyla kromozom 12q13, 12q14 ve 7q21-q22'de lokalizedir. Çeşitli siklinler ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından kontrol edilmektedirler (WEB_12).

CDKN1A (p21Cip1), CDKN1B (p27Kip1) siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin Cip/Kip ailesinin üyelerindedir. Bu inhibitörler G1/S kontrol noktasında anahtar rol oynayan RB geninin fosforilasyonunu engeller ve hücre döngüsünün durmasını kontrol etmektedirler. Bu ailenin üyeleri CDK aktivitesini düzenlemekte ve hücre döngüsü baskılanmasını uyarmaktadır (Zieske 2000). Cip/Kip ailesinin üyeleri CDK2, 4 ve 6'nın siklin A, D ve E ile yaptıkları komplekslere bağlanarak hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi de denetlemektedirler (Cooper ve Hausman 2006).

CDKN2B siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin INK4/ARF ailesinin üyelerinden olup kromozom 9p21'de lokalizedir. Siklin D-CDK4/6 kompleksinin fosforilasyonunu engellemekte ve G1'deki restriksiyon noktasından geçişi baskılamaktadır (WEB_12).

Janicke ve ark tarafından yapılan bir çalışmada hidrokisisinnamik asit ailesinin bir üyesi olan para-kumarik asitin (150/1500 μ M) Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde CDKN1A (p21) ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Janicke vd 2011).

Sirma ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada klinik prostat kanseri örneklerinde CDKN1B seviyesi immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmiştir. CDKN1B ifadesi 4.699 prostat kanseri doku örneğinin %18.6'sında negatif, %33.5'inde zayıf, %28.4'ünde orta ve %19.5'inde yüksek olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda prostat kanserlerinin yaklaşık %20'sinde CDKN1B ifadesinin kaybolduğu rapor edilmiştir (Sirma vd 2013).

Çalışmamızda androjen bağımsız olan PC-3 hücre hattında kontrol grubuna göre FA'nın CDKN1A, CDKN1B gen ekspresyonlarında sırası ile 18.0796, 296.876 kat anlamlı artışa CDK2, CDK4, CDK6 gen ekspresyonlarında sırası ile 35.7573, 9.0795, 1185.5571 kat anlamlı azalışa neden olduğu görülmüştür (CDKN1A $p=0.0129$, CDKN1B $p=0,02224$, CDK2 $p= 0.0019$, CDK4 $p=0.0000091$, CDK6 $p=0.000084$).

Androjen bağımlı olan LNCaP hücre hattında kontrole göre FA'nın CDKN1B, CDKN2B gen ekspresyonlarında sırası ile 2.6397, 10.4652 kat artışa, CDK4 ve CDK6 gen ekspresyonlarında sırası ile 8.025, 21.0319 azalışa neden olduğu görülmüştür (CDKN1B $p=0.0447$, CDKN2B $p=0.000533$, CDK4 $p=0.000073$, CDK6 $p=0.00663$). Bu sonuçlar FA'nın prostat kanserinde hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli rolleri olan

bu genlerdeki değişimlerden dolayı hücre döngüsü durdurulması üzerine etkili olabileceğini göstermektedir.

E2F4 geni, E2F transkripsiyon faktörü gen ailesinin bir üyesidir. E2F gen ailesi hücre döngüsünün kontrolünde ve tümör baskılayıcı proteinlerin aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. E2F transkripsiyon faktörleri G1/S ve G2/M hücre döngüsü geçişlerinin yanısıra DNA replikasyonunun anahtar bileşenlerinin ifadesini kontrol etmektedir (Trimarchi ve Lees 2002, Zhu vd 2004). E2F proteinleri DNA bağlanma bölgesi, farklılaşmayı düzenleyen transkripsiyon faktörlerini içeren proteinlerle etkileşime giren bir dimerizasyon bölgesi, asidik amino asitlerce zengin bir transaktivasyon bölgesi ve tümör baskılayıcı proteinlerle ilişkili bölge olmak üzere korunmuş bölgelere sahiptir. G0 veya G1 fazında hücreler aktif fosforile olmamış RB içermektedir. RB bu aşamada E2F4 transkripsiyon faktörü ailesini bağlayarak hücre çoğalmasını önlemektedir. Hücre büyüme faktörleri ile uyarıldığında siklin D ve siklin E konsantrasyonu artar ve sonuçta siklinD/CDK4, siklin D/CDK6 ve siklin E/CDK2 aktivasyonu RB fosforilasyonuna yol açmaktadır. Aşırı fosforile olmuş RB formu E2F4 transkripsiyon faktörünü serbest bırakır ve değişik hedef genleri aktive eder. RB proteini yokluğunda veya transkripsiyon faktörlerinin yetersizliği durumunda, mutasyonlar ortaya çıkmakta ve hücre S fazına geçmektedir (Chellappan vd 1991, Mittnacht ve Andweinberg 1991, WEB_12). Önceki çalışmalarda insan meme kanserlerinin %10-40'ında RB geninin foksiyonunu kaybettiği gösterilmiştir (Shackney ve Silverman 2003).

Genellikle hücre döngüsü ve hücrenin büyümesi sırasında düzenlenen E2F1-3 transkripsiyonel aktivörler olarak hareket ederken E2F4-5 RB ile bağlandığında transkripsiyonel baskılama kompleksi oluşturmaktadır (Attwooll vd 2004).

Plesca ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada C4-2 prostat kanseri hücre hattında E2F4 geninin susturulması ile E2F4 yokluğunda uygun olmayan G2 ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir. C4-2 prostat kanseri hücre hatlarında E2F4'ün susturulduğu durumda DNA çift zincir kırıklarının da arttığı rapor edilmiştir (Plesca vd 2007).

Çalışmamızda, PC-3 hücre hattında kontrol grubuna göre FA doz grubunda E2F4 gen ifadesinde 73.4801 kat artış gözlenmiştir (p=0.000443). Prostat kanseri hücrelerinde FA uygulaması ile artan E2F4'ün RB1 ile kompleks oluşturması sonucu transkripsiyonun baskılanması ile hücre döngüsü durmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Apoptozun düzenlenmesinde anahtar rol oynayan proteinler BCL2/BAX gen ailesinin üyeleridir. Yirmi üyesi bulunan bu ailenin bazıları apoptozu inhibe ederken bazılarıda apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak adlandırılmaktadır. Bu genler kendi aralarında homo veya heterodimer oluşturabilmektedir. BAX, BCL2 ile heterodimer oluşturduğu durumda BAX, BCL2 etkisini antagonize etmektedir. Hücrenin yaşayabilirliği proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin oranına bağlıdır. Mitokondrinin zarlar arasında yer alan sitokrom c'nin (CYCS) sitozole geçmesi apoptozu başlatmaktadır. Anti-apoptotik olan BCL2 sitokrom c'nin sitozole geçişini engellerken BAX, sitokrom c'nin sitozole geçişine katkı sağlamaktadır (Nagata 1997, Cooper ve Hausman 2006).

Kromozom 7p15.3'de lokalize olan ve apoptozda mitokondriden sitozole salınan sitokrom c, apoptozom oluşumu için apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (APAF 1) bağlanmaktadır. (Riedl ve Salvesen 2007).

FA'nın tek başına 1-40 µg/ml dozda veya 2-deoksi-glukoz ile kombine edildiğinde NCI-H460 akciğer kanseri hücrelerinde radyasyon indüklü hücre ölümünü p53, p21, nükleer factor kB (NFkB), BAX ve kaspaz-3 aracılığı ile arttırdığı gösterilmiştir (Bandagula ve Prasad 2013).

Çalışmamızda PC-3 hücre hattında kontrol grubuna göre doz grubunda TP53 (p53), BAX gen ekspresyonlarında sırasıyla 1166.0394, 5.256 kat artış, BCL2 gen ekspresyonunda 9.356 kat azalış görülmüştür (TP53 p=0.0337, BAX p=0.00039, BCL2 p=0.000011). LNCaP hücre hattında ise BCL2 gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre 13.9127 kat anlamlı derecede azalma saptanmıştır (p=0.00032). Bu tümör baskılayıcı ve apoptotik genlerde artış, antiapoptotik proteinlerde azalış FA'nın prostat kanseri hücreleri üzerine apoptotik etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Kromozom 22q13.31 bölgesinde lokalize olan BCL2 ailesinin proapoptotik üyesi BIK genellikle endoplazmik retikulum zarında bulunmaktadır. Sitoplazmaya endoplazmik retikulumdan kalsiyum ve mitokondriden CYCS'nin salınımı ile apoptozu indüklemektedir (Chinnadurai vd 2008, Tong vd 2001).

