



T.C.

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
PAKLİTAKSEL VE DOKSORUBİSİN İLE MODİFİYE
EDİLMİŞ NANOTAŞIYICI İLAÇ SİSTEMLERİNİN
DUSP GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

ZUHAL TUNÇBİLEK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

SIVAS – 2020

T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK
PAKLİTAKSEL VE DOKSORUBİSİN İLE MODİFİYE
EDİLMİŞ NANOTAŞIYICI İLAÇ SİSTEMLERİNİN
DUSP GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

ZUHAL TUNÇBİLEK


YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YAVUZ SİLİĞ

SİVAS – 2020

“Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Paklitaksel ve Doksorubisin ile Modifiye Edilmiş Nanotaşıyıcı İlaç Sistemlerinin DUSP Genlerin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi” adlı **Yüksek lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

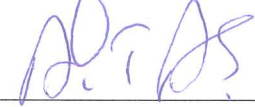
Başkan Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ



Üye Dr. Öğr. Üyesi İsmail SARI



Üye Dr. Öğr. Üyesi Ayça TAŞ



Üye



Üye (Danışman) Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ



ONAY

Bu tez çalışması, 27/12/2019 Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

İTHAF SAYFASI



Bu tezi canım anneme ithaf ediyorum...

ÖZET

Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Paklitaksel ve Doksorubisin ile Modifiye Edilmiş Nanotaşıyıcı İlaç Sistemlerinin DUSP Genlerin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Zuhal TUNÇBİLEK
Yüksek lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ
2020, 139 sayfa

Prostat kanseri, erkeklerde yaygın olarak görülen malign bir tümördür. Prostat kanser tedavisinde Doksorubisin (DOX) ve Paklitaksel (PTX) ilaçları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar tüm vücut sistemi etkilediği için istenmeyen birçok yan etkisi mevcuttur. Ayrıca dolaşımında kalma süresi kısadır. İlaçların bu gibi dezavantajlarının üstesinden gelmek ve tedavi etkinliği artırmak amacıyla, bu çalışmada ilk olarak titanyum dioksit (TiO₂) nanopartiküllerini sentezlendi. Daha sonra TiO₂ toksitesini azaltmak ve biyouyumlu hale getirmek için polietilen glikol (PEG) ile modifiye edildi. Son olarak sentezlenen PEG-TiO₂ nano taşıyıcı sisteme DOX ve PTX ilaçlarını başarılı bir şekilde yüklendi. Sentez sonrası elde ettiğimiz PEG-TiO₂-DOX ve PEG-TiO₂-PTX ilaçlarına ek olarak, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX ilaçlarını prostat kanser hücre hattına (DU-145) uygulayıp sitotoksik doz MTT yöntemiyle belirlendi. DU-145 hücreleri 24, 48 ve 72 saat boyunca PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX ilaçlarının farklı konsantrasyonlarıyla (0,5-50µg/ml) ile muamele edildi ve IC₅₀ değerleri belirlendi. Bu moleküller arasında en aktif 72 saat sonrası PEG-TiO₂-PTX nanotaşıyıcı temelli ilacın olduğu tespit edildi. Daha sonra DU-145 hücrelerine her bir molekülün IC₅₀ dozları uygulandı, 48 saat inkübasyon sonrasında hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı ve bu örneklerde *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR analiz yöntemiyle belirlendi. Sonuç olarak TiO₂ nanopartikülünün *DUSP1* geni hariç diğer tüm genlerin ekspresyonunu artırdığı ancak, PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, DOX ve PTX ilaçlarının *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* genlerinin ekspresyon düzeylerini azalttığı bulundu.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, gen ekspresyonu, paklitaksel, doksorubisin, nanopartikül, nanotaşıyıcılar, *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP10*.

ABSTRACT

The Effect of Paclitaxel and Doxorubicin Modified Nanostructured Drug Systems on the DUSP Genes Expression Levels for Prostate Treatment

Zuhal TUNÇBİLEK

Master Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Prof.Dr. Yavuz SİLİĞ

2020, 139 pages

Prostate cancer is a malignant tumor that is common in men. Doxorubicin (DOX) and Paclitaxel (PTX) are widely used in the treatment of prostate cancer. However, there are many undesirable side effects because these drugs affect the whole body system. In addition, the residence time is short. In order to overcome such disadvantages of drugs and increase treatment efficacy, titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles were first synthesized in this study. It was then modified with polyethylene glycol (PEG) to reduce TiO₂ toxicity and make it biocompatible. Finally, DOX and PTX drugs were successfully loaded into the synthesized PEG-TiO₂ nano-carrier system. In addition to the PEG-TiO₂-DOX and PEG-TiO₂-PTX drugs that we obtained after synthesis, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX and PTX drugs were applied to prostate cancer cell line (DU-145) and cytotoxic dose was determined by MTT method. DU-145 cells were treated with different concentrations (0.5-50 µg/ml) of PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX and PTX drugs for 24, 48 and 72 hours, and IC₅₀ values were determined. Among these molecules, PEG-TiO₂-PTX nano-carrier based drug was found to be the most active after 72 hours. Then, DU-145 cells received IC₅₀ doses of each molecule after 48 hours incubation and RNA was isolated from the cells. cDNA synthesis was performed from RNA samples and expression levels of *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* and *DUSP10* genes were determined by RT-PCR analysis method. As a result, TiO₂ nanoparticle increased the expression of all other genes except *DUSP1* gene, but PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, DOX and PTX drugs were found to decrease the expression levels of *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* and *DUSP10* genes.

Keywords: Prostate cancer, gene expression, paclitaxel, doxorubicin, nanoparticle, nanocomponents, *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP10*.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi hazırlamaya başladığım andan itibaren desteğini esirgemeyen ve bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Yavuz SİLİĞ'e, destek, sabır ve anlayışından dolayı teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimlerinden yararlandığım ve üzerimde çokça emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı' nın tüm öğretim üyelerine ve tüm çalışanlarına, aynı zamanda tez çalışmam için materyal desteği sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Neşe KEKLİKCİOĞLU ÇAKMAK hocamıza teşekkür ederim. Ayrıca, Esmâ ÖZMEN, Tuğba AĞBEKTAŞ, Eylem DOĞAN ve Sibel SAYHAR'a teşekkür ederim. Son olarak eğitim, öğretim ve hayatımın her anında bana destek olan biricik anneme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x

1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Kanser.....	4
2.1.1.Prostat kanseri	8
2.1.1.1.Prostat anatomisi ve fonksiyonu	9
2.1.1.2.Prostat kanseri risk faktörleri	12
2.1.1.3.Prostat kanseri belirtileri	15
2.1.1.4.Prostat kanserinde tanı	15
2.1.1.5.Prostate biyopsisi	19
2.1.1.6.Prostat kanserinde evreleme	20
2.1.1.7.Prostat kanserinin derecelendirilmesi: Gleason derecesi, skoru ve sınıf grupları	22
2.2.Nanoteknoloji	23
2.2.1.Nanopartiküller.....	24
2.2.2.TiO ₂	25
2.2.3. Kemoterapik ajanlar	26
2.3.Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar (MAPK'ler)	27
2.3.1.Çift özgülüklü fosfataz ailesi (DUSP).....	29
2.3.1.1.Çift özgülüklü fosfataz 1 (DUSP1).....	32
2.3.1.2.Çift özgülüklü fosfataz 2 (DUSP2).....	34
2.3.1.3.Çift özgülüklü fosfataz 4 (DUSP4).....	36
2.3.1.4.Çift özgülüklü fosfataz 6 (DUSP6).....	38
2.3.1.5.Çift özgülüklü fosfataz 10 (DUSP10).....	40

3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1.Kullanılan Cihazlar.....	44
3.2.Kullanılan Plastik Malzemeler	44
3.3.Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	45
3.4.Kullanılan Hücre Hattı	46
3.4.1.DU145 (ATTC ® HTB-81™) prostat kanseri hücre hattı	46
3.5.TiO ₂ nanopartiküllerinin ve PEG-TiO ₂ 'nin sentezi.....	47
3.6.PEG-TiO ₂ Nanotaşıyıcı sisteme DOX ve PTX ilaçlarının yüklenmesi.....	48
3.7.Hücre Kültürü.....	48
3.7.1.Hücre canlılığının belirlenmesi	49
3.7.2.Hücre sayımı	49
3.8. Sitotoksikite Deneyleri	51
3.8.1.MTT testi.....	51
3.9.Hücrelerden RNA İzolasyonu	52
3.10.cDNA Sentezi.....	53
3.11.Real Time PCR (RT-PCR)	55
3.12.Primerler.....	55
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	56
5. BULGULAR.....	57
5.1.PEG-TiO ₂ , PEG-TiO ₂ -DOX ve PEG-TiO ₂ -PTX Sentezi ve Karakterizasyon Analizi	57
5.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	59
5.3.PEG-TiO ₂ Nanotaşıyıcı temelli DOX ve PTX ilaçlarının Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	60
5.4.Real Time-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	63
5.4.1.Genlerin ekspresyon düzeyleri	63
5.4.2.Çift özgülüklü fosfataz geninin (<i>DUSP1</i>) ekspresyon düzeyi	64
5.4.3.Çift özgülüklü fosfataz geninin (<i>DUSP2</i>) ekspresyon düzeyi	65
5.4.4.Çift özgülüklü fosfataz geninin (<i>DUSP4</i>) ekspresyon düzeyi	66
5.4.5.Çift özgülüklü fosfataz geninin (<i>DUSP6</i>) ekspresyon düzeyi	66
5.4.6.Çift özgülüklü fosfataz geninin (<i>DUSP10</i>) ekspresyon düzeyi	67

6.TARTIŞMA	69
7.KAYNAKLAR	88
8. İZİNLER.....	121
9.ÖZGEÇMİŞ.....	123



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ulusal kanser sıralamasının 2015 yılında 70 yaş altında ölüm nedeni olarak sunulan küresel harita.	4
Şekil 2. Dünya'daki tüm kanserlerin her iki cinsiyette 2018 ve 2040'taki tahmini vaka sayısı.	5
Şekil 3. Her iki cinsiyette 2018'de en sık görülen 10 kanserin olguları ve ölümlerinin dağılımı	5
Şekil 4. Cinsiyete göre tahmini yeni kanser olguları ve ölümleri için on öncü kanser.	6
Şekil 5. Türkiye'de 2018'de her iki cinsiyette bütün yaş gruplarında tahmin edilen kanser vakalarının insidansı (a) ve mortalitesi (b).....	7
Şekil 6. Türkiye'de 2018'de bütün yaş gruplarındaki erkeklerde tahmin edilen belirli türlerdeki kanser vakalarının görülme sıklığı ve ölüm oranları.....	7
Şekil 7. Prostat bezinin genel ve mikroskopik anatomisi. a. Prostatın genel anatomik yapısı. b. Prostatın mikroskopik yapısı.....	10
Şekil 8. 3 gruba ayrılan DUSP-MKP'lerin yapılarının şematik gösterimi	30
Şekil 9. <i>DUSP1</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	32
Şekil 10. DUSP1 ve MAPK etkileşiminin şematik gösterimi. Bu şekil, MAPK basamaklarını sınırlayan DUSP-1'in otoregülatör geri besleme döngüsünü göstermektedir. DUSP-1, aktif MAPK'ları aktif olmayan forma indirger. Aktif MAPK'lar DUSP-1 stabilitesini düzenler.....	33
Şekil 11. <i>DUSP2</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	34
Şekil 12. DUSP2 tarafından gerçekleştirilen immün hücre aktivasyonunun fosforilasyon yolağı. Oklar uyarılmayı, kırmızı çizgiler ise yolaktaki inhibisyonu gösterir.	35
Şekil 13. <i>DUSP4</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	36
Şekil 14. DUSP4'ün H/R kaynaklı oksidan stresteki rolü	38
Şekil 15. DUSP6 geninin kromozom üzerindeki konumu.....	38
Şekil 16. <i>DUSP6</i> 'nın domain yapısının gösterimi.....	39
Şekil 17. p53-aracılı DUSP6 ekspresyonu arasındaki ilişkinin şematik diyagramı... ..	40
Şekil 18. <i>DUSP10</i> geninin kromozom üzerindeki konumu.....	40
Şekil 19. DUSP10'un domain yapısı	41

Şekil 20. Farklı sinyallerin <i>DUSP10</i> 'un ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	42
Şekil 21. Düşük yoğunluktaki DU-145 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (20x).	46
Şekil 22. Yüksek yoğunluktaki DU-145 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (20x).	46
Şekil 23. Thoma lamının mikroskop görüntüsü.....	51
Şekil 24. PEG-TiO ₂ ve PEG-TiO ₂ -DOX nanopartiküllerinin UV-Görünür bölge absorpsiyon grafiği.....	57
Şekil 25. PEG-TiO ₂ ve PEG-TiO ₂ -PTX nanopartiküllerinin UV-Görünür bölge absorpsiyon grafiği.....	58
Şekil 26. DU-145 Prostat kanseri hücre hattında PEG-TiO ₂ -DOX, PEG- TiO ₂ -PTX, PEG-TiO ₂ , TiO ₂ , DOX ve PTX'in IC ₅₀ dozlarının belirlenmesi (MTT Testi).	59
Şekil 27. DU-145 hücre hattında 24 saat, 48 saat ve 72 saat 0,5-50 µg/ml doz aralıklarında PEG-TiO ₂ -DOX, PEG-TiO ₂ -PTX, PEG-TiO ₂ , TiO ₂ , DOX ve PTX'in uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....	62
Şekil 28. <i>GAPDH</i> geninin amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi.	63
Şekil 29. <i>DUSP1</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	65
Şekil 30. <i>DUSP2</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	65
Şekil 31. <i>DUSP4</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	66
Şekil 32. <i>DUSP6</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	67
Şekil 33. <i>DUSP10</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	67
Şekil 34. <i>DUSP1</i> , <i>DUSP2</i> , <i>DUSP4</i> , <i>DUSP6</i> , <i>DUSP10</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.	68
Şekil 36. <i>DUSP1</i> , <i>DUSP2</i> , <i>DUSP4</i> , <i>DUSP6</i> <i>DUSP10</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.	87