Çalışmamız sonucunda, PC-3 hücre hattında kontrole göre FA doz grubunda BIK ve CYCS gen ekspresyonlarının sırasıyla 4.5839 ve 9.1538 kat arttığı görülmüştür (BIK p=0.02114, CYCS p=0.0489). LNCaP hücre hattında ise kontrole göre FA doz grubunda CYCS gen ekspresyonunun 6.9774 kat anlamlı derecede arttığı görülmüştür (p=0.0489).

Kromozom 11q23'te lokalize olan kaspaz 1 (CASP1) çeşitli gelişme aşamalarında fonksiyon gösterdiği ve hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (WEB_12). Prostat kanserinin ilerlemesinde kaspaz 1'in rolü ile ilgili çalışmalar yapılmış ve Guo ve ark. tarafından yapılan çalışmada kaspaz 1'in indüklenmesinin LNCaP hücrelerinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Guo ve Kyprianou 1999). Ayrıca Winter ve ark. tarafından kaspaz-1 protein seviyesinin normal prostat ile karşılaştırıldığında prostat kanser örneklerinin çoğunda (%80) kaspaz 1'in baskılandığı rapor edilmiştir (Winter vd 2001). Kaspaz 1'in baskılanması prostat kanseri hücrelerinin hayatta kalmasına katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızda CASP1'in hem PC-3 hem de LNCaP hücre hatlarında FA doz uygulaması ile birlikte sırası ile 18.6663, 55.4755 kat arttığı görülmüştür (sırasıyla $p=0.0054$ ve $p=0.0465$).

Kromozom 7q34-q35'de lokalize olan kaspaz 2 (CASP2), kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspaz olarak kabul edilmektedir. Ölüm reseptör aracılı ve stres durumunda apoptoz ile ilişkilendirilmektedir. DNA hasarına cevap olarak mitokondriden sitokrom c salınımını uyarmaktadır (Lassus vd 2002, Robertson vd 2002, Wagner vd 2004, Werner vd 2004).

Kanser tedavisinde histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin ve TRAIL kombinasyonu insan tümörleri üzerine etkisi çok güçlüdür. Bir çalışmada ALVA-31, DU-145 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatları kullanılmış ve DU-145 hücrelerinde HDAC inhibisyonu CASP2 aktivitesinin artmasına neden olan protein kinaz kasein kinaz 2 aktivitesini arttırmıştır. CASP2 aktivitesinin artması aracılığı ile TRAIL ilişkili apoptozun da arttığı rapor edilmiştir (VanOosten vd 2007).

Bu çalışmada CASP2'nin hem PC3 hem de LNCaP hücre hatlarında FA doz uygulaması ile birlikte sırası ile 9.1843 , 3.4851 kat arttığı görülmüştür (sırasıyla $p=0.0147$ ve $p=0.03325$).

Kromozom 2q33-q34 'da lokalize olan kaspaz 8 (CASP8) apoptotik yolakta merkezi role sahiptir. Apoptotik sinyal iletimi ölüm reseptörleri tarafından başlatılır. Aktivasyon kaspaz 8 ve kaspaz-10 gibi kaspazları aktif hale getiren FADD, TRADD gibi ölüm domainlerinin birleşmesine neden olur. Bu olay diğer kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Zimmermann vd 2001, Degterev ve Yuan 2008). Kanser hücreleri apoptozdan kaçmak için ölüm reseptörü FAS'ı baskılamakta ve bunun sayesinde kanser ortaya çıkmakta ve ilerlemektedir. Kanser kemoterapisinde günümüzde apoptotik sinyal yollarının tetiklenmesi ya da

düzenlenmesi üzerine odaklanılmıştır. Kampa ve ark. yaptıkları bir çalışmada FAS/FASLG aracılığı ile FA'nın T47D insan meme kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Kampa vd 2004).

Çalışmamızda, LNCaP hücre hattında FA doz uygulamasının kontrol grubuna göre CASP8, FAS, FASLG ve TRADD gen ekspresyonlarının sırası ile 6.9203, 3.5007, 55.414 ve 3.3628 kat anlamlı artış görülmüştür (CASP8 $p=0.0259$, FAS $p=0.049$, FASLG $p=0.0486$, TRADD $p=0.0492$). PC-3 hücre hattında bu genlerde anlamlı artış ya da azalış saptanmamıştır.

XIAP geni, kromozom Xq25'de lokalizedir ve apoptoz baskılayıcı protein ailesinin bir üyesidir (WEB_12). Çoğu araştırmacı XIAP'ın klinik ve patolojik rollerine odaklanmıştır ve prostat kanserinde içeren birçok kanserde malign potansiyeli ve prognozu ile korele olduğunu rapor etmişlerdir. XIAP, kaspaz-3 aktivitesini ve apoptotik mekanizmaları düzenleyerek prostat kanserinin ilerlemesinde rol oynayabilmektedir (Krajewska vd 2003; Ramp vd 2004).

Apoptoz protein inhibitörlerinden cIAP1, cIAP2, XIAP, survivin, NAIP ve XIAP 60 insan tümör hattında incelenmiş ve protein seviyesinde yaygın olarak cIAP1, XIAP ve survivin ifadesi görülmüştür (Tamm vd 2000).

Krajewska ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, IAP (apoptoz inhibitörü) ailesinin üyeleri olan cIAP1 (apoptoz protein inhibitörü 1), cIAP2 (apoptoz protein inhibitörü 2) , XIAP (X kromozom bağlı apoptoz inhibitörü) ve survivin hem insan hem fare prostat kanser dokularında immunohistokimyasal analiz sonucunda bu dört inhibitöründe upregüle olduğu rapor edilmiştir (Krajewska vd 2003) .

Çalışmamızda LNCaP hücre hattında kontrole göre karşılaştırıldığında FA doz uygulamasının XIAP gen ekspresyonunu 6.8028 kat anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p=0.0472$). PC-3 hücre hattında anlamlı azalış ya da artışa rastlanmamıştır.

Apoptozda meydana gelen DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling) yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem, DNA zincirinin 3'OH bölgesine biyotinle konjuge edilmiş nükleotidleri eklemekle görevli terminal transferaz enziminin etkisini ortaya çıkarmıştır. TUNEL apoptozun belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerden birisidir (WEB_13).

Karthikeyan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada FA'nın (10 µg/ml) HeLa ve ME-180 insan serviks kanser hücreleri üzerine apoptotik etkisi değerlendirilmiş ve sonuç olarak apoptotik oranın HeLa hücre hattında %22.3 ve ME-180 hücre hattında %18,4 olduğu gösterilmiştir (Karthikeyan vd 2011).

Yaptığımız çalışmada, prostat kanseri hücre hatlarında FA'nın apoptotik etkileri TUNEL yöntemi ile araştırılmıştır. Bu dozlarda FA'nın PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında sırasıyla 2.5±0.47 ve 4.7±2 kat apoptozu indüklediği gözlenmiştir.

Tsai ve ark. yaptığı çalışmada A549 insan akciğer adenokarsinom hücrelerinde ferulik asit belli dozlarda denenmiş hücrelerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %88'inin canlı kaldığı ve ferulik asitin A549 insan adenokarsinom hücrelerinde toksik olmadığı rapor edilmiştir. Ancak çalışma sonucunda ferulik asitin 100 µM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda A549 hücrelerinin invazyonunu uyaran forbol-12-miristat-13-asetatı inhibe ettiği bulunmuştur (Tsai vd 2013).

Fang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ferulik asit türevi olan feruloyl-L-arabinozun H1299 akciğer kanseri hücrelerinde doz bağımlı olarak G2/M evresinde hücre döngüsünün durmasına neden olduğu rapor edilmiş. Matriks metalloproteinaz 2 ve 9 un aktivitesini azaltarak invazyonu baskıladığı gösterilmiş ve migrasyonun baskılandığı da yara iyileşme deneyi (wound healing) ile gösterilmiştir (Fang vd 2013).

Yuan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ferulik asitin VSMC (vasküler düz kas hücreleri) üzerine invazyon etkisi değerlendirilmiştir. FA'nın VSMC hücrelerinde invazyonu önemli derecede azalttığı gösterilmiştir. MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonunu gerçek zamanlı PZR ile TIMP-1 (metalloproteinaz inhibitörü-1) ve TIMP-2 (metalloproteinaz inhibitörü-2) protein ekspresyon seviyesi western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; FA'nın MMP-9 mRNA ekspresyonunu azaltarak ve TIMP-2 protein ekspresyonunu arttırarak VSMC hücrelerinin migrasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (Yuan vd 2012).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; FA doz uygulaması kontrol grubuna göre PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında invazyonu sırası ile %33.6±0.5 ve %23±1.9 oranında baskıladığı bulunmuştur.

Karthikeyan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada FA'nın (10 µg/ml) HeLa ve ME-180 insan serviks kanser hücrelerinin koloni sayısını doz bağımlı olarak azalttığı rapor edilmiştir (Karthikeyan vd 2011).

Çalışmamızda FA'nın koloni oluşumu üzerine etkisi değerlendirilmiştir. PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında FA doz uygulamasının kontrol gruplarına göre koloni oluşumunu sırası ile 38 ± 0.82 ve 40 ± 1.7 baskıladığı saptanmıştır. FA'nın prostat kanseri hücre hatları üzerinde hem invazyon hem de koloni oluşumunu baskılayıcı etkisi metastazi de baskılayabileceğini göstermektedir.

Prostat kanserinde ve diğer kanser türlerinde, özellikle hastalığın prognozunda moleküler genetik yöntemler daha sıklıkla tercih edilmeye başlanmıştır. Genetik değişiklikler sebebi ile aktive olan sinyalleşme yollarının belirlenmesi karsinogenezin aydınlatılmasına ışık tutacak ve hedef tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Özellikle farklı sinyalleşme yolları arasındaki karışıklık, tek bir molekülü hedeflemenin yeterli olmayacağını da akla getirebilir. Sonuç olarak, FA'nın prostat kanseri üzerine etkileri hücre döngüsü ve apoptotik yolak genleri aracılığı ile kapsamlı olarak incelenmiş ve prostat kanseri hücrelerinde çoğalma, invazyon ve koloni oluşumunu önemli derecede baskıladığı gösterilmiştir. FA'nın prostat kanseri üzerine etkisinin moleküler mekanizmasının daha da iyi anlaşılması için daha ileri çalışmalar ile daha da aydınlığa kavuşturulması gerekmektedir. Ayrıca, diğer kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de hücre sinyal ileti yollarında görülen gen etkileşimlerindeki bozuklukların tanımlanması, karsinogeneze ışık tutabilmesi ve prognoza yönelik yeni hedef sağaltım modellerinin geliştirilmesi için bu gibi çeşitli çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada; androjen bağımsız PC-3 (adenokarsinom evre 4) ve androjen bağımlı LNCaP (karsinom) prostat kanseri hücre hatlarında ticari olarak satın aldığımız ferulik asitin etkisi araştırılmış olup sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Ferulik asitin IC_{50} değeri androjen bağımsız PC-3 ve androjen bağımlı LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında sırası ile 48. saatte 300 μ M ve 500 μ M olarak saptanmıştır.
- FA'nın PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında IC_{50} dozlarının hücre döngüsü sinyal iletimi ve apoptoz (programlanmış hücre ölümü) yollarındaki gen ekspresyonları üzerine etkilerinin analizleri yapılmıştır.
- PC-3 prostat kanseri hücre hatlarında ferulik asitin etkileri doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre hücre döngüsü genlerinden ATR, ATM, CDKN1A (p21), CDKN1B (p27), E2F4, RB1, TP53 ekspresyonunun arttığı, CCND1, CCND2, CCND3, CDK2, CDK4, CDK6 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Apoptoz genlerinde ise doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre BIK, BAX, CASP1, CASP2, CYCS ekspresyonun arttığı, BCL2 ekspresyonun azaldığı görülmüştür. Ayrıca PC-3 hücre hattında FA dozu ile mRNA seviyesinde anlamlı azalış görülen genlerden BCL2 ve CDK4 protein seviyesi western blot yöntemi ile değerlendirilmiş ve sonuçların mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim ile korele olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre FA'nın PC-3 hücre hattında hücre döngüsünü durdurabileceği saptanmıştır.
- LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında ferulik asitin etkileri doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre hücre döngüsü genlerinden CDKN1B (p27), CDKN2B (p15) ekspresyonun arttığı, CCNF, CCNT1, CDK6, CDK4 ekspresyonun anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Apoptoz genlerinde ise doz ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre CASP1, CASP2, CASP8, CYCS, FAS, FASLG, TRADD ekspresyonun arttığı, BCL2, XIAP ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Ayrıca LNCaP hücre hattında FA dozu ile mRNA seviyesinde anlamlı azalış olan genlerden BCL2 ve CDK4 proteininin seviyesi western blot yöntemi ile değerlendirilmiş ve sonuçların

mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim ile korele olduğu bulunmuştur. Bulgularımız sonucunda LNCaP hücre hattında FA'nın apoptotik yolağı indükleyebileceği tespit edilmiştir.

- FA'nın PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında sırasıyla 2.5 ± 0.47 ve 4.7 ± 2 kat apoptozu indüklediği TUNEL yöntemi ile saptanmıştır.
- PC-3 hücrelerinde kontrole göre FA'nın invazyonu $\%33.6 \pm 0.5$, LNCaP hücrelerinde ise $\%23 \pm 1.9$ oranında baskıladığı matrigel-invazyon testi ile bulunmuştur.
- PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında FA'nın koloni oluşumunu sırası ile $\%38 \pm 0.82$ ve $\%40 \pm 1.7$ oranında baskıladığı koloni oluşumu testi ile görülmüştür.
- FA'nın prostat kanseri hücre hatları üzerinde hem invazyon hem de koloni oluşumunu baskılayıcı etkisi metastazı da baskılayabileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

Abate-Shen CA, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. **Genes Dev** 2000; 14(19): 2410–34.

Aprikian AG, Bazinet M, Plante M, Meshref A, Trudel C, Aronson S, Nachabe M, Pélouin F, Déssureault J, Narod S. Family history and the risk of prostatic carcinoma in a high risk group of urological patients. **J Urol** 1995;154(2): 404-6.

Asanoma M, Takahashi K, Miyabe M, Yamamoto K, Yoshimi N, Mori H, Kawazoe Y. Inhibitory effect of topical application of polymerized ferulic acid, a synthetic lignin, on tumor promotion in mouse skin two-stage tumorigenesis. **Carcinogenesis** 1994;15 (9): 2069–71.

Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. **Nat Rev Drug Discov** 2008; 7(12): 1001-12.

Attwooll C, Denchi EL, Helin K. The E2F family: Specific functions and overlapping interests. **Embo J** 2004; 23(24):4709-16.

Balk SP, Knudsen KE. AR, the cell cycle, and prostate cancer. **Nucl Recept Signal** 2008; 6:e001. doi: 10.1621/nrs.06001.

Baltacı S. Temel Üroloji. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, **Güneş Tıp Kitabevleri**, Ankara, 2007, s.740-766.

Bandagula VR, Prasad NR. 2-Deoxy-glucose and ferulic acid modulates radiation response signaling in non-small cell lung cancer cells. **Tumour Biol** 2013; 34(1): 251-9.

Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW. Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and Bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. **J Urol** 1996 ;156(4):1511-6.

Bok RA. and Small EJ. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. **Nat Rev Cancer** 2002; 2(12): 918-26.

Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, Di Benedetto G, Pezzino S, Bernardini R. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. **Nutr J** 2008; 7(29): doi: 10.1186/1475-2891-7-29.

Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. **J Urol** 2002; 168(3) : 906-13.

Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002; (38): 99-166.

Breslow RA, Wideroff L, Graubard BL, Erwin D, Reichman ME, Ziegler RG, Ballard-Barbash R. Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Ann Epidemiol* 1999; 9 (4): 254-261.

Brooks JD, Bova GS, Isaacs WB. Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate* 1995; 26 (1): 35-39.

Burns EM, Tober KL, Rigganbach JA, Kusewitt DF, Young GS, Oberyszyn TM. Differential Effects of Topical Vitamin E and C E FerulicH Treatments on Ultraviolet Light B-Induced Cutaneous Tumor Development in Skh-1 Mice. *PLoS One* 2013; 8 (5): e63809. doi: 10.1371/journal.pone.0063809.