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Prostat kanseri TNM sınıflandırması	21
Tablo 2. Gleason skoru ve derecelendirmesi.....	22
Tablo 3. Prostat kanseri risk tanımlama	23
Tablo 4. DUSP-MKP'lerin sınıflandırılması ve özellikleri.....	31
Tablo 5. cDNA sentez kitinin içeriği.....	53
Tablo 6. Genomik DNA eliminasyon karışımı.	54
Tablo 7. Reverse Transkriptaz karışımı.....	54
Tablo 8. RT-PCR koşulları.....	55
Tablo 9. Döngü koşulları.....	55
Tablo 10. RT-PCR yönteminde kullanılan primerler, firma ve katalog numaraları.	56
Tablo 11. PEG-TiO ₂ - DOX, PEG- TiO ₂ - PTX, PEG-TiO ₂ , TiO ₂ , DOX ve PTX'in 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyondan sonra DU-145 prostat kanseri hücre hattı üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	63
Tablo 12. <i>DUSP1</i> , <i>DUSP2</i> , <i>DUSP4</i> , <i>DUSP6</i> , <i>DUSP10</i> genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde grupların sınıflandırılması.	64
Tablo 13. RT-PCR verilerinin kontrol ve test gruplarında C _t değerleri.	68
Tablo 14. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında her iki cinsiyette görülen yeni kanser vakaları.	70

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AR	Androjen reseptörü
BPH	İyi huylu prostat hiperplazisi
Cis	Cisplatin
DHT	5 α -dihidrotestosteron
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOX	Dokсорubisin
DRE	Dijital rektal muayene
DU-145	Prostat kanser hücre hattı
DUSP	Çift özgülüklü fosfataz
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FBS	Fetal sığır serumu
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KIM	Kinaz etkileşim motifi
KLK2	Kallikrein 2
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MAPKK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz kinazı
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit)
NES	Nükleer ihracat sinyali
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
NP	Nanopartikül
PCA3	Prostat kanseri geni 3
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PEG	Polietilen glikol
PIA	Proliferatif inflamatuvar atrofi
PIN	Prostatik intraepitelial neoplazi
PSA	Prostat spesifik antijeni
PTP	Protein tirozin fosfataz
PTX	Paklitaksel
RES	Retikuloendotelial sistem

ROT	Reaktif oksijen türleri
TiO₂	Titanyum dioksit
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TRUS	Transrektal ultrasonografi
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZIP	Çinko taşıyıcı protein



1.GİRİŞ

Kanser Dünya çapında önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir ve ölümlerin önde gelen nedenidir. Kanser vakalarının görülme sıklığı ve ölüm oranlarındaki artış hızla büyümektedir. Prostat kanseri, prostat bezindeki hücrelerin anormal biçimde bölünmesiyle karakterize olan bir kanser türüdür. Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen ikinci kanserdir ve dünya çapında beşinci önde gelen ölüm nedenidir (1-3).

Kanser tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Kemoterapide, toksik etkisi olan ilaçlar tarafından kanserli hücrelerin bölünmesini yavaşlatmak, durdurmak ya da öldürmek amaçlanır. Klasik kemoterapik ilaçlar vücutta hedefe yönelik hareket etmemektedir. Kullanılan ilaçlar kanser hücrelerini etkilediği gibi sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Ayrıca kanser hücrelerine, tedavi için gereken dozlar da ulaşmamaktadır. Kanser tedavisinde kemoterapi ilaçlarının mümkün olduğunca tümörleri hedef alması ve sağlıklı dokular üzerinde etkisinin sınırlı olması, tedavideki başarı bakımından esastır. Bu husus ayrıca hastanın yaşam süresi ve kalitesinin artması bakımından önemlilik arz eder (4,5).

Prostat kanseri tedavisinde dosetaksel, paklitaksel (PTX) ve doksorubisin (DOX) gibi kemoterapik ajanlar kullanılmaktadır. Paklitaksel, taksan sınıfı bir bileşiktir ve porsuk ağacının kabuğundan elde edilmiştir. Paklitaksel kanser hücrelerinde apoptozu destekleyen bir antimitotik ajandır. Pek çok paklitaksel türevi (yani, dosetaksel ve cabazitaksel) geliştirilmiştir ve çeşitli adjuvanlarla kombinasyon halinde prostat kanseri hastalarına hayatta kalma avantajı sağlamıştır. Ne yazık ki, tümörler genellikle taksanlara karşı direnç geliştirmiştir. Bu direnç mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemektedir (6-8). Doksorubisin, Streptomyces türlerinden izole edilmiştir ve antrasiklin grubu bir bileşiktir. Doksorubisin, DNA sentezinin ve fonksiyonunun inhibisyonu ile sonuçlanan DNA interkalasyonu ile kanser hücrelerine etki eder. DNA'ya bağımlı RNA polimerazın inhibisyonu yoluyla da transkripsiyonu inhibe eder. Doksorubisin çok düşük oral biyoyararlanım, düşük geçirgenlik ve normal dokuya akut toksisite göstermektedir. Ayrıca midede asitle hidrolize uğrar ve sitokrom P450'ye duyarlıdır. İlaçların bu gibi yan etkilerinden ve gelişen ilaç direncinden dolayı bazı kısıtlamalar yaşanmaktadır. Bu anlamda etkili tedavi seçeneklerine aşırı derecede ihtiyaç bulunmaktadır (9-13).

Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler ile nanopartiküller de kanser tedavisinde yerini almaya başlamıştır. Boyut ve yapı nedeniyle nanopartiküller, yeni bir terapötik fikir olarak kabul edilebilir. İlaç bağlı nanotaşıyıcı sistemler ile sağlıklı dokulara kıyasla anti-kanser ajanlarının tümör hücrelerinde birikiminin artırılması, nanopartiküllerin kanser tedavisinde potansiyel olarak kullanıldığını kanıtlamıştır. Nanotaşıyıcı sistemler, boyut ve hedef ligandın partikül yüzeyine bağlanma kabiliyetlerinden dolayı serbest kemoterapötik moleküllerden çok daha fazla tercih edilmektedir. Kanser tedavisi için bu yeni yöntemlerde en çok kullanılan nanopartiküller arasında titanyum dioksit (TiO_2) yer almaktadır (14,15). TiO_2 'in, yeterli biyolojik uyumluluk, düşük toksisite, kimyasal stabilite ve fotokatalitik gibi birçok benzersiz özelliğinden dolayı biyomedikal endüstrisinde kullanımı cazip hale gelmiştir. Ayrıca, TiO_2 nanopartiküllerinin biyoyuumluluğunun artırılması için, polietilen glikol (PEG) kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin yüzeyinin PEG ile modifikasyonu, nanopartiküllerin kandaki dolaşım süresini uzatabilir ve mononükleer fagositik sistemden kaçma olasılığını artırabilir (16-20).

Çift özgülüklü fosfatazlar (DUSP'ler) olarak da bilinen mitojenle aktive olan protein kinaz fosfatazları (MKP'ler), memeli hücrelerinde mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivitelerinin ana negatif düzenleyicileri olarak işlev gören bir protein ailesidir. MAPK yolları, büyüme, farklılaşma ve hücre ölümünde kritik rollere sahiptir. Bazı çalışmalar MAPK'lerin farklı kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir; ancak, kanserojenlerdeki kesin işlevlerini bugüne kadar belirlemek zor olmuştur. MAPK ekspresyon düzeyleri prostat kanserinde değişmiştir. Bu nedenle DUSP'lerin prostat kanserinde MAPK yollarını düzenlemede önemli rolleri olduğu ve dolayısıyla hastalığın sonucunu doğrudan etkileyebileceği konusunda artan kanıtlar bulunmaktadır. DUSP'lerin ekspresyonundaki değişiklikler, prostat kanseri hücrelerinde hayatta kalma, hücre ölümü, kemoterapik ilaçlara direnç ve prognoz ile ilgilidir. Ancak genel ve tutarlı bir mekanizma mevcut değildir. DUSP'lerin ekspresyonundaki anormalliklerin ve MAPK yollarının bu fosfatazlar tarafından nasıl düzenlendiğinin anlaşılması, kansere karşı daha etkili tedaviler geliştirmek için kritik öneme sahip olabilir (21-23).

Bu çalışmada ilk olarak kanser tedavisinde geleneksel olarak kullanılan DOX ve PTX ilaçlarının PEG- TiO_2 nanotaşıyıcı sisteme yüklenmesi amaçlanmıştır. İkinci olarak

ise, elde edilen PEG-TiO₂-DOX ve PEG-TiO₂-PTX ilaçlarının prostat kanseri hücre hattına (DU-145) uygulanması ve ardından sitotoksiteninin belirlenmesi ve son olarak bu sitotoksik dozun DUSP gen ailesinin ekspresyon düzeylerine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

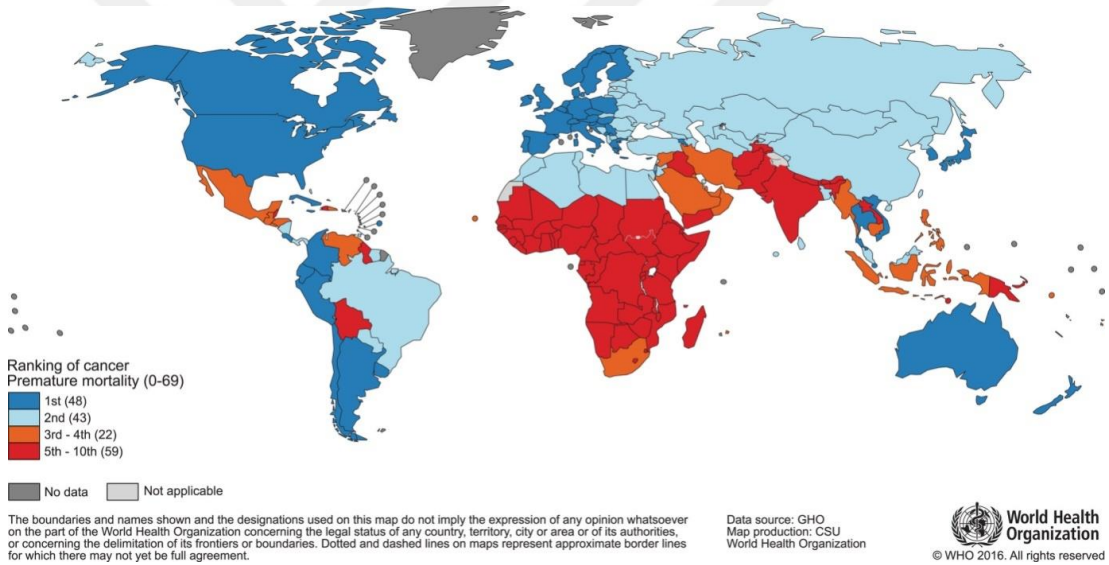


2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir. Kanser, olağan sınırlarının ötesinde büyüyen ve daha sonra vücudun bitişik veya diğer organlara yayılabilen bir hastalıktır.

Kanser, 2018'de tahmini 9.6 milyon ölüme neden olan Dünya çapında ölümün önde gelen bir nedenidir. Küresel olarak, 6 ölümden yaklaşık 1 tanesi kanserden kaynaklanmaktadır. 2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre, kanser, 172 ülkenin 91'inde 70 yaşından önce ilk veya ikinci ölüm nedenidir ve buna ek olarak 22 ülkede üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil 1) (24).

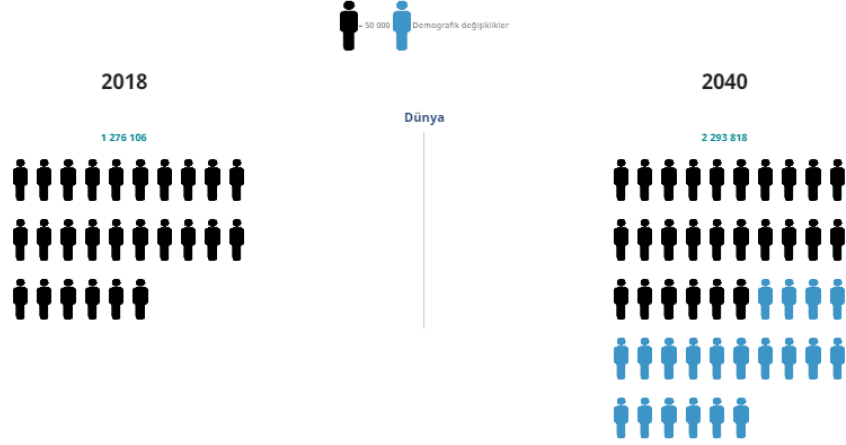


Şekil 1. Ulusal kanser sıralamasının 2015 yılında 70 yaş altında ölüm nedeni olarak sunulan küresel harita. (WHO)

Kanser insidansı ve mortalitesi dünya çapında hızla artmaktadır. Bunun birçok sebebi vardır ancak popülasyonun hem yaşlanması hem de nüfus artış oranlarındaki hızlanmalar başlıca sebepler arasında yer alır. Sosyoekonomik düzey kanserin yaygınlığı ve dağılımındaki değişimin ana risk faktörleri arasındadır (25,26).

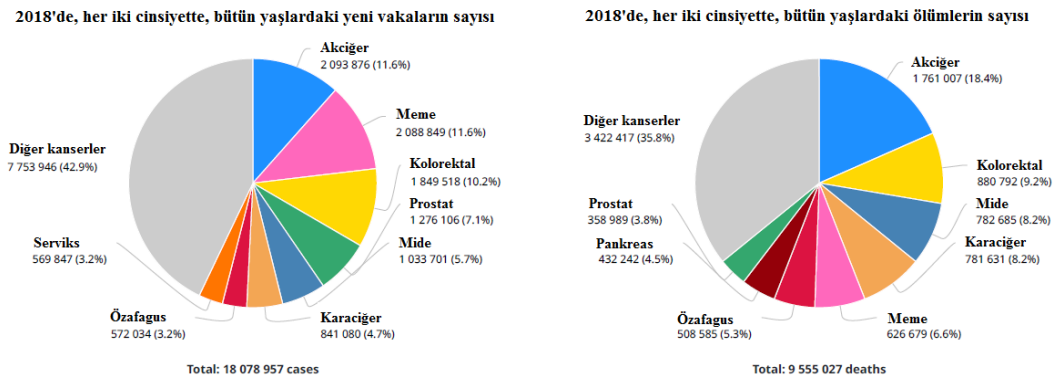
GLOBOCAN verilerine göre 2018’de tüm kanserlerin her iki cinsiyette, Dünya çapında görülen tahmini vaka sayısı 1,276,106’tır. 2040’da ise bu tahmini vaka sayısının 2.293.818’a yükseleceği öngörülmektedir (Şekil 2).