Calabrese V, Cornelius C, Trovato A, Cavallaro M, Mancuso C, Di Rienzo L, Condorelli D, De Lorenzo A, Calabrese EJ. The hormetic role of dietary antioxidants in freeradical-related diseases. *Curr Pharm Des* 2010;16 (7): 877–883.

Calabro F and Sternberg CN. Current indications for chemotherapy in prostatecancer patients. *Eur Urol* 2007; 51(1): 17-26.

Carbone C, Campisi A, Musumeci T, Raciti G, Bonfanti R, Puglisi G. FA-loaded lipid drug delivery systems: Preparation, characterization and biological studies. *Eur J Pharm Sci* 2014; 52:12–20.

Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89 (8): 3367-71.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al. Measurement of prostate specific antigen in serum as screening test for prostat cancer. *New Engl J Med* 324:1156,1991.

Chan JM, Stampfer MJ and Giovannucci EL. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Semin Cancer Biol* 1998; 8 (4): 263-273.

Chan JM, Jou RM and Carroll PR. The relative impact and future burden of prostate cancer in the United States *J Urol* 2004; 172 (5):13-17.

Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, Stein JP, Young L, Shi SR, Gee C, Groshen S, Skinner DG, Cote RJ. Combined Effects of p53, p21, and pRb Expression in the Progression of Bladder Transitional Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22 (6):1007-1013.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the Rb protein. *Cell* 1991; 65 (6): 1053-1062.

Chin JL, Reiter RE. Molecular markers and prostate cancer prognosis. *Clin Prostate Cancer* 2004; 3(3): 157–164

Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R. BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 2008; 27 (1): 20–29.

- Cho SD, Li G, Hu H, Jiang C, Kang KS, Lee YS, Kim SH, Lu J. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU145 prostate cancer cells. **Nutrition Cancer** 2005 ;52(2): 213-24
- Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell** 2010; 40: 179–204.
- Cimino S, Sortino G, Favilla V, Castelli T, Madonia M, Sansalone S, Russo GI, Morgia G. Polyphenols: key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. **Oxid Med Cell Longev** 2012; Article ID 632959, 8 pages. doi: 10.1155/2012/632959.
- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric** 1999;79: 362–372.
- Coetzee GA and Ross RK. Prostate cancer and the androgen receptor. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86: 872 –873.
- Cooper GM and Hausman RE. Hücre Moleküler Yaklaşım. Eds.Sakızlı, Atabey N. **İzmir Tıp Kitabevi**, İzmir , 2006, s631-632,591-608.
- Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. **Urology** 2003; 62(6): 3-12.
- De Marzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and Molecular Aspects of Prostate Cancer. **Lancet** 2003; 361: 955-964.
- Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9: 378–390.
- Dong Q, Meng P, Wang T, Qin W, Wang F, Yuan J, Chen Z, Yang A, Wang H. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2. **PLoS One** 2010; 5 (4): e10147.
- Donovan J and Slingerland J. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. **Breast Cancer Res** 2000; 2(2): 116-124.
- Dowsing AT, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, De Krester DM, Trounson AO. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen receptor gene. **Lancet** 1999; 354(9179): 640–643.
- D'Angiolella V, Donato V, Vijayakumar S, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Dynlacht B, Pagano M. SCF Cyclin F controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity via CP110 degradation. **Nature** 2010; 466(7302): 138–142.
- D'Archivio M, Filesì C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanita** 2007; 43(4): 348–361.
- Eaton L. World cancer rates set to double by 2020. **BMJ** 2003; 326(7392): 728.

Ecstein-Fraisse E, Su Z. Cabazitaxel-a next-generation taxane for the treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. **Gan To Kagaku Ryoho** 2014; 41(7): 817-822.

Erdem MG, Cinkilic N, Vatan O, Yilmaz d, Bagdas D, Bilaloglu R. Genotoxic and anti-genotoxic effects of vanillic acid against mitomycin C-induced genomic damage in human lymphocytes *in vitro*. **Asian Pac J Cancer Prev** 2012; 13(10): 4993-4998.

Esposito V, Baldi A, Tonini G. Analysis of cell Cycle Regulator Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer. **J Clin Pathol** 2004; 57(1): 58-63.

Fan C, Quan R, Feng X, Gillis A, He L, Matsumoto ED, Salama S , Cutz JC, Kapoor A , Tang D. ATM activation is accompanied with earlier stages of prostate tumorigenesis. **Biochim Biophysica Acta** 2006; 1763(10): 1090–1097.

Fang HY, Wang HM, Chang KF, Hu HT, Hwang LJ, Fu TF, Lin YC, Chang WC, Chiu TP, Wen ZH, Fong Y, Chiu CC, Chen BH. Feruloyl-L-arabinose attenuates migration, invasion and production of reactive oxygen species in H1299 lung cancer cells. **Food Chem Toxicol** 2013; 58: 459-466. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.019.

Fazary AE, Ju YH. Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)** 2007 ; 39(11): 811–828.

Fidaner C, Eser SY, Parkin DM. Incidence in İzmir in 1993-94: First results from İzmir cancer registry. **Eur J Cancer** 2001; 37(1): 83-92.

Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. **Med Res Rev** 2009; 26(6): 747-766.

Fresco P, Borges F, Marques MP, Diniz C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. **Curr Pharm Des** 2010;16(1): 114–134.

Gatei M, Sloper K, Sorensen C, Syljuäsen R, Falck J, Hobson K, Savage K, Lukas J, Zhou BB, Bartek J, Khanna KK. Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM) and NBS1-Dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing Radiation. **J Biol Chem** 2003; 278(17): 14806-14811.

Gilligan T, Manola J, Sartor O, Weinrich SP, Moul JW, Kantoff PW. Absence of a correlation of androgen receptor gene CAG repeat length and prostate cancer risk in an African- American population. **Clin Prostate Cancer** 2004; 3(2): 98–103.

Gnanapragasam VJ, McCahy PJ, Neal DE, Robson CN. Insulin like growth factor II and androgen receptor expression in the prostate. **BJU Int** 2000; 86(6): 731-735.

Gonzalvo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. **J Urol** 2003; 170 (6): 2444-2452.

Göğüş Ç. Prostat kanseri tanısında PSA 4ng/ml sınırı geçerli midir? **Üroonkoloji Bülteni** 2006; 1: 6-11.

Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radic Biol Med** 1992; 13(4): 435-448.

Grignon DJ, Hammond EH. College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Report of prostate cancer working group. **Arch Pathol Lab Med** 1995; 119 (12): 1122- 1126.

Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet** 2003; 361 (9360): 859-864.

Grubb RL, Pinsky PF, Greenlee RT, Izmirlian G, Miller AB, Hickey TP, Riley TL, Mabile JE, Levin DL, Chia D, Kramer BS, Reding DJ, Church TR, Yokochi LA, Kvale PA, Weissfeld JL, Urban DA, Buys SS, Gelmann EP, Ragard LR, Crawford ED, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD, Andriole GL. Prostate cancer screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian cancer screening trial: Update on findings from the initial four rounds of screening in a randomized trial. **BJU Int** 2008; 102(11):1524–1530.

Guthman DA, Wilson TM, Blute TM, Bergstralh EJ, Zincke H, Oesterling JE. Biopsy - proved prostate cancer in 100 consecutive men with benign digital rectal examination and elevated serum prostate-specific antigen level. Prevalence and pathologic characteristics. **Urology** 1993; 42(2):150-154.

Guo Y, Kyprianou N. Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. **Cancer Res** 1999; 59(6):1366-1371.

Gürbüz N. Tümör progresyonunun önlenmesi için prostat kanser hücrelerinde PKC δ ve PKC ϵ ' nun CDME tarafından kontrolü. Doktora tezi, **Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Antalya, 2010, s.14.

Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi. **İstanbul Tıp Kitabevi**, İstanbul, 2014, s.312-314.

Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, Ries LA, Merrill RM, Kaplan RS. Cancer surveillance series: Interpreting trends in prostate cancer. Part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91(12): 1017-1024.

Harry WF, Lubing G, Andrew MY, Muxiang Z. Expression and Regulation of Bcl-2, Bcl-XI, and Bax Correlate with p53 Status and Sensitivity to Apoptosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood** 1997; 89(8): 2986-2993.

Hellerstedt BA and Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. **CA Cancer J Clin** 2002; 52(3): 154–179.

Hemaiswarya S, Doble M. Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line. **Phytomedicine** 2013; 20(2): 151–158.

Hou Y, Yang J, Zhao G, and Yuan Y. Ferulic acid inhibits endothelial cell proliferation through NO downregulating ERK1/2 pathway. **J Cell Biochem** 2004; 93(6): 1203–1209.

Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Res** 1988; 48 (21): 5941–5946.

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutr Cancer** 2010; 62(1): 1–20.

Hussain M, Wolf M, Marshall E, Crawford ED, Isenberger M. Effects of continued androgen-deprivation therapy and other prognostic factors on response and survival in phase II chemotherapy trials for hormone-refractory prostate cancer: a southwest oncology group report. **J Clin Oncol** 1994; 12: 1868–1875.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer** 2002; 2(4): 277-288.

Ittmann, MM and Wiczorek R. Alterations of the retinoblastoma gene in clinically localized, stage B prostate adenocarcinomas. **Hum Pathol** 1996; 27(1): 28-34.

Janicke B, Hegardt C, Krogh M, Onning G, Akesson B, Cirenajwis HM, Oredsson SM. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. **Nutr Cancer** 2011; 63(4): 611–622.

Jarrard DF, Modder J, Fadden P, Fu V, Sebree L, Heisey D, Schwarze SR, Friedl A. Alterations in the p16/pRb cell cycle checkpoint occur commonly in primary and metastatic human prostate cancer. **Cancer Lett** 2002; 185(2) :191-199.

Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, Dewitt DL, Nair MG. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. **J Agric Food Chem** 2006; 54(15): 5375–5381.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin** 2008; 58(2): 71-96.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61(2): 69–90.

Joseph IB, Isaacs JT. Potentiation of the antiangiogenic ability of linomide by androgen ablation involves down-regulation of vascular endothelial growth factor in human androgen-responsive prostatic cancers. **Cancer Res** 1997; 57(6): 1054-7.

Kambhampati S, Ray G, Sengupta K, Reddy VP, Banerjee SK, VanVeldhuizen PJ. Growth factors involved in prostate carcinogenesis. **Front Biosci** 2005;10: 1355-1367.

Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtzoglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Res** 2004; 6(2): 63–74.

Kanski J, Aksenova M, Soyanova A, and Butterfield DA. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. **J Nutr Biochem** 2002; 13(5): 273–281.

Kantoff PW, Halabi S, Conaway M, Picus J, Kirshner J, Hars V, Trump D, Winer EP, Vogelzang NJ. Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukemia group B 9182 study. *J Clin Oncol* 1999;17(8): 2506–2513.

Karanika S, Karantanos T, Li L, Corn PG, Thompson TC. DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. *Oncogene* 2014; doi: 10.1038/onc.2014.238.

Karthikeyan S, Kanimozhi G, Prasad NR, Mahalakshmi R. Radiosensitizing effect of ferulic acid on human cervical carcinoma cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2011; 25(7): 1366–1375.

Kasap M, Pazarbaşı A, Alptekin D. Tıbbi Biyoloji ve Genetik, *Nobel Kitabevi*, Adana, 2010, s421,151-154.

Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenic relevance for the (CAG)_n - expanded neuropathies. *Hum Mol Genet* 1995; 4(4): 523 – 527.

Kawano Y, Nagata M, Kohno T, Ichimiya A, Iwakiri T, Okumura M, Arimori K. Caffeine increases the antitumor effect of Cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(3): 400-447.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-257.

Keyhanian S, Stahl-Biskup E. Phenolic constituents in dried flowers of aloe vera (*Aloe barbadensis*) and their in vitro antioxidative capacity. *Planta Med* 2007; 73(6): 599–602.

Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* 2004; 3(11): 1051-1057.

Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Concepts of Genetics, Eds. Öner C, Sümer S, Öner R, Öğüş A, Açık L. *Palme Yayıncılık*, Ankara, 2009, s.437-446.

Knudsen KE, Arden KC, Cavenee WK. Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20213–20222.

Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Huang X, Turner B, Bubendorf L, Kallioniemi OP, Shabaik A, Vitiello A, Peehl D, Gao GJ, Reed JC. Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(13): 4914–4925.

Kubota Y, Shuin T, Uemura H, Fujinami K, Miyamoto H, Torigoe S, Dobashi Y, Kitamura H, Iwasaki Y, Danenberg K, et al. Tumor suppressor gene p53 mutations in human prostate cancer. *Prostate* 1995; 27(1): 18–24

Kumagai J, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie - Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Blumberg B, Inoue S. Cytochrome P450 2B6 is a growth -

- inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. *Prostate* 2007; 67 (10): 1029 – 1037.
- Kyprianou N, Isaacs JT. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 1988; 122(2):552-562.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48(1): 6-29.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999, 49(1): 8-31.
- Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 2002; 297(5585): 1352–1354.
- Latil A, Bièche I, Pesche S, Valéri A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 over expression in metastatic forms. *Int J Cancer* 2000; 89(2): 167-71.
- Lattouf JB, Srinivasan R, Pinto PA, Linehan WM, Neckers L. Mechanisms of disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy. *Nat Clin Pract Urol* 2006; 3(11): 590-601.
- Leach R, Pollock B, Basler J, Troyer D, Naylor S, Thompson IM. Chemoprevention of prostate cancer: focus on key opportunities and clinical trials. *Urol Clin North Am* 2003, 30(2): 227-237.
- Lee KW, Lee H J. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors* 2006; 26(2): 105–121.
- Li X, Shang L, Wu Y, Abbas S, Li D, Netter P, Ouzzine M, Wang H, Magdalou J. Identification of the human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of the phytochemical ferulic acid. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011; 26(4): 341-350.
- Lin CM, Chiu JH, Wu IH, Wang BW, Pan CM, Chen YH. Ferulic acid augments angiogenesis via VEGF, PDGF and HIF-1 α . *J Nutr Biochem* 2010; 21(7): 627–633.
- Lowitz BB, Casciato DA. Klinik Onkoloji El Kitabı, Eds. Manavoğlu O, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 2007, s. 762.
- Lu Y, Jiang F, Jiang H, Wu K, Zheng X, Cai Y, Katakowski M, Chopp M, To SS. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 641(2-3): 102-107.
- MacDougall DB. Colour in Food Improving Quality. *Woodhead Publishing Limited*, Cambridge, England, 2002, s.179-221.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1): 230–242.

Mancuso C, Barone E. Therapeutic use of tea derivatives: all that glitters is not gold. **Blood** 2009; 114(11): 2359–2360.

Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. **Food Chem Toxicol** 2014; 65:185-195.

Manson MM, Ball HW, Barrett MC, Clark HL, Judah DJ, Williamson G, Neal GE. Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B1 metabolism. **Carcinogenesis** 1997; 18(9): 1729–1738.

Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy, Zhao Y, DiConcini D, Puxeddu E, Esen A, Eastham J, Weigel NL, Lamb D J. Androgen receptor mutations in prostate cancer. **Cancer Res** 2000; 60(4): 944-949.

McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. **Cancer Res** 1992; 52(24): 6940-6944.

McKnight JJ, Gray SB, O'Kane HF, Johnston SR, Williamson KE. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. **J Urol** 2005; 173(3): 683-690.

Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. **Int J Mol Med** 2008; 22(4): 433–439.

Menteş G, Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası, 1. Baskı, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2002, s. 491-501.

Mermelshtein A, Gerson A, Walfisch S, Delgado B, Shechter-Maor G, Delgado J, Fich A, Gheber L. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. **Br J Cancer** 2005; 93(3): 338–345.

Meyer A, Wilhelm B, Dörk T, Bremer M, Baumann R, Karstens JH, Machtens S. ATM missense variant P1054R predisposes to prostate cancer. **Radiother Oncol** 2007; 83(3): 283–288.

Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X - linked spinal and bulbar muscularatrophy. **Nat Genet** 1993; 5(2): 184 –188.

Min J, Zaslavsky A, Fedele G, McLaughlin SK, Reczek EE, De Raedt T, Guney I, Strohlic DE, Macconail LE, Beroukhim R, Bronson RT, Ryeom S, Hahn WC, Loda M, Cichowski K. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. **Nat Med** 2010; 16 (3): 286-294.