Tahmini vaka sayısı 2018’den 2040’a kadar, tüm kanserlerde, her iki cinsiyette, her yaşta



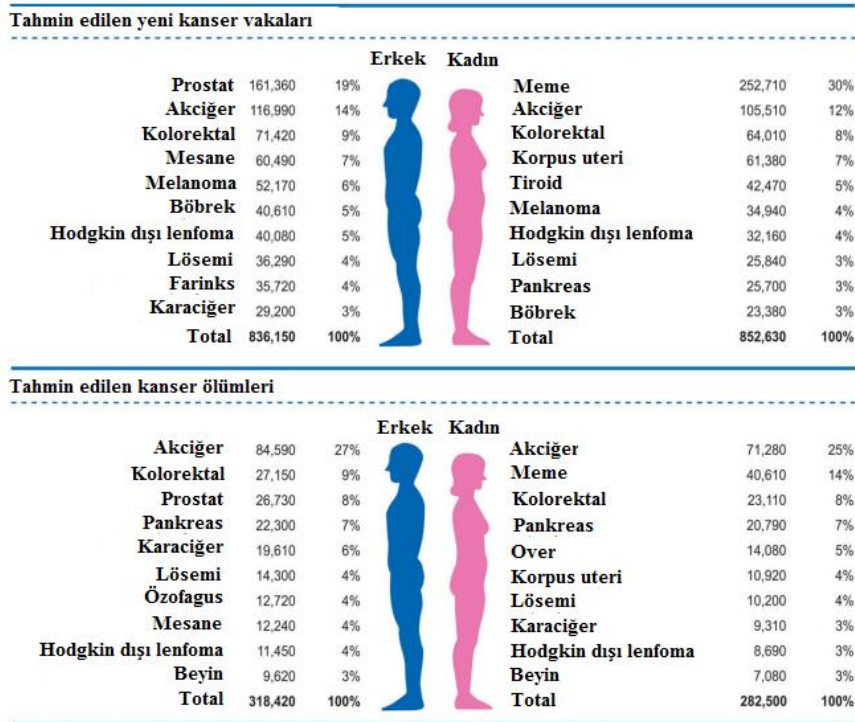
Şekil 2. Dünya’deki tüm kanserlerin her iki cinsiyette 2018 ve 2040’taki tahmini vaka sayısı. (GLOBOCAN 2018)

Dünya genelinde tahmin edilen vakalar ve ölümler için 10 kanser türü ele alındığında her iki cinsiyette de, akciğer kanseri en sık tanı alan (toplam vakaların % 11.6’ sı) kanserdir. Akciğer kanseri, kanserden ölümlerin ilk (toplam kanser ölümlerinin % 18.4’ü) sırasındadır. Bunu takiben insidans olarak meme kanseri (% 11.6), prostat kanseri (7.1%) ve kolorektal kanser (9.2%); mortalite olarak kolorektal kanser (% 9,2), mide kanseri (% 8,2) ve karaciğer kanseri (% 8,2) görülmektedir (Şekil 3) (2).



Şekil 3. Dünya genelinde her iki cinsiyette 2018’de en sık görülen 10 kanserin olguları ve ölümlerinin dağılımı (GLOBOCAN 2018)

Cinsiyete göre kanser insidansı karşılaştırıldığında erkeklerde oran daha yüksek oldu görülmektedir. Sırasıyla prostat, akciğer ve kolorektal kanserler, erkeklerde tüm vakaların % 42' sini oluştururken, sadece prostat kanseri, 5 yeni tanı için neredeyse 1'i oluşturmaktadır. Kadınlar için, en sık tanı alan 3 kanser sırasıyla meme, akciğer ve kolorektal kanserdir; bunlar kolektif olarak tüm vakaların yarısını temsil eder; sadece meme kanserinin, kadınlarda tüm yeni kanser teşhislerinin % 30' unu oluşturması beklenmektedir. Erkeklerde en sık görülen kanser ölüm nedenleri, akciğer kanseri, kolorektal ve prostat, kadınlarda ise akciğer, meme ve kolorektal kanserdir. Bu 4 kanser, tüm kanser ölümlerinin % 46'sını oluştururken, akciğer kanseri dörtte birinden fazlasını (% 26) oluşturmaktadır (Şekil 4) (27).

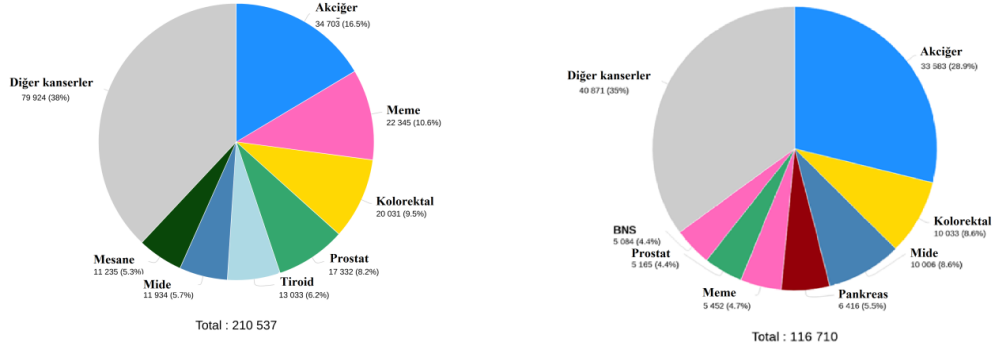


Şekil 4. Cinsiyete göre tahmini yeni kanser olguları ve ölümleri için on öncü kanser (27)

Türkiye genelinde tahmin edilen vakalar için kanser türleri ele alındığında her iki cinsiyette de, akciğer kanseri toplam 210537 vakanın % 16.5'i olarak en sık tanı alan kanserdir. Akciğer kanserini takiben kanser türlerinin görülme sıklığı sırasıyla meme kanseri (% 10.6), kolorektal kanser (% 9.5), prostat kanseri (% 8.2), tiroid kanseri (% 6.2), mide kanseri (% 5.7) ve mesane kanseridir (% 5.3). Ülkemizde kanserden ileri

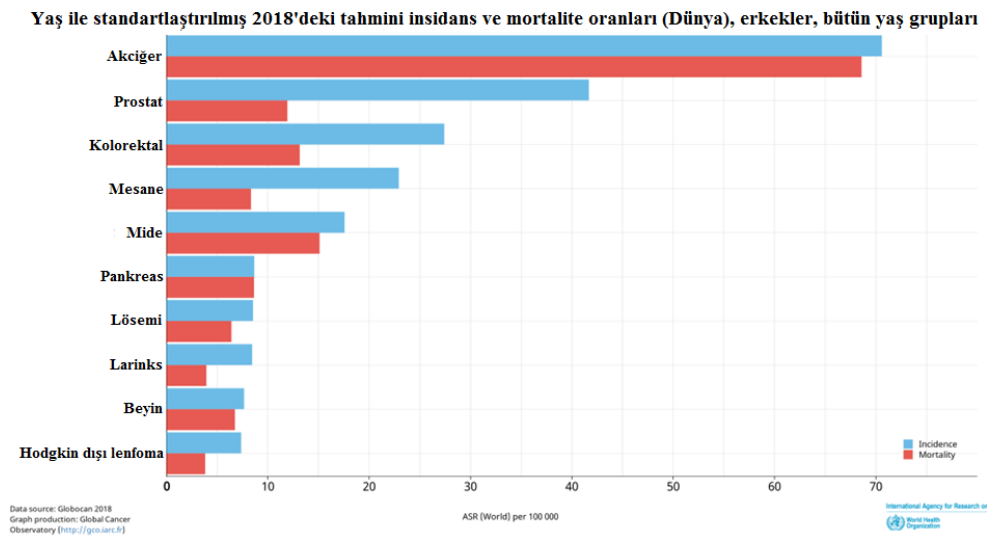
gelen ölümlerin toplam sayısı 116710 olarak tahmin edilmektedir. Bu kanser ölümlerinin % 28.9'u ile her iki cinsiyette de kanserin önde gelen ölüm nedeni akciğer kanseridir ve ardından sırasıyla kolorektal kanser (% 8.6), mide kanseri (% 8.6), pankreas kanseri (% 5.5), meme kanseri (% 4.7) ve prostat kanseri (% 4.4) yer alır (Şekil 5).

2018'de, Türkiye'de, bütün kanserlerde, her iki cinsiyette, bütün yaşlarda tahmini yeni vaka sayısı 2018'de, Türkiye'de, bütün kanserlerde, her iki cinsiyette, bütün yaşlarda tahmini ölüm sayısı



Şekil 5. Türkiye'de 2018'de her iki cinsiyette bütün yaş gruplarında tahmin edilen kanser vakalarının insidansı (a) ve mortalitesi (b) (GLOBOCAN 2018)

Yurt genelinde cinsiyete göre belirli kanser türlerinin erkeklerde görülme sıklığı sırasıyla akciğer kanseri (% 24.7), prostat kanseri (% 14.6), kolorektal kanser (% 9.7), mesane kanseri (% 8.1) ve mide kanseri (% 6.2), ölüm oranları ise sırasıyla akciğer kanseri (% 38.3), mide kanseri (% 8.6), kolorektal kanser (%7.5), prostat kanseri (% 6.9), mesane kanseri (% 4.7) olarak tahmin edilmektedir (Şekil 6).



Şekil 6. Türkiye'de 2018'de bütün yaş gruplarındaki erkeklerde tahmin edilen belirli türlerdeki kanser vakalarının görülme sıklığı ve ölüm oranları (WHO)

Türkiye’de görülmekte olan kanser sıklığı Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre daha düşüktür. Kanser çeşitlerinde farklılıklar olsa da ülke genelinde kanserin dağılımında ya da teşhis edilen kanser olgularının sayılarında bölgesel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Türkiye’de 2030’da 22 milyon yeni vakanın olacağı tahmin edilmektedir (2,28,29).

2.1.1.Prostat kanseri

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücrelerin anormal biçimde bölünmesiyle karakterize olan bir kanser türüdür (3). Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde en sık görülen ikinci kanserdir. 2018 yılında 1.276.106 yeni prostat kanseri vakası kaydedilmiştir ve bu vakaların 358.989’u ölümlerle (erkeklerde kansere bağlı tüm ölümlerin % 3.8’ ü) sonuçlanmıştır (2, 30).

Prostat kanseri insidans ve mortalite oranları dünya çapında oldukça değişkendir. Prostat kanserinin yaş ile standardize edilmiş oranı en yüksek Okyanusya ve Kuzey Amerika’da, ardından Avrupa’da gözlenmiştir. Buna karşılık, Afrika ve Asya, gelişmiş ülkelerekinden daha düşük insidans oranlarına sahiptir. 2018’de en yüksek ölüm oranları ise sırasıyla Orta Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda ve Batı Avrupa’da kaydedilmiştir. En düşük ölüm oranı ise Asya ve Kuzey Afrika’da bildirilmiştir.

Dünyada prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi, artan yaşla ilişkilidir. İnsidans oranı, 65 yaş üstü erkeklerde yaklaşık % 60’tır ve ölümlerin neredeyse % 55’i 65 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Afrika kökenli Amerikalılar için insidans oranları beyaz erkeklere oranla daha yüksektir, her 100.000 erkekte 158.3’üne yeni vaka teşhisi konmuştur ve ölüm oranları beyaz erkeklerden iki kat daha fazladır (31,32).

Bu farklılıklar çevresel faktörlerin prostat kanseri etiyolojisinde de önemli bir rol oynadığını ve görülme sıklığındaki değişikliklerin yetersiz tanı, tarama yöntemlerindeki farklılıklar ve sağlık hizmetlerine erişimdeki eşitsizliklerden kaynaklanabileceğini göstermektedir (33).

2018’den 2040’a kadar prostat kanserinden ileri gelen ölümlerin Dünya çapında ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir. En yüksek ölüm oranının Afrika’da, ardından Asya’da olduğu tahmin edilirken, en düşük oran Avrupa’da kaydedilecektir.

Türkiye genelinde 2018 yılında, 210.537 yeni prostat kanseri vakası kaydedilmiştir. 2040 yılında ise bu sayının tahmini 368.674 kişi olarak artması beklenmektedir.

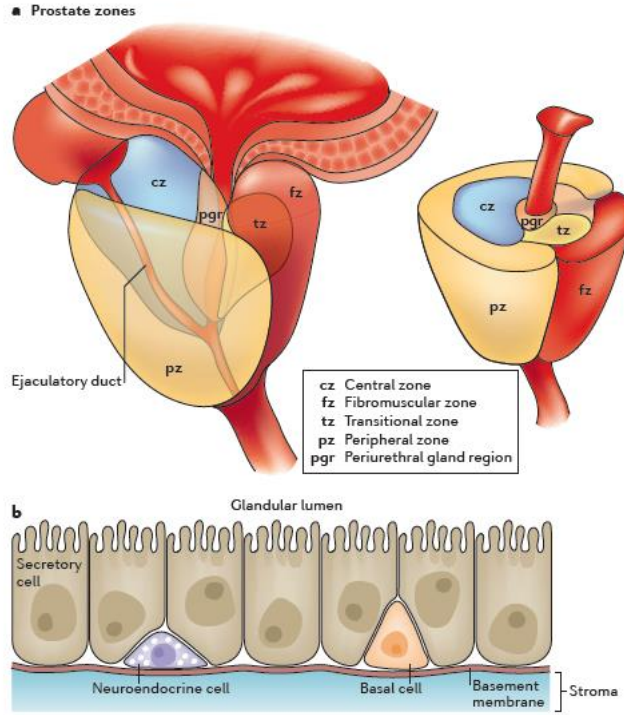
Türkiye'deki prostat kanseri kaynaklı tahmini ölüm sayısı ise 5.165 olarak belirlenmiştir. Bu ölüm sayının 2040'da 11.796 kişi olacağı öngörülmektedir (30).

Prostat kanseri insidansı yüksek olmasına rağmen, çoğu prostat kanseri vakası, kanser prostat içinde ilerlediği zaman tespit edilir. ABD'de prostat kanseri teşhisi konan erkekler için 5 yıllık sağkalım oranı % 98 civarındadır. Hayatta kalma oranları Doğu ülkelerinde % 76, Güney ve Orta Avrupa ülkelerinde ise %88 olarak değişiklik gösterir. Ayrıca, Doğu Avrupa ülkelerinde en büyük iyileşme gözlenerek, tüm Avrupa'da hayatta kalma oranları artmıştır (30,31,34).