Mittnacht S, Andweinberg, RA. G1/S Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein is Associated with an Altered Affinity for the Nuclear Compartment. **Cell** 1991; 65(3): 381-393.

Montenegro MF, Sánchez-Del-Campo L, Fernández-Pérez MP, Sáez-Ayala M, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. **Oncogene** 2014; doi: 10.1038/onc.605.

Moorthy, HK. and Venugopal P. Strategies for prostate cancer prevention: Review of the literature. **Indian J Urol** 2008; 24(3): 295-302.

Morris EV, Cerundolo L, Lu M, Verrill C, Fritzsche F, White MJ, Thalmann GN, Ten Donkelaar CS, Ratnayaka I, Salter V, Hamdy FC, Lu X, Bryant RJ. Nuclear iASPP may facilitate prostate cancer progression. **Cell Death Dis** 2014; 5:e1492. doi: 10.1038/cddis.

Muller PA, Trinidad AG, Timpson P, Morton JP, Zanivan S, van den Berghe PV, Nixon C, Karim SA, Caswell PT, Noll JE, Coffill CR, Lane DP, Sansom OJ, Neilsen PM, Norman JC, Vousden KH. Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion. **Oncogene** 2013; 32(10): 1252–1265.

Murakami A, Kadota M, Takahashi D, Taniguchi H, Nomura E, Hosoda A, Tsuno T, Maruta Y, Ohigashi H, Koshimizu K. Suppressive effects of novel ferulic acid derivatives on cellular responses induced by phorbol ester, and by combined lipopolysaccharide and interferon-gamma. **Cancer Lett** 2000; 157(1): 77–85.

Murakami A, Nakamura Y, Koshimizu K, Takahashi D, Matsumoto K, Hagihara K, Taniguchi H, Nomura E, Hosoda A, Tsuno T, Maruta Y, Kim HW, Kawabata K, Ohigashi H. FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid. **Cancer Lett** 2000; 180(2): 121–129.

Nagata S. Apoptosis by death factor, **Cell** 1997; 88(3): 355-365.

Neto AS, Tobias-Machado M, Wroclawski ML, Fonseca FL, Teixeira GK, Amarante RD, Wroclawski ER, Del Giglio A. Her-2/neu expression in prostate adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. **J Urol** 2010; 184(3): 842-850.

Nikoleishvili D, Pertia A, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A. Expression of p27(Kip1), cyclin D3 and Ki67 in BPH, prostate cancer and hormone-treated prostate cancer cells. **Int Urol Nephrol** 2008; 40(4): 953–959.

Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. **Am J Pathol** 1998; 153(1): 141–148.

Ogawa T, Hasegawa Y, Nakayama B, Fujimoto Y, Kohmura T, Matsuura H, Koshikawa T, Miyata H. An Immunohistochemical Study of Rb Tumor Suppressor Gene Protein and Bcl-2 Gene Protein in Carcinomas of the Thyroid Gland. **Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho** 1998; 101(5): 595-601.

Parkin DM, Bray F, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer** 2001; 37 (8): 4 – 66.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** 2005; 55(2): 74-108.

Peng CC, Chyau CC, Wang HE, Chang CH, Chen KC, Chou KY, Peng RY. Cytotoxicity of Ferulic Acid on T24 Cell Line Differentiated by Different Microenvironments. **BioMed Res Int** 2013; doi: 10.1155/2013/579859.

Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. **Ann Intern Med** 1993; 118 (10): 793-803.

Plesca D, Crosby ME, Gupta D, Almasan A. E2F4 function in G2: maintaining G2-arrest to prevent mitotic entry with damaged DNA. **Cell Cycle** 2007; 6(10):1147-1152.

Prscott JL, Blok L, Tindall DJ. Isolation and Androgen Regulation of Human Homeobox cDNA, NKX3.1. **Prostate** 1998; 35(1): 71 - 80.

Ramp U, Krieg T, Caliskan E, Mahotka C, Ebert T, Willers R, Gabbert HE, Gerharz CD. XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. **Hum Pathol** 2004; 35(8): 1022–1028.

Ray ME, Dunn RL, Cooney KA, Sandler HM. Family history of prostate cancer and relapse after definitive external beam radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 57(2): 371-376.

Reiter RE, deKernion JB. Campbell's Urology, Patrick C, Walsh MD, 8. baskı, **Güneş Tıp Kitabevi**, Ankara, 2005, s.3003-3019.

Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007 ; 8(5): 405-413.

Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2002; 277(33): 29803–29809.

Roemeling S, Roobol MJ, de Vries SH, Gosselaar C, van der Kwast TH, Schröder FH. Prevalence, treatment modalities and prognosis of familial prostate cancer in a screened population. **J Urol** 2006; 175(4): 1332-1336.

Ross JS, Sheehan CE, Dolen EM, Kallakury BV. Morphologic and molecular prognostic markers in prostate cancer. **Adv Anat Pathol** 2002; 9(2): 115-128.

Rubin, MA, De Marzo AM. Molecular genetics of human prostate cancer. **Mod Pathol** 2004; 17(3): 380–388.

Sakai S, Kawamata H, Kogure T, Mantani N, Terasawa K, Umatake M, Ochiai, H. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW 264.7 cells. **Mediators Inflamm** 1999; 8: 173-175.

Saldamlı İ. Gıda Kimyası. **Hacettepe Üniversitesi Yayınları**, Ankara, 2007, s. 463-492.

- Scaggiante B. Prostate-tumor-inducing gene-1 analysis in human prostate cancer cells and tissue in relation to Mycoplasma infection **Cancer Invest** 2008; 26(8): 800-808.
- Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Maattanen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. **N Engl J Med** 2009; 360(13): 1320–1328.
- Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. **Semin Arthritis Rheum** 2003; 32(6): 345-369.
- Shackney SE, Silverman JF. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. **Adv Anat Pathol** 2003; 10(5): 278–90.
- Shibue T and Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. **Int J Cancer** 2006; 119 (9): 2036-2043.
- Shiloh Y, Kastan MB. ATM: Genome Stability, Neuronal Development, and Cancer Cross Paths, **Adv Cancer Res** 2001; 83: 209-254.
- Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Rubinstein D, Viole G, Stetler-Stevenson WG. Dietary intake of a plant phospholipid/lipid conjugate reduces lung cancer growth and tumor angiogenesis. **Carcinogenesis** 2014; 35(7): 1556-1563.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2013; 63 (1): 11–30.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin** 2014; 64 (1): 9–29.
- Silva J, Teixeira AL, Lobo F, Maurício J, Medeiros R. DNA repair system and prostate cancer progression: the role of NBS1 polymorphism (rs1805794). **DNA Cell Biol** 2012; 31 (7): 1182–1186.
- Sirma H, Broemel M, Stumm L, Tsourlakis T, Steurer S, Tennstedt P, Salomon G, Michl U, Haese A, Simon R, Sauter G, Schlomm T, Minner S. Loss of CDKN1B/p27Kip1 expression is associated with ERG fusion-negative prostate cancer, but is unrelated to patient prognosis. **Oncol Lett** 2013; 6(5):1245-1252.
- Song JZ, Stirzaker C, Harrison J, Melki JR, Clark SJ. Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells. **Oncogene** 2002; 21(7): 1048-1061.
- Staubesand J. Sobotta insan anatomisi atlası. 3. Baskı, 2. cilt Münih, **Urban&Schwarzenberg**, 1990, s. 216.
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Ann Rev Cell Biol** 1993; 9: 541-573.

Susaki E, Nakayama K, Nakayama KI. Cyclin D2 translocates p27 out of the nucleus and promotes its degradation at the G0-G1 transition. *Mol Cell Biol* 2007; 27(13): 4626–4640.

Szliszka E, Czuba ZP, Bronikowska J, Mertas A, Paradysz A, Krol W. Ethanolic extract of propolis augments TRAIL induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; doi: 10.1093/ecam/nep180.

Szliszka E, Krol W. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; doi: 10.1155/2013/731940.

Szliszka E, Sokol-Letowska A, Kucharska AZ, Jaworska D, Czuba ZP, Krol W. Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; doi: 10.1155/2013/757628.

Takagaki K, Katsuma S, Kaminishi Y, Horio T, Tanaka T, Ohgi T, Yano J. Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-Induced Differentiation of Human Leukemia K562 Cells. *Genes Cells* 2005; 10(2): 97-106.