2.1.1.1.Prostat anatomisi ve fonksiyonu

Prostat (Eski Yunanlılara göre: “koruyucu”) yalnızca erkeklerde bulunan bir dışsal salgı bezidir. Erkek üreme sisteminin bir parçasıdır ve vücudun içinde bulunur (35,36). Prostat, pelvisin derininde yer alan, şekli ters çevrilmiş bir koni ya da ceviz benzeyen kapsülle çevrili fibromusküler ve glandüler bir organdır. Genç erişkinlerde hacmi yaklaşık 20 ml olan prostatın yüksekliği 3 cm, genişliği 4 cm, kalınlığı ise yaklaşık 2.5 cm'dir. Prostat, mesaneye superior, eksternal üriner sfinkter ve membranöz üretraya ise inferior, inferior bağlıdır. Mesaneyle komşu olan bezin superior kısmı, prostatın bazal kısmıdır. Prostatın posterior, anterior ve iki adet inferolateral olmak üzere 4 yüzü vardır. Inferolateral yüzler konveks biçimlidir ve levator ani kaslarının medial kenarları ve endopelvik fasya ile ilişkilidir. Posterior yüz rektumla komşudur ve rektumdan Denonvilliers' fasyasıyla ayrılır. Denonvillier's fasyası anterior rektal duvarla prostatın ve seminal veziküllerin posterior yüzü arasında yer alır (37). Bu fasya prostat kanserinin posterior yayılımını engelleyen bir bariyer gibidir (38).

Prostatın glandüler elemanları üçe ayrılır. Bunlar; santral bölge, periferik bölge ve transizyonel bölgedir. Glandüler olmayan yapılar ise anterior fibromusküler stroma ve preprostatik sfinkter olarak ikiye ayrılır. Prostat dokusunun %30'unu oluşturan, anterior fibromusküler stroma prostatın ön yüzünü tamamen kaplar. Retrograd ejakülasyonu sağlayan preprostatik sfinkter ise üretrayı saran düz kas yapısında sfinkterdir (Şekil 7).



Şekil 7. Prostat bezinin genel ve mikroskobik anatomisi. a. Prostatın genel anatomik yapısı. b. Prostatın mikroskobik yapısı (39)

Prostatın elle muayene edilebilen tek bölümü periferik bölgedir ve apekten tabana doğru posterolateral olarak uzanır. Santral bölge koni şeklindedir ve taban kısmı mesane boynunda, apeksi ise prostatik utrikul seviyesindedir. Prostatın yaklaşık %70'ini periferik bölge, %25'ini santral bölge, %5-10'unu ise tranzisyonel bölge oluşturur. Yaşla birlikte artan bez hacmi, benign prostat hiperplazisinden kaynaklanan tranzisyonel ve periüretral bezin hacminin artmasından kaynaklanır. Prostat adenokarsinomu % 70 oranla en sık periferik bölgede oluşmakla birlikte, % 20 oranında tranzisyonel bölgede ve % 1-5 oranında ise santral bölgede oluşabilmektedir. Prostatın zonal anatomisinin bilinmesi prostatta gelişen hastalıkların patogenezi hakkında bilgi sahibi olmayı sağlar (37, 40, 41).

Prostat, erkek fertilitesinde rol alan üreme bezidir. Erkeklerde üreme, prostat epiteli tarafından salgılanan prostatik sıvının içeriğine dayanır. Prostatik sıvının %30'u semenden oluşan süt beyazı sıvıyı içerir. Prostatik sıvı, ejakülasyon işlemini kontrol eden ve sperm olgunlaşmasını aktive eden proteinleri düzenleyen bir dizi faktör içerir; bu faktörler semen sıvılaştırması, pıhtılaşma döngüsü ve sperm hareketliliği için gereklidir (41, 42).

Prostatik sıvıdaki bu fonksiyonları sağlayan faktörler şunlardır: Serin proteazın spesifik bir alt ailesi olan, Kallikrein ilişkili peptidaz 3 (KLK3) tarafından kodlanan prostat spesifik antijeni (PSA) dahil olmak üzere kallikrein ilişkili peptidazlar (KLK'ler); krebs döngüsünün ara metabolitinden biri olan sitrat; ve prostatik epitel hücrelerinin sitoplazmasında aktif olarak depolanan bir eser element olan çinko (Zn^{2+}). Bu ana faktörler, mekanik ve işlevsel olarak, prostat epitel hücrelerinin metabolik özellikleri ile bağlantılıdır. Prostatik epitel hücreleri Krebs döngüsünden ziyade glikolizle (çoğalan kanser hücrelerinin bir işareti) enerji üreten tek sağlıklı insan hücreleridir. Normal insan prostatı, insan vücudundaki herhangi bir yumuşak dokuya göre yüksek seviyede Zn^{2+} biriktirir. Bu benzersiz özellik, prostatik epitel hücrelerinin Zn^{2+} 'yi androjene bağımlı olarak hücre alımı ve spesifik çinko taşıyıcıların aracılık ettiği serbest bırakma döngüsü temeline dayanmaktadır. Çinkonun prostat hücrelerine aktif transport ile alımından sorumlu protein çinko taşıyıcı protein1-4 (ZIP1-4), sitoplazmadan hücre dışına salınımında ise çinko taşıyıcı1-10 (ZnT1-10) proteinleri görev alır (43-46).

Sağlıklı prostat epiteli bazolateral zarında eksprese edilen ZIP1 proteini kandan Zn^{2+} alımında ana taşıyıcıdır. *ZIP1* gen ekspresyonu, normal prostat veya iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) dokusu ile karşılaştırıldığında prostat kanseri dokusunda belirgin şekilde azalır veya yok olur (47,48).

Zn^{2+} iyonunun ve sitratın intraprostatik birikimi, krebs döngüsünün inhibisyonu ve prostatik sıvı salınımı, androjen reseptörü (AR) yoluyla erkek seks steroidleri tarafından düzenlenir. AR, hem hücre içinde lokalize reseptörler hem de ligandla aktive edilmiş transkripsiyon faktörleri olarak görev yapan, çift fonksiyonlu bir reseptör alt ailesi olan 48 insan çekirdek reseptöründen biridir (49).

Prostat içinde testosteron, 5α - redüktaz enzimi tarafından daha güçlü (AR'ye bağlanma afinitesi) bir androjen olan, 5α - dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Prostat homeostazında yer alan kilit genler prostat epiteli içinde DHT tarafından düzenlenir. AR, sağlıklı epitelyal homeostazı sürdürmek ve prostat kanseri vakalarında malign progresyonu en aza indirmek için gereklidir (50-52).

Yaşlanma ile birlikte, dolaşımdaki testosteron seviyeleri ve intraprostatik DHT seviyeleri aşamalı olarak azalarak bezin düzgün çalışmasını engeller ve Zn^{2+} , sitrat ve KLK salgılayan proteinlerin prostatik sıvı içindeki sağlıklı doku seviyelerini koruma

kabiliyetini azaltır. Sonuç olarak, DHT'nin prostatik dokuda yaşa bağlı azalması aşamalı olarak erkek fertilitasını bozar. Aynı zamanda, Zn^{2+} ve sitrat birikiminin yaşa bağlı olarak bozulması, Krebs döngüsünü inhibe etme kabiliyetini zayıflatarak, mitokondrideki terminal oksidasyonla ATP üretimine yol açıp prostatik epitel hücrelerinin kansere eğilimli durumunu destekleyen, prostat kanserini kolaylaştıran bir metabolik değişime neden olur (50).

İnsan üremesi ve erkek fertilitesi için gerekli olan KLK'ler androjenler tarafından düzenlenir. KLK2 ve PSA en çok çalışılanlar arasında yer alan proteindir ve sırasıyla *KLK2* ve *KLK3* genleri tarafından kodlanmıştır. KLK2 ve PSA, tüm KLK'lerin arasında organa spesifik olarak yüksek ekspresyon profiline sahiptir, yani bol miktarda prostat epitelinde eksprese edilir. Gen ekspresyonu seviyeleri ise, çekirdeksel AR'nin işlevsel durumunu, aktivitesini ve androjenlere verdiği cevabı yansıtır. Doku özgüllüğü ve androjene bağlı eşsiz kombinasyonu sayesinde KLK2 ve PSA'nın ekspresyon profili, prostat epitelinin sağlıklı ve patolojik koşullarda aktivitesini izlemek için basit ve biyolojik bir son nokta sağlar (53).

Prostat bezi, erkek fertilitesi için gerekli koşulları sağlar. Ancak potansiyel olarak fertilitate bozukluğuna sebep olan bir dizi yaygın iyi huylu veya kötü huylu hastalığın (örneğin, prostatit, BPH ve prostat kanseri) doğrudan bir hedefidir (54).

2.1.1.2.Prostat kanseri risk faktörleri

Prostat kanserinin en yaygın risk faktörleri ileri yaş, etnik köken, genetik faktörler ve aile öyküsüdür (55-57). Prostat kanseri ile pozitif olarak ilişkili diğer faktörler arasında diyet (doymuş hayvansal yağ ve kırmızı et tüketimi, beslenmede meyve ve sebze azlığı, vitamin yetersizliği, kahve alımı), obezite ve fiziksel hareketsizlik, iltihaplanma, hiperglisemi, enfeksiyonlar, iyonlaştırıcı radyasyon ve çevresel kimyasallara maruz kalma sayılabilir (55-62).

Prostat kanserine yakalanma riski 50 yaşından sonra hızla yükselir ve 65 yaşından büyük erkeklerde 10 vakadan 6'sında görülebilir (63).

Etnik köken prostat kanserinde bir risk faktörüdür. Afrikalı ve Amerikalı erkeklerin beyaz erkeklere göre prostat kanserinden ölme olasılığının iki kat daha fazla olduğu ve genellikle daha ölümcül olduğu bir risk faktörüdür (64).

Ailede prostat kanseri öyküsü, prostat kanseri insidansı için iyi belirlenmiş bir risk faktörüdür (65). Babası prostat kanserine yakalanmış erkekler, iki kat daha fazla

prostat kanseri riskine sahiptir ve prostat kanseri olan erkek kardeşe sahip olanlarda üç kattan daha büyük bir risk vardır (66). Ayrıca, ikiz kardeşlerde prostat kanseri yükümlülüğündeki değişkenliğin neredeyse %60'ının, genetik faktörlere bağlı olabileceğini ve prostat kanserini en fazla kalıtsal malignitelerden biri haline getirdiğini göstermektedir (67,68).

Yüksek kalorili doymuş hayvansal yağ alımı, dolaşımdaki androjen seviyelerini artırarak prostat kanseri hücrelerinin büyümesini artırır, aynı zamanda oksidatif stres ve peroksidasyon ile DNA hasarına neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesinde artışa sebep olur (69,70,71). Obezite, ilerlemiş ve agresif prostat kanseri ile ilişkilidir (72,73). Obezite, çoğu zaman erkeklerde prostat gelişimi ile ilgili olduğu bilinen dolaşımdaki steroid hormon düzeylerini değiştirerek prostat kanseri gelişimine yol açar (74).

Sigara dumanına aktif ve pasif maruz kalmanın birçok insan için kanserojen olduğu bilinmektedir (75). Sigara içen erkekler genellikle prostat kanseri riskini artırabilen veya kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilecek dolaşımdaki yüksek seks hormonu seviyelerine sahiptir (76,77). Sigara dumanının kanserojen kimyasallarından biri olan polisiklik aromatik hidrokarbonların metabolizmasında yer alan genlerdeki fonksiyonel polimorfizmler kanserin başlamasını ve ilerlemesini etkileyebilir (75,78). Prostat kanseri patogenezi ve ilerlemesinde androjenler için “androjen hipotezi” olarak da bilinen bir rolü destekleyen hem tarihsel hem de modern veriler vardır (79). Prostat kanseri hücre hatlarından elde edilen birkaç in vitro veri, hücrelerin androjen uyarımına yanıt verdiklerini ve androjenlerin yoksunluğunda ise apoptoza maruz kaldıklarını göstermektedir (80,81). Benzer şekilde, in vivo çalışmalar, androjenlerin hayvan modellerinde tümörigenezi desteklediğini ve androjen yoksunluğu üzerine tümör regresyonunun görüldüğünü göstermiştir (82,83). Preklinik çalışmalar prostat kanseri patogenezi ve ilerlemesinde androjenlerin rolünü desteklese de, klinik veriler hala tartışmalıdır (84).

Hiperglisemi, meme, pankreas ve kolorektal gibi kanserler ile pozitif olarak ilişkilidir, fakat prostat karsinogeneziyle bağlantısı çelişkilidir.

Epidemiyolojik ve biyolojik çalışmalar, inflamasyonun yüksek dereceli veya agresif prostat tümörlerine ve nihayetinde metastatik yayılıma neden olduğunu belirtmektedir (39,85). Son zamanlarda, prostat kanseri hastalarında prostatik inflamasyona bağlı

tümör ilerlemesini öngörmek için bir biyobelirteç olarak bir inflamatuvar efektör olan pentraxin 3 tanımlanmıştır (86). Prostat kanserinin iyi bilinen bir öncülü olan kronik inflamasyon, prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) geliştirebilen proliferatif inflamatuvar atrofiye (PIA) neden olur (39,87).

Prostatit, genellikle asemptomatik olduğu için teşhisi zor olan prostat bezinin iltihabıdır (88). Prostatit gelişimi, enfeksiyonlar, kimyasal ve fiziksel travma ve diyet dahil olmak üzere birçok faktörün birleşimiyle indüklenir (89). *E. coli* ve *Propionibacterium acnes* gibi cinsel yolla bulaşmayan patojenler akut ve kronik prostatite neden olabilir (90,91). Ayrıca, *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria bel soğukluğu* gibi cinsel yolla bulaşan birçok organizmalar, potansiyel olarak prostat kanseri gelişme riskini artıran kronik enfeksiyona neden olabilir (92,93).

Bazı epidemiyolojik çalışmalar cinsel davranış ve cinsel yolla bulaşan hastalıklarla ilişkili diğer faktörlerin prostat kanseri ile bağlantılı olabileceğini göstermiştir (94). Bel soğukluğu ve diğer bakteriyel enfeksiyonlar için, prostat iltihabı ve prostat atrofisi, prostat kanserine yol açan süreçlerdir (95). Afrikalı-Amerikalı ve beyaz erkekler arasında yapılan geniş popülasyon temelli bir vaka kontrol çalışmasında bel soğukluğu veya sifiliz öyküsü olan erkekler arasında prostat kanseri riskinin yüksek olduğunu bildirilmiştir (93). İnsan prostat kanserinde ve iyi huylu prostat dokusunda ortaya çıkan insan papiloma virüsünün (HPV), insan prostat hücrelerini *in vitro* olarak etkilediği gösterilmiştir (96).

Kadınlarda yaygın bir vajinit nedeni olan *Trichomonas vaginalis* enfeksiyonu ile prostat kanseri arasındaki ilişkinin varlığı yapılan çalışmalarla gözlenmiştir. *Trichomonas vaginalis* asemptomatik üretrit ve prostatite yol açarak erkekleri de enfekte edebilir (95).