Takahashi S. Roles of medical oncologists in the new era of CRPC therapy in Japan. *Gan To Kagaku Ryoho*.2014; 41(7): 827-831.

Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A, Andreeff M, Reed JC. Expression and prognostic significance of IAP family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1796–1803.

Tanagha EA,McAninch JW. Smith Genel Üroloji, Eds. Kazancı G, 17.Baskı, *Nobel Tıp Kitabevleri*, Ankara, 2009, s.358-359.

Tong Y, Yang Q, Vater C, Venkatesh LK, Custeau D, Chittenden T, Chinnadurai G, Gourdeau H. The pro-apoptotic protein, Bik, exhibits potent antitumor activity that is dependent on its BH3 domain. *Mol Cancer Ther* 2001; 1(2): 95–102.

Tricoli JV, Gumerlock PH, Yao JL, Chi SG, D'Souza SA, Nestok BR, deVere White RW. Alterations of the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15(2): 108-114.

Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(1): 11–20.

Tsai CM, Yen GC, Sun FM, Yang SF, Weng CJ. Assessment of the Anti-invasion Potential and Mechanism of Select Cinnamic Acid Derivatives on Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Mol Pharm* 2013; 10(5): 1890-1900.

Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 1999; 50: 401-423.

Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debryne FM, Isaacs WB. Expression of thecellular adhesion molecule E-cadherin is

reduced or absent in high-grade prostate cancer. **Cancer Res** 1992; 52(18): 5104-5109.

Van Brussel JP, Mickisch GH. Prognostic factors in prostate and testis cancer. **BJU Int** 1999; 83(8): 910-917.

Van der Crujisen-Koeter IW, Vis AN, Roobol MJ, Wildhagen MF, de Koning HJ, van der Kwast TH, Schroder FH. Comparison of screen detected and clinically diagnosed prostate cancer in the European randomized study of screening for prostate cancer, section rotterdam. **J Urol** 2005; 174 (1): 121-125.

VanOosten RL, Earel JK Jr, Griffith TS. Histone deacetylase inhibitors enhance Ad5-TRAIL killing of TRAIL-resistant prostate tumor cells through increased caspase-2 Activity. **Apoptosis** 2007; 12(3): 561–571.

Velcheti V, Karnik S, Bardot SF, Prakash O. Pathogenesis of prostate cancer: lessons from basic research. **Ochsner J** 2008; 8(4): 213–218.

Wagner KW, Engels IH, Deveraux QL. Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. **J Biol Chem** 2004; 279(33): 35047–35052.

Walsh PC, Retik AB, Vaughan DE, Wein AJ: Campbell Üroloji, Eds. Anafarta MK, Yaman MÖ, VIII.baskı. cilt 4, **Günes Kitabevi**, Ankara, 2005, s. 3003-3005.

Wang BH, Ou-Yang TP. Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system. **Cardiovasc Drug Rev** 2005; 23(2): 161-172.

Wang J, Yuan Z, Zhao H, Ju D, Chen Y, Chen X, Zhang J. Ferulic acid promotes endothelial cells proliferation through up-regulating cyclin D1 and VEGF. **J Ethnopharmacol** 2011; 137(2): 992-997.

Werner AB, Tait SW, de Vries E, Eldering E, Borst J. Requirement for aspartate-cleaved bid in apoptosis signaling by DNA-damaging anti-cancer regimens. **J Biol Chem** 2004; 279(27): 28771–28780.

William K and Oh MD. Chemotherapy for patients with advanced prostate carcinoma: a new option for therapy. **Cancer** 2000; 88: 3015-3021.

Wilson SR, Gallagher S, Warpeha K, Hawthorne SJ. Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. **Prostate** 2004; 60(2): 168-174.

Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics,1995. **CA Cancer J Clin** 1995; 45(1): 8-30.

Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou, N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. **Cancer Res** 2001; 61(3): 1227-1232.

Wong CC, Meini W, Glatt HR, Barron D, Stalmach A, Steiling H, Crozier A, Williamson G. In vitro and in vivo conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans. **J Nutr Biochem** 2010; 21(11): 1060-1068.

Xu Y, Chen SY, Ross KN, Balk SP. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and posttranscriptional increases in cyclin D proteins. **Cancer Res** 2006; 66(15): 7783–7792.

Yong EL, Lim J, Qi W, Ong V, Mifsud A. Molecular basis of androgen receptor diseases. **Ann Med** 2000; 32(1): 15 – 22.

Yoshino T, Shiina H, Urakami S, Kikuno N, Yoneda T, Shigeno K, Igawa M. Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. **Clin Cancer Res** 2006; 12(20): 6116-6124.

Yuan Z, Zhang JP, Yang C. Study on the effects of ferulic acid on the vascular smooth muscle cell migration in vitro. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi** 2012; 32(2): 229-233.

Zhao ZH, Moghadasian MH. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chem** 2008; 109: 691-702.

Zheng, RL, Zhan H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. **Free Radic Biol Med** 1996; 22(4): 581-586 .

Zhu W, Giangrande PH, Nevins JR. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. **EMBO J** 2004; 23(23): 4615–4626.

Zieske JD. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair. **Prog Retin Eye Res** 2000; 19(3): 257-270.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther** 2001; 92(1): 57–70.

WEB_1. Society, A.C., Cancer Facts and Figures, 2014. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/> , (alındığı tarih: 15.11.2014).

WEB_2. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2012. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-2952/istatistik-yilliklari.html>, (alındığı tarih: 17.11.2014).

WEB_3. National Cancer Institute of Canada. Canadian Cancer Statistics, 2000. Toronto, Canada. <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2002EN.pdf>. (alındığı tarih: 19.11.2014)

WEB_4. World Health Organization, Gender, Health and Ageing. 2003. http://www.who.int/gender/documents/en/Gender_Ageing.pdf. (alındığı tarih: 13.11.2014).

WEB_5. Society, A.C., Cancer Facts and Figures, 2010. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2010/index>, (alındığı tarih: 28.11.2014).

WEB_6. http://www.uroonkoloji.org/files/11_Uroonkoloji_Kongresi.pdf. (son güncelleme tarihi: 10.11.2013, alındığı tarih: 25.10.2014).

WEB_7. Society, A.C., Cancer Facts and Figures, 2012. <http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2012/>, (alındığı tarih: 28.11.2014)

WEB_8. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/128708?lang=en®ion=TR>, (alındığı tarih: 15.11.2014).

WEB_9. <http://www.atcc.org/products/all/CRL-1435.aspx>, (alındığı tarih: 15.10.2014).

WEB_10. <http://www.atcc.org/products/all/CRL-1740.aspx>, (alındığı tarih: 15.10.2014).

WEB_11. XTT Cell Proliferation Assay Kit. <http://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>. (alındığı tarih: 27.11.2014).

WEB_12. <http://www.pubmed.com>. (alındığı tarih: 20.11.2014).

WEB_13. TUNEL Protokol, <http://lifescience.roche.com/shop/products/in-situ-cell-death-detection-kit-fluorescein>. (alındığı tarih: 15.12.2014).

8.ÖZGEÇMİŞ

Canan EROĞLU 1988 yılında İnegöl'de doğdu. İlköğretimini Alanyurt İlköğretim Okulu'nda ve lise eğitimini İnegöl Lisesi'nde tamamladı. 2011 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü bitirdi. 2013 yılında Necmettin ERBAKAN Üniversitesi ÖYP araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Yüksek lisans eğitimi almak için Pamukkale Üniversitesi'ne görevlendirildi ve 2013 yılında Pamukkale Üniversitesi'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

9. EKLER

Ek-1. Ferulik asitin PC-3 hücre hattında hücre döngüsü gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler ($p>0.05$)

Gen	Artış	Gen	Azalış
ANAPC2	246,5952	AURKA	-34,0308
BCCIP	4,0144	AURKB	-33,7988
BRCA1	1006,7506		
BRCA2	1991,2562		
CCNA2	65,8106		
CCNB1	3,9653		
CCNB2	16,0306		
CCNC	16,2047		
CCNE1	32,1136		
CCNF	130,0068		
CCNG1	16,0473		
CCNG2	31,495		
CCNH	8,0119		
CCNT1	1043,6042		
CDC16	32,0498		
CDC20	8,2065		
CDC25A	127,8752		
CDC25C	260,3525		
CDC34	1044,6603		
CDC6	63,8365		
CDK1	1,9926		
CDK5R1	8228,6235		
CDK5RAP1	525,09		
CDK7	261,4224		
CDK8	1036,2721		
CDKN2A	31,6511		
CDKN2B	62,9145		
CDKN3	15,7597		
CHEK1	15,8118		
CHEK2	128,5452		
CKS1B	16,2739		
CKS2	32,4793		
CUL1	133,0568		
CUL2	513,9104		
CUL3	16,2762		
E2F1	128,1129		
GTSE1	31,3099		
HUS1	252,3997		