X ışını, bilgisayarlı tomografi (BT) ve nükleer görüntüleme ile üretilen, vücudun iç organlarını ortaya çıkarmak için dokuya nüfuz eden iyonlaştırıcı radyasyondur. Bununla birlikte, iyonlaştırıcı radyasyon DNA'ya zarar verebilir ve hücreler hasarın çoğunu tamir etse de, hasar kalıcı olabilir ve sonuçta kanser gelişimine katkıda bulunabilecek DNA mutasyonlarına yol açabilir. Tanısal X-ışını prosedürlerinden düşük dozlu iyonlaşma radyasyonu ile prostat kanseri riski arasındaki bağlantıyı araştıran ilk çalışmaya göre, kalça / pelvikte X-ışına maruz

kalmanın, aile öyküsü gibi bilinen diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak prostat kanseri riskini önemli ölçüde arttırmıştır (97).

2.1.1.3.Prostat kanseri belirtileri

Prostat kanseri genellikle yavaş ilerler ve semptomlar yıllarca ortaya çıkmayabilir. Prostat kanserinin erken evrelerinde, genellikle belirti yoktur. Bununla birlikte, prostatın üretrayı çevreleyen konumu nedeniyle, en sık idrara çıkma sorunu yaşanır. Prostat kanserinin, yavaş veya zayıf idrar akımından dolayı idrar yapma problemleri veya özellikle geceleri daha sık idrara çıkma ihtiyacı; idrarda veya menide kan; ereksiyon problemi (erektile disfonksiyon); kalça, sırt (omurga), göğüs (kaburga) veya diğer alanlarda ağrı; bacaklarda veya ayaklarda zayıflık veya uyuşukluk veya hatta omuriliğe bası yapan ilerlemiş kanser nedeniyle mesane veya bağırsak kontrolü kaybı gibi belirtileri vardır. Üriner semptomların çoğu, prostatın genişlemesi ile birlikte, iyi huylu prostat hiperplazisi gibi diğer prostat hastalıklarında da görülür. Bu yüzden erkeklerde prostat kanserini kontrol etmek için daha fazla teste ihtiyaç vardır (98,99).

2.1.1.4.Prostat kanserinde tanı

Prostat kanseri tanınması geleneksel olarak dijital rektal muayene (DRE), PSA testi ve ardından transrektal ultrason (TRUS) rehberliğinde biyopsi yapılır. Bununla birlikte, prostat kanseri için geniş PSA testlerinin reçete edilmesi ve tarama programlarının geliştirilmesi göz önüne alındığında, normal DRE ve yüksek PSA'lı semptomsuz hastalarda prostat kanserinin % 60'ından fazlası teşhis edilir.

Prostat kanseri küçük, yavaş ilerleyen, düşük dereceli tümörlerden; büyük, agresif, hayatı tehdit edici tümörlere kadar değişen, heterojen bir hastalık olduğundan, prostat kanserinin başlangıç değerlendirmesinde ürologların birincil hedefi, hastalığın varlığını belirledikten sonra lokal veya uzak kanser yayılımını ve evreleme ile saldırganlığı değerlendirmektir. Bu evreleme prognozu tahmin etmek, tedaviyi yönlendirmek ve hastaların takibini organize etmek için önemlidir (100).

TRUS-güdümlü sistematik biyopsi, prostat kanserinde prostatın dijital olarak yönlendirilmiş biyopsi örneklemeinden daha üstün olduğunu gösteren standart bir tanı testi olmuştur (101).

Bununla birlikte, tümörün konumuna göre iğnenin yerleştirilmesi rastgele olduğu için, TRUS biyopsisinde 15%–46% oranında, radikal prostatektomideki nihai Gleason

skoruyla karşılaştırıldığında ise 15%–46% oranında tümörü tespit etme başarısızlığı vardır. Rastgele TRUS biyopsisi düşük dereceli ve yavaş ilerleyen kanseri tanımlayabilir, aynı zamanda erken tedaviye büyük ölçüde katkı sağlayabilir. Bu nedenle biyopsi gerektiren hastaların seçimi ve “potansiyel agresif” lezyonların tespiti ve ortadan kaldırılması için tekniklerin değerlendirilmesi gerekir (102).

- **DRE**

DRE, prostat büyüklüğünü, hareketliliğini ve şeklindeki düzensizliğini değerlendirmeye yarayan ucuz bir testtir (103).

DRE uygulaması, parmak ucunun birkaç saniye için anüs girişine yerleştirilerek anal sfinkter refleks kasılmasına karşı bası uygulanmasını, sfinkterin gevşemesini takiben, parmağın hafifçe dönme hareketi ile rektuma yavaşça itilmesi ve rektumdan prostatın incelenmesini içerir (104,105).

Parmak ucu, prostatın iki lobunun arasına boylamasıyla oluk (ortanca sulkus) içine yerleştirilerek mediolateral ve anteroposterior olarak hafifçe hareket ettirilir ve prostatın tutarlılığı, simetrisi, nodülerliği, ve hareketliliği incelenir (106).

Ancak, prostatın boyut ve şeklinin sadece rektal muayene ile değerlendirilmesi, prostat kanseri teşhisi için tek başına yeterli değildir. Buna bağlı olarak transrektal ultrasonografi (TRUS) ile ölçülen prostat hacmi ve DRE ile tahmin edilen hacim arasında düşük korelasyon vardır (107).

Ek olarak, karsinomlar sert düzensiz nodüller olsa da, DRE ile elde edilen sonuçlar benign prostat hipertrofisi (BPH) veya taş oluşumunda da benzer olabilir. Bu, muayene eden kişinin herhangi bir sertlik ve değişiklik hissettiğinde daha fazla test yapması gerektiği ve meydana gelecek olan herhangi bir değişiklik veya ilerlemeyi tespit etmek için testi düzenli olarak tekrarlaması gerektiği anlamına gelir (103,108)

DRE aynı zamanda teknik beceri gerektirir. Muayene eden kişilerden, prostatın tüm arka yüzeyini palpe edemeyenler de vardır (109).

Yaşlanan bir popülasyon ve artan prostat kanseri vakalarıyla, sağlık uzmanlarının DRE'yi fiziksel muayenenin rutin bir parçası haline getirmesi gerekmektedir. DRE, hem prostat kanseri bulma hem de klinik olarak önemli hastalıkları tespit etme şansını artırır. Bununla birlikte, prostat kanseri taraması yapılacaksa, kanser tespit oranını arttırmak için DRE ile birlikte PSA testi kullanılması tavsiye edilir (110).

- **PSA**

PSA, prostatta üretilen glikoproteindir; insan kallikrein ailesinin bir parçasıdır ve hem semen hem de plazmada bulunur. Semendeki PSA konsantrasyonları serumda ölçülen seviyelerin yaklaşık bir milyon katıdır. PSA, prostat kanserine özgü olmasa da prostata spesifiktir. Prostat kanserinin testi ve izlenmesi için kullanılır (111).

PSA seviyeleri, sistoskopi, akut idrar retansiyonu, prostat travması (örn., iğne biyopsisi veya prostatektomi) sonrasında, idrar yolu veya prostatik enfeksiyonla birlikte yükselebilmektedir. DRE, PSA seviyesini yükseltmez. BPH de bir miktar PSA yükselmesine sebep olur. Bu nedenle PSA taraması, BPH'yi erken prostat kanserinden ayırmak açısından klinik bir problemdir (112). PSA değerlerinin yorumlanmasında her zaman yaş, idrar yolu enfeksiyonu, prostat hastalığı, son tanı prosedürleri ve prostata yönelik tedavilerin mevcudiyeti dikkate alınmalıdır (113).

PSA testinin gerçek duyarlılığı ve özgüllüğü belirsizdir. Bu testin klinik olarak hassasiyeti %50-%75, özgüllüğü ise yaklaşık %90'dır. BPH düşündürülen semptomları olan erkekler arasında özgüllük azalır. PSA düzeyi 4.0 ng / mL'den daha yüksek olduğunda prediktif değeri yaklaşık %30'dur ve yaş faktöründe duyarsızdır. Çünkü artan prevalans, yaşla birlikte özgüllüğün azalmasına neden olmaktadır. PSA'nın duyarlılığının göreceli olarak düşük olması, düşük PSA seviyelerinde hastadan biyopsi alınması önerilir. PSA'nın ne kadar süre ile taranacağı tam olarak belli değildir, ancak 1 ila 2 yıl aralıklarla tekrarlanması önerilmektedir. İlk PSA seviyesi <2,0 ng / mL olduğunda daha uzun aralıkla, yüksek PSA seviyelerinde ise daha kısa aralıkla takip önerilir (112,114).

Normal PSA seviyeleri iyi tanımlanmamıştır Ancak genel olarak, bir erkeğin PSA seviyesi ne kadar yüksek olursa, prostat kanseri olması o kadar olasıdır. Ayrıca, bir erkeğin PSA seviyesindeki zaman içindeki sürekli yükseliş de prostat kanseri belirtisi olabilir (115).

Prostat kanseri olan hastaların %20 ve daha fazlasında PSA seviyesi normal bulunurken, 4 ng / ml ile 10 ng / ml arasında PSA seviyesine sahip olan erkeklerin sadece % 20'sinde prostat kanseri bulunur (116).

- **PSA türevleri**

Prostat kanserinin erken teşhisinde mevcut olan test total PSA serum düzeyidir . Total PSA kullanılmasından bu yana, PSA ölçümünün performansını iyileştirmek için çeşitli

PSA türevleri geliştirilmiş ve önerilmiştir. Böylece PSA'nın özgüllüğü arttırılmakla beraber gereksiz biyopsiler de azaltılmıştır. Bu PSA türevleri şunlardır:

Serbest PSA (fPSA) ve kompleks PSA (cPSA): PSA kanda serbest (fPSA) veya bir protein molekülüne (cPSA:Kompleks PSA) bağlı şekildedir Toplam PSA (tPSA), serbest ve bağlı formların toplamıdır. Standart PSA testi olarak ölçülen tPSA'dır. Aksi belirtilmedikçe, PSA, tPSA anlamına gelir. İyi huylu prostat koşullarında fPSA, kanserde ise cPSA daha fazla üretilir. Toplam PSA oranı (fPSA / tPSA), PSA testine yardımcı olan kullanışlı bir ölçüdür. Bir biyopsinin gerekip gerekmediğine karar vermek için PSA seviyelerinin 4 ile 10 ng / mL arasındayken fPSA ve cPSA ölçümleri kullanılır (112,117).

PSA hızı: 50 yaşından önce erken teşhis programlarına başlayan genç erkeklerde PSA hızı belirlenir. PSA hızı, zaman içinde PSA seviyelerindeki değişim oranıdır. PSA seviyesi 4 ng/mL'den az olan erkekler için, veriler PSA hızının 0.35 ng/mL ve daha yüksek olduğunu, kanser şüphesi ile biyopsi önerildiğini göstermektedir. PSA seviyesi 4-10 ng/mL olan erkekler için, PSA'nın 0.75 ng/mL ve daha yüksek değerdeki hızı kanser için şüphelidir. PSA seviyesi 10 ng/mLden yüksek olan erkeklerde ise PSA hızı mevcut değildir. PSA hızının kullanımı için mevcut öneriler, PSA seviyelerinin 18 aydan daha kısa olmayan bir sürede toplanmasını ve hesaplamının gerçekleştirilmesi için çoklu değerlerin (yani en az üç) kullanılmasını içerir. PSA hızı, normal prostat kanserinde erken teşhis için önemlidir ve "normal" serum PSA seviyelerine sahip milyonlarca erkeğin takibi için faydalı bir seri testi sağlar.

PSA yoğunluğu: PSA yoğunluğu, prostat hacminin TRUS (Transrektal ultrasonografi) ile ölçülmesini ve santimetreküp prostat hacmine düşen, mililitre başına nanogram cinsinden PSA değerini ifade eder. Hem PSA'nın hem de prostat hacminin ölçüm hassasiyetindeki eksiklik, PSA yoğunluğunun yaygın olarak klinik kullanımını engellemiştir (117,118).

- **Prostat kanseri geni 3 (PCA3)**

PCA3, prostata spesifik, kodlayıcı olmayan bir mRNA biyobelirtecidir. Rektal muayene sırasında prostata yapılan masaj sonrasında alınan idrar örneğinde saptanabilmesi avantajı ile ilk biyopsi sonuçları negatif olan erkeklerde ikinci biyopsi kararı verilmeden önce PCA3 değerlendirilebilmektedir. PCA3 testi için, rektal muayene sırasında 20-30 ml kadar idrarın toplanması yeterlidir. PCA3 geni normal

prostat dokusunda düşük düzeyde eksprese edilir (119). Prostat kanseri olan dokuda ise %95 den fazla bir oranda eksprese edilir. Normal prostat dokusuna göre kanserli dokuda PCA3 sentezinin 60 ile 100 kat fazla olması bu gene PSA'dan daha çok kansere spesifik olma özelliğini verir (120).

Prostat haricindeki normal ve kanser dokularında PCA3 transkripsiyonunun bulunmaması bu genin prostat kanserine spesifik olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinde PCA3 geninin aşırı eksprese olması, prostat hücresi içeren doku ve sıvı materyallerinin prostat kanseri teşhisinde kullanılabilmesine imkan sağlar (120-122). Aynı zamanda yapılan klinik çalışmalarda idrar PCA3 değeri (PCA3 mRNA/ PSA mRNA) serum PSA seviyesinden prostat kanseri teşhisinde daha üstün bulunmuştur (121-125). Sonuç olarak PCA3 geninin kansere özgüllüğü kansere bağlı olmayan PSA artışlarında önem kazanmaktadır (126).

2.1.1.5.Prostate biyopsisi

Prostat biyopsisi prostat kanseri tanısı için kullanılan güncel standartlardan birisidir. Hastanın biyopsi adayı olarak kabul edilmesi için iki ana kriter vardır. Bunlar şüpheli rektal muayene ve ideal koşullar altında elde edilen ve en az 3 hafta arayla iki ayrı ölçümle elde edilen 4 ng/ml ve daha yüksek PSA düzeyidir.

Dijital rektal muayene veya ultrason ile ölçülen prostatın büyüklüğünün dikkate alınması önemlidir. Örneğin, küçük olan prostat için yüksek PSA seviyesi, prostat kanseri olasılığının yüksek olduğunu gösterir. Prostat bezinin hacmi hesaplanarak biyopsi gerçekleştirilir. Prostat biyopsisi transrektal ultrason ve sedasyon altında gerçekleştirilir. Örnekler tüm bez yüzeyinin delinmesiyle elde edilir ve periferik bölgeden (adenokarsinomların %75'i bu bölgeye bağlıdır) alınmaya çalışılır. Geleneksel olarak her lobdan altı tane olmak üzere toplam 12 parça örnek alınır. Bu uygulamaya ilişkin riskler çoğunlukla kanama (rektal kanama, hematospermi ve hematüri) ve ateştir (idrar yolu enfeksiyonları, sepsis). Bu semptomlar dünyadaki işlemlerin yaklaşık % 2-20'sinde görülür. Biyopsinin amacı, patologun doğru bir histolojik tanı koymasına için tüm prostat bezinin temsili örneklerini elde etmektir. Biyopsiler karşılık gelen bölgeleri ile tanımlanır, böylece patologlar tümörün kapsamını ve lateralitesini belirleyebilir.

Gleason histolojik farklılaşma ölçeği hastadan alınan biyopsi örneklerinde sınıflandırma yapmak için kullanılır. Gleason ölçeği prostat kanseri hastalarının

evresini ve prognozunu tanımlamak için temeldir. Ölçek, baskın histolojik dereceyi temsil eden ilk sayı ve ikincil histolojik dereceyi belirten ikinci bir sayıyla ek olarak uygulanır. Buna göre, bir Gleason değeri, bir 3 + 4 tümörünü (buradaki ilk sayı 3'tür, yani daha az agresif) veya bir 4 + 3 tümörünü (ilk sayı 4'tür, yani daha agresif) yansıtır (127).

2.1.1.6.Prostat kanserinde evreleme

Bir hastaya prostat tümörü teşhisi konduktan sonra, kanserin prostatın dışına yayılıp yayılmadığını tespit etmek için evrenmesi gerekir. Evreleme aynı zamanda hastalığın yayılma riskini daha iyi anlayabilmemizi ve doğru tedavi seçeneğine sahip olmamızı sağlar. TNM evrelemesi, Amerikan Kanser / Kansere Karşı Uluslararası Birlik Ortak Komitesi (AJCC / UICC) tarafından geliştirilmiştir.

Primer tümörün (T), etkilenen bölgesel lenf nodlarının (N) ve yayılmış veya metastazlı (M) derecesini değerlendirmek için kullanılır. Dört aşama vardır; Aşama I'de prostatın sadece küçük bir kısmı kanserlidir, hücrelerin çoğu normaldir ve bez normal hissedilir. II. aşamada, prostatın parmakla muayesinde bir yumru hissedilir ve prostatın daha büyük bir kısmı etkilenir. III. evrede, tümör prostatın ötesine ve IV. Evrede ise daha ileri olarak lenf düğümlerine veya yakındaki organlara yayılmıştır. Evreleme Tablo 1'de daha açık bir şekilde belirtilmektedir (128,129).

Tablo 1. Prostat kanseri TNM sınıflandırması (130)

T - Birincil tümör	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör kanıtı yok
T1	Klinik olarak bulunmayan tümör elle tutulamaz veya görüntülenemez T1a Rezeke edilen dokunun %5 ve daha azında tesadüfi histolojik bulgu T1b Rezeke edilen dokunun %5 ve daha fazlasında tesadüfi histolojik bulgu T1c Yüksek prostat spesifik antijen nedeniyle iğne biyopsisi ile tanımlanan tümör
T2	Prostat içinde sınırlı tümör ¹ T2a Bir lobun yarısını veya daha azını içeren tümör T2b Bir lobun yarısından fazlasını içeren, ancak her iki lobu da içermeyen tümör T2c Her iki lobu da içeren tümör
T3	Prostat kapsülleri boyunca uzanan tümör ² T3a Mikroskopik mesane boynu tutulumu da dahil olmak üzere ekstrakapsüler genişleme (tek taraflı veya bilateral) T3b Seminal vezikülleri istila eden tümör
T4	Tümör sabittir veya seminal veziküllerin dışındaki bitişik yapıları istila eder: dış sfinkter, rektum, levator kaslar ve / veya pelvik duvar.
N- Bölgesel lenf düğümleri	
NX	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf bezi metastazı
M - Uzak metastaz	
MX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz M1a Bölgesel olmayan lenf nodu M1b Kemik M1c Diğer bölgeler

¹ iğne biyopsisi ile loblardan birinde veya her ikisinde bulunan, ancak elle tutulur veya görüntülemeyle görülemeyen tümör T1c olarak sınıflandırılır.

² Prostat apeksine veya prostat kapsülü içine (ancak bunun ötesinde değil) istila, patolojik T3 olarak değil, patolojik T2 olarak sınıflandırılır.

2.1.1.7.Prostat kanserinin derecelendirilmesi: Gleason derecesi, skoru ve sınıf grupları

Tümörler, prognoz için daha iyi öngürüde bulunabilecek şekilde derecelendirilir. Gleason Derecelendirme Sistemi, kanserlerin mikroskopta görüldüğü şekilde puanlandığı en yaygın kullanılan sistemdir. Biyopsiyle prostat dokusu örneği alınır ve mikroskop lamı üzerinde hazırlanır. En yaygın iki tümör modeli için iki dereceli puan verilir ve bu puanlar Gleason toplamı için bir araya getirilir. Gleason skorları 1 ile 5 arasında değişmekte olup, 5 en kötü prognoza sahiptir ve Gleason toplamı 2 ile 10 arasındadır. Gleason derecelendirmesi detaylı olarak Tablo 2’de gösterilmiştir. Patologlar hangi modelin tümörün en az %50'sine karşılık geldiğini belirlemek için birincil derece, tümörün azınlığını temsil etmek için ise ikincil derece tanımlaması yaparlar. Prostat kanseri için prognoz değişken olabilir. Gleason toplamı 8, 9 veya 10 olan daha agresif tümörler kısa sürede ölüme neden olabilir, ancak Gleason toplamı 6 veya daha düşük olan düşük dereceler herhangi bir klinik sonuca karşılık gelmeyebilir (Tablo 3) (131-134).

Tablo 2. Gleason skoru ve derecelendirmesi (134)

ISUP derecesi	Bulgular	Gleason Skoru
1	Kanserli prostat hücreleri, normal prostat hücrelerini yakından andırır. Bezler küçük, iyi biçimlendirilmiş ve sıkı bir şekilde paketlenmiştir.	2 - 6
2	Bezler daha büyük ve aralarında daha fazla doku var.	7 (3+4)
3	Doku hala tanınabilir bezlere sahiptir, ancak hücreler daha koyu renklidir. Bazı hücreler bezleri terk etmiş ve çevresindeki dokuyu istila etmeye başlamıştır.	7 (4+3)
4	Doku az sayıda tanınabilir bezlere sahiptir. Birçok hücre etrafındaki dokuyu istila ediyor	8 (4+4, 3+5 veya 5+3)
5	Doku tanınabilir bezleri yok. Çevreleyen doku boyunca genellikle sadece hücre tabakaları vardır.	9 - 10

*ISUP = Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği

Tablo 3. Prostat kanseri risk tanımlama (134)

Düşük risk	Orta seviye risk	Yüksek risk
PSA<10 ng/mL ve GS<7 (ISUP derecesi 1)	PSA 10-20 ng/mL ve GS=7 (ISUP derecesi 2/3)	PSA>20 ng/mL ve GS > 7 (ISUP derecesi 4/5)

*GS= Gleason skoru; ISUP= Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği; PSA= Prostat spesifik antijeni

2.2.Nanoteknoloji

'Nano', metrenin milyarda birini 'ya da 10^{-9} 'u tanımlamak için kullanılan bir ifadedir. Nanoteknoloji kavramı ilk defa, Nobel ödüllü Richard P Feynman tarafından, Amerikan Fizik Derneğinin 1959' da yapılan toplantıda, "Altta bir sürü oda var" başlıklı ünlü konuşmasında tanımlandı (135). O zamandan beri, Feynman'ın atom ölçeğinde maddeyi manipüle etme fikirleri fizik, kimya ve biyoloji alanında birçok gelişmelere neden oldu. Bu gelişmelerden sonra nanoteknolojilerin artık, ilaç geliştirme, su dekontaminasyonu, iletişim teknolojileri ve daha güçlü veya daha hafif malzemelerin üretimi gibi çeşitli alanlarda fayda sağlama potansiyeline sahip olduğu belirlendi. Nanoteknolojiler, nanometre ölçeğinde ya tek atom gruplarından ölçeklendirerek ya da dökme malzemeleri inceleyerek yeni malzemelerin yaratılmasını ve manipülasyonunu içermektedir (136). Nanoteknolojilerin gelişimi, fizik, kimya, biyoloji ve mühendislik alanlarını içeren modern, çok disiplinli bir bilim olsa da, hem doğada hem de insanlar tarafından nanopartiküllerin (NP'lerin) üretimi Hristiyanlık öncesi dönemden kalmadır (137). Nanoteknolojik yöntemler ile günümüzde kullanılan mevcut teknolojilerin yerine geçmesi ve daha hassas sistemlerin oluşturulması amaçlanmaktadır. Nanoteknolojik olarak üretilen nano boyutlu ürünlerin tıp, kimya ve biyoteknoloji gibi birçok alanda kullanmak mümkündür. Anti kanser ilaçların geliştirilmesine yönelik çeşitli nanopartiküllerin üretimi, nano tıbbın en önemli alanlarından biri olmuştur. Nano malzemelerin ortaya çıkışı disiplinlerarası çalışmaların bir sonucudur. Nano boyut olarak açıklanan yapılar, nano kristaller, nano parçacıklar, nano tüpler, nano teller, nano çubuklar gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Temel olarak bu yapılara nanopartikül denir (138).

2.2.1.Nanopartiküller

NP'ler çok yüksek yüzey alanı/hacim oranı ile karakterize küçük malzemelerdir (en az bir boyutta 1 ila 100 nm çap) (139). Boyutlarının sağladığı benzersiz özelliklerden dolayı, NP'ler endüstriyel, elektrik, tarım, ilaç ve tıbbi alanlarda çok çeşitli uygulamalara sahiptir (140). Son yıllarda, NP'ler çok küçük çaplara sahip olduklarından, sağlık, biyomedikal ve farmasötik uygulamalar, özellikle kanser tanısı ve tedavisi, hedefli ilaç salımı, biyosensör alanında hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde, kemoterapik ajanların kanser hücrelerinde hedeflenen bölgelere ulaşmaması ve sağlıklı dokular üzerinde meydana gelen toksiteden dolayı bilim insanları bu dezavantajların üstesinden gelmek için NP temelli ilaçlar üzerine odaklanmıştır. Nano taşıyıcı temelli ilaçların tümör dokusuna ulaşmasını sağlamak açısından NP'lerin büyüklüğü önemlidir (141). Küçük boyutlu NP'ler, büyük boyutlu olanlara göre kan damarları yoluyla tümör dokularına daha hızlı nüfuz ederler. Dolayısıyla NP büyüklüğünün optimizasyonu ilacın tümör dokusunda spesifik olarak yer almasına yardımcı olabilir (142). NP tabanlı ilaç dağıtım sistemleri, biyolojik engelleri aşma, ilaçları etkin bir şekilde taşıma ve belirlenen dokuyu hedefleme yeteneklerinden dolayı büyük bir popülerlik kazanmıştır (143). İlaç dağıtımı için NP'leri tercih etmenin ana nedeni, partikülün boyutunun ve yüzey özelliklerinin kontrol edilmesidir. Hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerinde; antikanser ilaç, taşıyıcı ve bir de ligand yer alır. Ligandlar dokuları hedeflerken, nanotaşıyıcı sistem antikorla konjüge edilir ve kanser hücreleri üzerindeki spesifik reseptörlere yönlendirilir (144). Bu özelliklere sahip olmasına rağmen, NP'ler ayrıca partiküllerin bir araya toplanması ve küçük boyutlarından dolayı zor tutuş gibi dezavantajlara sahiptir. Bununla birlikte, NP'ler tıp ve kozmetikte birçok uygulamada kullanılmaktadır (14).

NP'ler kanser tedavisindeki yaygın kullanımlarından dolayı ilgi çekmektedir. NP'ler, kanser hücrelerine son derece spesifik olan biyobelirteçleri veya antijenleri hedeflemek için kullanılabilir. Boyut ve yapı nedeniyle NP'ler, kemoterapötikler için yeni bir terapötik fikir olarak kabul edilmektedir. NP taşıyıcı sistemleri ile sağlıklı dokulara kıyasla anti-kanser ajanların tümör dokusunda birikiminin artırılması ile NP'lerin kanser tedavisinde potansiyel olarak kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. NP taşıyıcı sistemler, büyüklüklerinden ve hedef ligandın partikül yüzeyine bağlanma

kabiliyetlerinden dolayı serbest kemoterapötik moleküllerden çok daha fazla tercih edilir (15). Bu şekilde, tedavinin sonuçları iyileştirilir ve yan etkiler azaltılır (140). Son yıllarda, bu nano sistemlerin, hedeflenen ilaç dağıtımını, hipertermi, fotodinamik tedavisi, biyo görüntüleme ve biyosensörler gibi farklı biyomedikal uygulamalarda yerini almıştır (141,145).

NP'ler, en yaygın olarak metaller, metal oksitler, silikatlar, oksit olmayan seramikler, polimerler, organikler, karbon ve biyomoleküller olan çeşitli kimyasal yapıdaki malzemelerden yapılabilir. Bu amaçla alüminyum oksit, demir oksit, çinko oksit ve titanyum oksit NP'leri yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, bu NP'ler kullanılacakları belirli uygulamaların ihtiyaçlarını karşılamak üzere yüzey modifikasyonları ile tasarlanırlar. NP'ler, gaz, sıvı veya katı faz işlemleri kullanılarak çeşitli yöntemlerle sentezlenebilir (146).