“Devamı Arkada”

EK-1. Ferulik asitin PC-3 hücre hattında hücre döngüsü gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler ($p>0.05$)

Gen	Artış	Gen	Azalış
KNTC1	63,6779		
KPNA2	2,0099		
MAD2L1	15,9193		
MAD2L2	3,9388		
MCM2	1,9781		
MCM3	2,0076		
MCM4	64,4003		
MCM5	32,5581		
MDM2	4131,6346		
MKI67	15,7632		
MNAT1	8,016		
MRE11A	15,7402		
NBN	64,9706		
RAD1	249,7885		
RAD17	64,3141		
RAD51	31,7069		
RAD9A	259,1715		
RBBP8	129,9586		
RBL1	63,9983		
RBL2	64,8229		
SERTAD1	256,3536		
SKP2	31,6823		
STMN1	2,0002		
TFDP1	264,3666		
TFD2	129,4568		
WEE1	62,5952		

Ek-2. Ferulik asitin PC-3 hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler ($p>0.05$)

Gen	Artış	Gen	Azalış
ABL1	1,7398	AIFM1	-1,1537
APAF1	27,7661	AKT 1	-1,1482
BAD	1,7432	BCL2L1	-1,1447
BAG1	1,7488	BAG3	-1,16
BAK1	1,7268	BCL2L2	-1,1616
BCL10	3,4526	BIRC2	-1,1523
BCL2A1	222,8216	BNIP2	-1,1227
BCL2L10	29,4463	BNIP3	-1,1477
BCL2L11	3,453	BNIP3L	-1,1341
BRAF	1,7326	LTBR	-1,1489
BID	1,7414	NFKB1	-1,1638
BIRC3	7,0211	NOL3	-1,15
BIRC5	3,4825	RIPK2	-1,1751
BIRC6	1,7466	TNFRSF10B	-1,149
CASP3	1,143		

“Devamı Arkada”

Ek-2. Ferulik asitin PC-3 hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler ($p>0.05$)

Gen	Artış	Gen	Azalış
CASP10	55,2034	TRAF2	-1,1427
CASP14	54,815		
CASP4	1,7471		
CASP5	55,7601		
CASP6	1,7411		
CASP7	3,4972		
CASP8	6,9203		
CASP9	1,7355		
CD27	55,7991		
CD40	55,946		
CD40LG	55,5943		
CD70	56,1306		
CFLAR	1,7119		
CIDEA	27,9173		
CIDEB	1,7443		
CRADD	1,7378		
DAPK1	27,8298		
DFFA	1,7556		
DIABLO	1,7995		
FADD	1,733		
FAS	3,5007		
FASLG	55,414		
GADD45A	3,4571		
HRK	13,8067		
IGF1R	1,7263		
IL10	27,6634		
LTA	55,5452		
MCL1	1,7242		
NAIP	6,9569		
NOD1	6,7801		
PYCARD	55,7576		
TNF	55,2298		
TNFRSF10A	6,948		
TNFRSF11B	111,3301		
TNFRSF1A	1,7448		
TNFRSF1B	28,7868		
TNFRSF21	1,7256		
TNFRSF25	27,6869		
TNFRSF9	55,8183		
TNFRSF10	6,9738		
TNFSF8	111,2233		
TP53BP2	1,7402		
TP73	28,053		
TRADD	3,3628		
TRAF3	1,7479		
XIAP	6,8028		

Ek-3. Ferulik asitin LNCaP hücre hattında hücre döngüsü gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler ($p>0.05$)

Gen	Artış	Gen	Azalış
ANAPC2	1,3079	CCNA2	-1,5423
ATM	2,6677	CCND1	-1,4882
ATR	1,3203	CCND3	-1,5194
AURKA	1,2917	CCNE1	-1,5205
AURKB	1,3081	CDC34	-1,5114
BCCIP	1,3153	CDC16	-1,555
BRCA1	1,3179	CDK7	-1,5474
BRCA2	2,6363	CDKN1A	-1,536
CCNB1	1,3215	E2F1	-1,5232
CCNB2	1,3313	E2F4	-1,5314
CCNC	1,331	GTSE1	-1,542
CCNG1	1,3363	KNTC1	-1,5394
CCNG2	1,3106	MAD2L2	-1,5195
CCNH	1,3121	MCM3	-1,5435
CDC20	1,3197	MCM4	-1,5319
CDC25A	1,3241	MCM5	-1,5101
CDC25C	1,3025	MKI67	-1,5246
CDC6	1,3344	RAD9A	-1,5267
CDK1	1,3242	RB1	-1,5264
CDK2	1,3225	RBL2	-1,5257
CDK5R1	5,2956	SERTAD1	-1,5201
CDK5RAP1	1,3135	SKP2	-1,5388
CDK8	1,3214	TFDP1	-1,5214
CDKN2A	1,2962	TP53	-1,5156
CDKN3	1,3276		
CHEK1	1,3455		
CHEK2	1,3225		
CKS1B	1,3126		
CKS2	1,3381		
CUL1	1,3487		
CUL2	1,3048		
CUL3	1,2968		
HUS1	5,2495		
KPNA2	1,3121		
MAD2L1	1,315		
MCM2	1,343		
MDM2	2,6165		
MNAT1	1,3425		
NBN	1,3148		
RAD1	1,3125		
RAD17	2,6363		
RAD51	1,3196		
RBBP8	1,32		
RBL1	1,3131		
STMN1	1,3089		
TFD2	1,3344		
WEE1	1,3149		

Ek-4. Ferulik asitin LNCaP hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler ($p>0.05$)

Gen	Artış	Gen	Azalış
ABL1	1,7398	AIFM1	-1,1537
APAF1	27,7661	AKT 1	-1,1482
BAD	1,7432	BAG3	-1,16
BAG1	1,7488	BCL2L1	-1,1447
BAK1	1,7268	BCL2L2	-1,1616
BAX	1,7397	BIRC2	-1,1523
BCL10	3,4526	BNIP2	-1,1227
BCL2A1	222,8216	BNIP3	-1,1477
BCL2L10	29,4463	BNIP3L	-1,1341
BCL2L11	3,453	CASP3	-1,143
BRAF	1,7326	LTBR	-1,1489
BID	1,7414	NFKB1	-1,1638
BIK	1,7326	NOL3	-1,15
BIRC3	7,0211	RIPK2	-1,1751
BIRC5	3,4825	TNFRSF10B	-1,149
BIRC6	1,7466	TP53	-1,1503
BRAF	3,4685	TRAF2	-1,1427
CASP10	55,2034		
CASP14	54,815		
CASP4	1,7471		
CASP5	55,7601		
CASP6	1,7411		
CASP7	3,4972		
CASP9	1,7355		
CD27	55,7991		
CD40	55,946		
CD40LG	55,5943		
CD70	56,1306		
CFLAR	1,7119		
CIDEA	27,9173		
CIDEB	1,7443		
CRADD	1,7378		
DAPK1	27,8298		
DFFA	1,7556		
DIABLO	1,7995		
FADD	1,733		
GADD45A	3,4571		
HRK	13,8067		
IGF1R	1,7263		
IL10	27,6634		
LTA	55,5452		
MCL1	1,7242		
NAIP	6,9569		
NOD1	6,7801		
PYCARD	55,7576		
TNF	55,2298		
TNFRSF10A	6,948		
TNFRSF11B	111,3301		
TNFRSF1A	1,7448		

Ek-4. Ferulik asitin LNCaP hücre hattında apoptotik yolak gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre artış ve azalış gösteren genler ($p>0.05$)

Gen	Artış	Gen	Azalış
TNFRSF1B	28,7868		
TNFRSF21	1,7256		
TNFRSF25	27,6869		
TNFRSF9	55,8183		
TNFRSF10	6,9738		
TNFSF8	111,2233		
TP53BP2	1,7402		
TP73	28,053		
TRAF3	1,7479		