2.2.2.TiO₂

TiO₂ beyaz, kokusuz ve yanıcı olmayan bir tozdur. TiO₂ iki kristal yapıya sahiptir; bunlar rutil ve anatazdır ve bu kimyasal olarak daha aktiftir. TiO₂ NP'lerinin rutil formları ayrıca TiO₂ ince parçacıkları olarak da adlandırılır. Anataz kristal yapısı arttıkça, reaktif oksijen türlerinin üretimi de artar. Bu nedenle, anataz TiO₂'nin sağlıklı hücreler için rutil TiO₂'den daha toksik olduğu düşünülmektedir. Rutil TiO₂ kimyasal olarak inert olarak kabul edilir, ancak partiküller küçüldüğünde, yüzey alanı artacaktır ve bu nedenle rutil TiO₂ partikülleri daha zararlı hale gelebilir. Aynı zamanda, NP'lerin yüzeyi üzerinde yapılan modifikasyonlar, TiO₂ partiküllerinin aktivitesinde değişikliklere neden olmaktadır (147). TiO₂ NP'leri ve mikropartiküller arasındaki önemli ve ana fark, yüzey alanıdır. Daha büyük yüzey alanlarının yardımı ile TiO₂ NP'leri, UV ışınımını emebilir, bu da mikropartiküllerden çok daha fazla fotokatalitik aktiviteye sahip olmasını sağlar. Gurr ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, TiO₂ NP'lerinin çapı ve toksisitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (148). TiO₂ tıp ve endüstride yaygın olarak kullanılan bir malzemedir. Fotokatalitik, fotodinamik ve sonodinamik olmasının yanı sıra boya, gıda boyası, diş macunu ve kozmetiklerde önemli kullanımlara sahiptir. TiO₂ NP'leri, biyouyumluluk, kimyasal stabilite ve optik özellikler gibi birçok benzersiz özelliğe sahiptir (149). Bu özelliklerden dolayı, ilaç taşıyıcısı olarak biyomedikal uygulamalarda TiO₂ NP'lerinin kullanımında son zamanlarda bir artış olmuştur (150). TiO₂'nin taşıyıcı olarak kullanılması için ilk

olarak toksisitesinin giderilmesi gereklidir. TiO_2 'nin biyo uyumluluğunu artırmak için PEG ile modifiye edilir (141).

Polietilen glikol (PEG) tekrar eden etilen eter gruplarına sahip hidrofilik bir polimerdir. PEG, birçok uygulamada kullanılan ucuz, çok yönlü, toksik olmayan, uygun farmakokinetik ve doku dağılımına sahip FDA onaylı bir polimerdir (151,152). NP'lerin yüzeyini PEG ile modifiye etmek sıvı içerisinde NP'lerin aglomerasyonunu engellediği gibi (153) onları protein adsorpsiyonuna dirençli kılar ve biyoyuumluluklarını artırır (154). Nanomalzemeleri PEG ile kaplamak aynı zamanda in vivo sirkülasyon süresini artırır ve böylece retiküloendoteryal sistem (RES) yoluyla dışarı atılma süresi azaltılmış olur (155). Yapılan çalışmalarda PEG ile kaplanmış tek duvarlı karbon nanotüpleri, kaplanmamış olanlardan daha az sitotoksik etki göstermiştir (156,157).

2.2.3. Kemoterapik ajanlar

Prostat kanseri tedavisinde çoğunlukla kullanılan kemoterapötik ilaçlar; etoposid, paklitaksel (PTX), dosetaksel, mocetinostat, vinblastine, mitoxantrone, doksorubisin (DOX), cisplatin (Cis) ve estramustine' dir. Bu kemoterapötiklerin istenmeyen birçok yan etkileri mevcuttur. Bu nedenle, prostat kanserinin uzamış tedavisinde yaşam kalitesinin iyileştirilmesi ve bu yan etkilerin giderilmesi amacıyla yeni anti-kanser bileşiklerin keşfi önem kazanmaktadır (158-161). Kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı vücudun direnç geliştirmesi, ilacın hedeflenen tümör bölgesine ulaşamaması ve kanser hücrelerinin normal sağlıklı hücrelere çok benzemesinden dolayı ilacın kanser hücreleri yanında normal hücreleri de yok etmesi bilim insanlarını bu konuda araştırmalar yapmaya yöneltmiştir (162).

DOX, çift DNA sarmalının iki nitrik bazının interkalasyon olarak rolünü açıklamak için hücresel düzeyde çeşitli moleküler mekanizmalar göstermektedir. Bu mekanizmalar DNA zincirlerinin kopmasına yol açan serbest radikallerin oluşumu, mitokondrideki solunum zinciri enzimlerinin inhibisyonu, membran lipit oksidasyonu, helikaz aktivitesi ve topoizomeraz II inhibisyonuna yanıt olarak apoptoz indüklemesidir (163). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda endotel hücreleri, kardiyomiyositler ve diğer kanserli olmayan hücrelerdeki DOX kaynaklı toksisitedeki p53'ün rolü üzerine odaklanmıştır. Klinikte DOX kullanımı ile ilişkili önemli yan etki, kardiyomiyopati ve kalp yetmezliği başlangıcıdır (164). Yapılan bir çalışmada, DOX

ile indüklenen apoptozun DOX' un redoks aktivasyonundan türetilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuyla bağlantılı olan kardiyotoksitesinde önemli bir rol oynadığını ileri sürülmektedir (165,166). Şimdiye dek, DOX, yumurtalık karsinomu, lenfoblastik lösemi, prostat, meme kanseri ve hepatoselüler karsinom gibi kanserlerin tedavisinde etkili antikanser ilaçlarından biridir (167). DOX için en büyük zorluklardan biri “bu ilacı istenen noktalara nasıl getireceğimiz” dir. Bu nedenle, yan etkilerini azaltmak için biyolojik dağılımını değiştirip tümör bölgelerinde birikimini artırabilen yeni bir dağıtım tekniği geliştirilmeye odaklanılmıştır (167,168).

Son yıllarda platin ve antitübilin bileşikleri kullanılarak solid tümörler için yeni bir tedavi geliştirilmiştir. Bu iki molekül grubu sıklıkla kanser hücreleri üzerinde daha iyi kontrol sağlamak için birlikte kullanılır (169). Hem platin bileşikleri hem de antitubulinler periferik sinir sistemi için toksiktir (170) ve bu ilaçların kombinasyon halinde kullanılması periferik nörotoksitesini artırır (171). McKeage ve ark. wistar sıçanlarında PTX ve cisplatinin birbirlerinin nörotoksitesini antagonize ettiğini bildirmişlerdir (172).

Taxus brevifolia kabuğundan izole edilmiş büyük bir antikanser ilaç olan PTX, özellikle solid tümörlerin çeşitli türlerine karşı anti-neoplazik aktiviteye sahiptir. PTX, birçok ülkede yumurtalık ve meme kanserlerinde ikinci basamak tedavisi için onaylanmıştır. PTX'in tek bir etki mekanizması vardır. Mikrotübül sistemindeki dinamik dengeyi bozar ve hücre döngüsünün geç G2 fazı ve M fazındaki hücreleri bloke eder ve böylece hücre replikasyonunu inhibe eder (173,174).

Çalışma kapsamında; PEG ile modifiye edilen TiO₂ NP'sine yüklenmiş DOX ve PTX ilaçlarının prostat kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin ve DUSP genlerinin ekspresyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

2.3.Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar (MAPK'ler)

MAPK, hücrelerdeki spesifik proteinlerin serin, treonin veya tirozin yan zincirine kovalent olarak fosfat bağlayarak hücre dışı sinyalleri hücreye tepkilere dönüştürerek hücreleri düzenleyen ana kinaz ailelerinden biri olan enzimlerdir. Proteinlerin fosforilasyonu, enzimatik aktivitelerini, diğer proteinler ve moleküller ile etkileşimlerini, hücre içindeki yerlerini ve proteazların parçalanma eğilimlerini kontrol edebilir. MAPK'ler, bira mayası gibi tek hücreli organizmalardan, insanlar da dahil

olmak üzere karmaşık organizmalara evrimi sırasında fonksiyonu ve düzenlenmesi korunmuş bir protein kinaz ailesi oluşturur (175,176).

MAPK ailesinin 3 önemli üyesi vardır. Bunlar; hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz (ERK1/2), p38 (α , β , γ , δ izoformları) ve c-Jun N-terminal kinazdır (JNK1/2/3). Her biri benzer şekilde komşu treonin ve tirozin kalıntıları üzerinden çift fosforilasyonla aktive edilir (177,178).

MAPK yolları, MAPK kinazlarının (MAPKK) serin ve treonin kalıntıları üzerindeki MAPK kinaz kinazları (MAPKKK) tarafından fosforilasyonundan başlayarak, büyüme faktörleri, sitokinler ve hücrel stres dahil olmak üzere birçok hücre uyarıcıları ile aktive edilebilir (179). Aktive edilmiş MAPKK'lar, aktivasyon ilmeğindeki korunmuş Thr-X-Tyr (TXY) motifinin komşu treonin ve tirozin kalıntılarında MAPK'ları fosfatlar. X ile belirtilen amino asit, ERK'de glutamik aside, JNK'de proline, p38'de ise glisine karşılık gelir (180-182). MAPK yollarının hücrel tepkisi, uyarının yapısına ve sinyalin süresine bağlıdır (183).

MAPK'ların ERK yolu büyüme, farklılaşma ve gelişme ile ilgilenirken, JNK ve p38 yolları tercihen iltihaplanma, apoptoz, büyüme ve farklılaşma ile ilgilidir (184). Genel olarak MAPK'lar, gen ekspresyonu, mitoz bölünme, hareket, metabolizma, bağışıklık ve programlanmış hücre ölümü gibi birçok hücrel aktiviteyi düzenler. Aynı zamanda, kanser oluşumunda, ilerlemesinde ve ayrıca kanser tedavisine verilen tepkilerin belirlenmesinde kritik bir rol oynar. Birçok önemli hücrel fonksiyonu kontrol etmesi nedeniyle MAPK'lerin insan fizyolojisindeki rollerini tanımlamak için yoğun olarak çalışılmıştır (185).

MAPK sinyalindeki düzenin bozulması, kanserin gelişimine ve ilerlemesine neden olur. Bunlara ek olarak ERK1/2 yolu genellikle hücre büyümesiyle bağlantılı olsa da, bu yol tümörlerin fenotipinin diğer yönlerine dahil edilmiştir . Bu nedenle, tüm insan kanserlerinin üçte birinde anormal ERK1/2 aktivasyonu gösterilmiştir (186). Bu yolun düzensizliği, hepatoselüler karsinom, mide adenokarsinom ve renal hücreli karsinom dahil olmak üzere çeşitli malignitelere gözlenmiştir. ERK1 / 2 ek olarak, TNF α (Tümör Nekroz Faktör- α), Fas ligand, radyasyon, ozmotik stres, hipoksi, büyüme faktörü yoksunluğu, nitrik oksit, hidrojen peroksit ve kemoterapötik ajanlar gibi çok çeşitli uyarıcılara cevap olarak apoptozu inhibe ederek hücre sağkalımını artırır (187). JNK ve p38'in dahil olduğu stresle aktive olan MAPK'lerin kanserdeki rolü ise

karmaşıktır. Fosforile edilen p38'in artmış seviyeleri, foliküler lenfoma, akciğer, tiroid ve meme karsinomlarının yanı sıra glioma ve baş boyun skuamöz hücreli karsinomlar gibi çeşitli malignitelerde ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda p38 MAPK yolağının tümör baskılamadaki rolünü gösteren çalışmalar da mevcuttur (188,189). JNK'lar programlanmış hücre ölümünü kontrol etmede önemlidir, ayrıca kanser tedavisinde moleküler bir hedef sağlayabilmektedir (190,191).

MAPK'ların gen ekspresyonu, hücre büyümesi, apoptozu ve çevreye verilen hücre sel tepkileri kontrol etmesindeki önemi ile birçok hastalıkla ilişkisi araştırmalarda onları öncelikli hale getirmiştir. ERK, JNK ve p38 yolaklarının hepsi ilaç gelişimi için moleküler hedef haline gelmektedir (192).

2.3.1.Çift özgüllüklü fosfataz ailesi (DUSP)

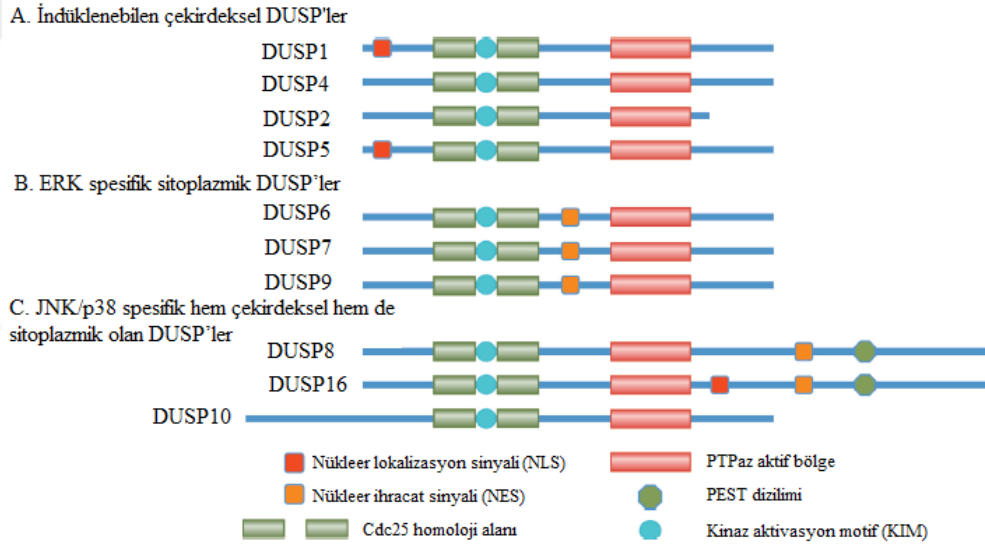
DUSP'ler, protein tirozin fosfataz (PTP) geni süper familyasına ait sınıf I Cys bazlı heterojen enzim grubudur (193,194). PTP'ler arasında, çift özgüllüklü MAPK fosfatazlar (DUSP-MKP) (10 üye), küçük boyutlu atipik DUSP'ler (15 üye), diğer atipik DUSP'ler (beş üye), yenilenen karaciğer fosfatazları (PRL), PTEN-benzeri fosfatazlar (sekiz üye) ve dahası yer almaktadır (195).

DUSP veya diğer bir deyişle MAPK fosfatazlar fonksiyonel olarak, MAPK'lerin ana negatif düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır (196). DUSP'ler, sinyal lipidlerinin de dahil olduğu protein olmayan substratlardan ve proteinlerin Ser/Thr (serin/treonin) ve Tyr (tirozin) kalıntılarından fosfatları kaldırma yeteneğine sahiptir. Fosfatların kaldırılmasıyla MAPK inaktivasyonu gerçekleşir. MAPK aktivasyonunun süresi sinyal çıkışı belirler ve bu nedenle sayısız biyolojik işlem için çok önemlidir. Anormal MAPK sinyalleri, uygun olmayan hücre sel immün yanıt ve malignitelerle ilişkilendirilmiştir. Çalışmalar, MAPK'ların negatif regülasyonunun kaybı nedeniyle MAPK fosfatazların kanser gelişimi veya ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (197).

Çift özgüllüklü MAPK fosfatazlar (DUSP-MKP'ler), korunmuş bölge yapısına sahip, katalitik olarak aktif 10 enzimi içeren bir alt aileyi temsil eder. Bir amino-terminal katalitik olarak aktif olmayan bölge ve bir de karboksil-terminal katalitik olarak aktif bölgeden oluşur. Katalitik olarak aktif olmayan bölge, farklı MAPK izoformları için DUSP'nin spesifik olarak bağlanmasını sağlayan ve dolayısıyla substrat seçiciliğini

belirleyen kinaz etkileşim motifini (KIM) içerir. Ayrıca, bazı DUSP'lerin subsellüler lokalizasyonunu belirleyen nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) veya nükleer sinyallerini (NES) aynı zamanda CDC25 homoloji domaini 2 (Hücre bölünme döngüsü-25 homoloji domaini 2) içerebilir. Katalitik bölge, daha geniş çaplı protein tirozin fosfataz (PTPaz) süper ailesinin karakteristiği olan yüksek oranda korunmuş aktif bölge konsensüs dizisini (HCX5R) ve prolin, glutamat, serin ve treonince zengin PEST dizisi içerir (198,199).

DUSP-MKP grubundaki 10 enzim, amino asit dizisi homolojisi, hücredeki lokalizasyonu ve substrat spesifikliğine göre 3 gruba ayrılmıştır. Bunlar; indüklenebilen çekirdeksel, ERK'e spesifik sitoplazmik ve JNK/p38'e spesifik hem çekirdeksel hem de sitoplazmik olan DUSP-MKP'ler yer alır (Şekil 8).



Şekil 8. 3 gruba ayrılan DUSP-MKP'lerin yapılarının şematik gösterimi (200)

Tablo 4'te görüldüğü gibi indüklenebilen çekirdeksel DUSP-MKP'ler DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP5; ERK spesifik sitoplazmik olanlar DUSP6, DUSP7, DUSP9; JNK/p38 spesifik olanlar ise DUSP8, DUSP10, DUSP16'dir.

Tablo 4. DUSP-MKP'lerin sınıflandırılması ve özellikleri (200)

Grup	Gen	Lokalizasyon	Substrat spesifikliği	Kaynaklar
İndüklenebilen çekirdeksel	<i>DUSP1</i>	Çekirdek	JNK, p38 > ERK	201,202
	<i>DUSP2</i>	Çekirdek	ERK, JNK	203,204
	<i>DUSP4</i>	Çekirdek	ERK, JNK > p38	205
	<i>DUSP5</i>	Çekirdek	ERK	206
ERK spesifik sitoplazmik	<i>DUSP6</i>	Sitoplazma	ERK	207
	<i>DUSP7</i>	Sitoplazma	ERK	
	<i>DUSP9</i>	Sitoplazma	ERK > p38	208,209
JNK/p38 spesifik	<i>DUSP8</i>	Sitoplazma/ Çekirdek	JNK, p38	
	<i>DUSP10</i>	Sitoplazma/ Çekirdek	JNK, p38	210
	<i>DUSP16</i>	Sitoplazma/ Çekirdek	JNK, p38	211,212

DUSP'ler hücre büyümesi, farklılaşma, strese bağlı yanıt ve apoptozun düzenlenmesinde anahtar olarak görev alır. Aynı zamanda fizyolojik olarak bağışıklık, nörobiyoloji ve metabolik homeostaz gibi temel süreçleri düzenler, bunların yanı sıra tümör oluşumu, patolojik inflamasyon ve metabolik bozukluklarda da rol oynar (213-215).

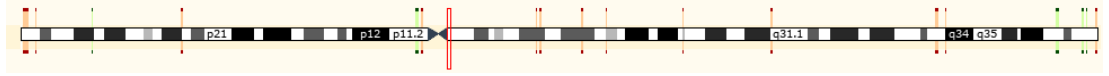
Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre, DUSP'lerin bağışıklığın düzenlenmesinde ve kanser terapisinde olası rolleri belirlenmiş ve MAPK'lerin DUSP'ler tarafından düzenlendiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, DUSP-MKP çalışmalarındaki bu artışa rağmen, DUSP-MKP'lerin insan kanserindeki rolü iyi bir şekilde tanımlanamamıştır. Birçok DUSP ve MAPK arasındaki fonksiyonel ilişki, DUSP-MKP alt ailesinde yer alan DUSP proteinleri için yüksek bir terapötik potansiyel sağlar. Buna göre, DUSP'lerin ekspresyonundaki veya fonksiyonundaki değişiklikler, insan hastalıklarında önemlidir. Dolayısıyla DUSP'ler potansiyel biyolojik belirteç ve terapötik hedef olarak kullanılmaktadır (21,216,217).

Biz de çalışmamızda, DUSP-MKP alt ailesinde yer alan DUSP'lerin kanserdeki önemini göz önünde bulundurarak, DU-145 prostat kanseri hücre hattında indüklenebilen çekirdeksel gruba dahil olan *DUSP1*, *DUSP2* ve *DUSP4*; ERK spesifik sitoplazmik gruptaki *DUSP6*; JNK/p38'e spesifik olan *DUSP10* genlerinin

ekspresyon seviyelerini belirlemeyi, prostat kanserinin tedavisi ve prognozu yönünden bir öneme sahip olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık.

2.3.1.1.Çift özgüllüklü fosfataz 1 (DUSP1)

Çift özgüllüklü fosfataz 1 (DUSP1/MKP1) treonin-tirozin çift özgüllüklü fosfataz ailesinin bir üyesidir. Molekül kütlesi 40 kDa olan DUSP1, 447 aminoasitten oluşmaktadır. Kromozom üzerindeki konumu ise 5q34'tür ve çekirdekte bulunur (Şekil 9).

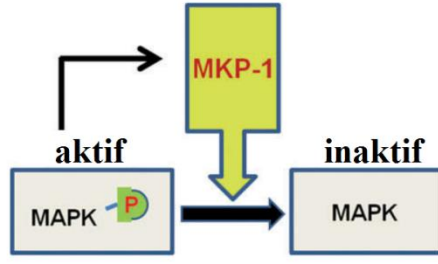


Şekil 9. *DUSP1* geninin kromozom üzerindeki konumu (218)

DUSP1 ilk olarak, murin hücrelerinden kültüre edilmiştir. DUSP1, adenozin trifosfaz (ATPaz) olarak aktif bölge konsensüs dizisini içeren bir amino terminal katalitik olarak aktif olmayan bölge ve bir C-terminal katalitik olarak aktif bölge olmak üzere iki bölgeden oluşur. Ayrıca *DUSP1*'in ekspresyon seviyesi genel itibarıyla en yüksek karaciğer, kalp ve akciğerdedir (219-221).

DUSP1, mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) izoformlarının etkisizleştirilmesinde büyük önem taşır (222,223). DUSP1 bir protein fosfataz olarak, treonin ve tirozin defosforilasyonu aracılığıyla ERK, p38 ve JNK sinyalizasyonunun inaktif hale gelmesinde rol oynar (196,224). DUSP1, temel olarak MAPK sinyalizasyonunu düzenleyerek; hücre çoğalması, farklılaşması ve transformasyonu, stres yanıtları, iltihaplanma, hücre döngüsü ve apoptoz gibi süreçlerde yer alır (199).

Genel olarak hücrelerdeki DUSP1 proteini seviyeleri çok düşüktür. Büyüme faktörü ile indüklenen ERK-MAPK aktivasyonu, çeşitli hücre tiplerinde DUSP-1 protein ekspresyonunu artırır (225). DUSP1 ayrıca, sürekli sinyallere cevap olarak bir oto-düzenleyici döngü içinde hareket edebilir ve bunların indüklendiği MAPK'yi devre dışı bırakmak için hareket edebilir (Şekil 10).



Şekil 10. DUSP1 ve MAPK etkileşiminin şematik gösterimi. Bu şekil, MAPK basamaklarını sınırlayan DUSP-1'in otoregülatör geri besleme döngüsünü göstermektedir. DUSP-1, aktif MAPK'ları aktif olmayan forma indirger. Aktif MAPK'lar DUSP-1 stabilitesini düzenler (226)

DUSP1 stabilitesi, ubiquitin-proteazom yoluyla, ERK aracılı fosforilasyon ile düzenlenir ve ERK yolu inhibisyonu ile azaltılır (227,228).

DUSP-1 RNA'nın yarı ömrü 1-2 saattir. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör sinyali sadece DUSP-1 RNA ekspresyonunu indüklemekle kalmaz, aynı zamanda DUSP1'in fosforilasyon / defosforilasyonunun bir sonucu olarak DUSP1 protein stabilitesini birkaç saat uzatır. C terminal bölgesindeki amino asitlerin manipülasyonları DUSP1'in protein olarak stabilitesini ve fonksiyonunu etkiler. C-terminalde serin kalıntılarının ERK tarafından fosforilasyonu, DUSP1'in degradasyonunu kontrol eder veya önler. Bu yüzden C-terminaldeki serin aminoasiti degradasyon yolağında önemli rol oynar. DUSP-1 stabilitesi ve degradasyonu, amino asitlerin fosforilasyon / defosforilasyon veya yer değiştirme / mutasyon gibi çeşitli mekanizmaları ve belirli koşullar ile düzenlenebileceği açıktır (227,229).

Birçok kanser türünde *DUSP1* ekspresyonunun anormal olduğu ve hastalığın prognozu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Daha ileri çalışmalarda ise DUSP1'in tümör oluşumu ve tümör ilerlemesindeki rolünün karmaşık olduğu ortaya koyulmuştur. DUSP1, kanser oluşumunu arttırabilir veya inhibe edebilir. Buna bağlı olarak belirli kanser türlerinde artmış veya azalmış DUSP1 ekspresyonu gözlenmektedir (230).

DUSP1 ekspresyonu bazı kanserlerde normal hücrelere kıyasla artmıştır. Artmış *DUSP1* ekspresyon seviyeleri prostat, pankreas, kolon, mesane, mide, meme, over ve akciğer kanserinde gözlenmiştir. DUSP1 artışının bir sonucu olarak tümör hücrelerini apoptozdan koruyan JNK aktivasyonu inhibe edilebilir. Yani DUSP1, esas olarak, bu

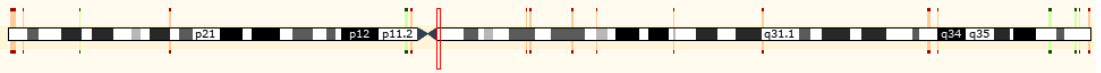
kanserlerde JNK'nın fosforilasyonunu inhibe ederek karsinogenezi destekler (231-237).

DUSP1 ekspresyonundaki azalma ise hepatoselüler karsinomada ve baş boyun sküamöz hücreli karsinomada görülmüştür. Azalan *DUSP1* seviyeleri, ERK / MAPK sinyalleme yolunu güçlendirerek tümörigenezin daha ileri evrelerinde proliferasyona ve tümörde kütle artışına sebep olur (238,239).

Ayrıca, *DUSP1*'in tümör radyoterapisi, kemoterapisinde, immünoterapide ve biyoterapide rol oynadığı saptanmıştır. *DUSP1*, JNK kaynaklı apoptozun azalmasıyla çeşitli kanserlerde kemoterapiye ve radyasyona karşı direnci artırır ve tümörlerin immün sistemden kaçışında önemli yer tutar. Terapötik olarak *DUSP1* hedeflenirse, ilaç direncinin üstesinden gelinbilir ve mevcut antitümör ilaçların etkinliği önemli ölçüde artırılabilir. *DUSP1*'in farklı tümörlerde, farklı fonksiyon ve mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, onu yeni bir terapötik hedef haline getirir (230).

2.3.1.2.Çift özgüllüklü fosfataz 2 (*DUSP2*)

DUSP2, ilk olarak 1993 yılında T hücrelerinden klonlanan, aynı zamanda PAC1 olarak da bilinen bir MAPK fosfatazdır. Molekül kütlesi 34.4 kDa'dır. Çekirdekte yer alır ve 314 aminoasitten oluşur. Aktive edilmiş hücrelerin fosfatazı olan *DUSP2* geni, kromozom üzerinde 2q11.2 konumunda yer alır (Şekil 11).

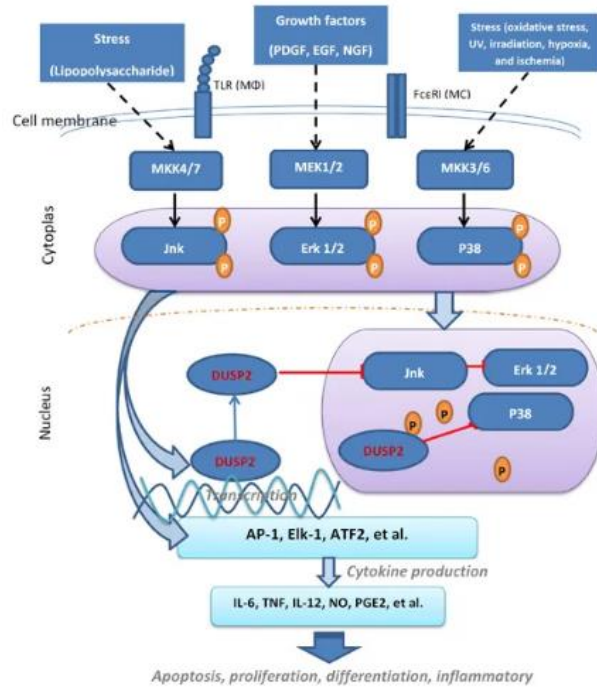


Şekil 11. *DUSP2* geninin kromozom üzerindeki konumu (240)

DUSP2 ağırlıklı olarak timus, dalak, lenf düğümleri, beyin ve karaciğer gibi yüksek T hücre içeriğine sahip hematopoetik dokularda eksprese edilir (241-243). B ve T hücre aktivasyonundan sonra *DUSP2* ekspresyonu, mitojen ile aktive edilerek hızlı bir şekilde uyarılır (244).

Çift özgüllüklü protein fosfataz alt familyasının bir üyesi olarak, *DUSP2*, hem fosfoerin/treonin hem de fosfotirozin kalıntılarını defosforile ederek hedef kinazlarını etkisiz hale getirir (199). *DUSP* ailesinin diğer üyelerine benzer şekilde, MAPK sinyalizasyonunun negatif düzenleyicisidir. Buna bağlı olarak JNK, ERK1/2 ve p38 sinyalizasyonu; çekirdekte sitokin üretimi, apoptoz, proliferasyon, farklılaşma ve enflamasyon gibi hücrel yanıt için transkripsiyon faktörü aktivasyonunu inhibe

edebilir. Buna benzer şekilde mast hücreleri ve makrofajlarda JNK-ERK-p38 sinyalizasyonu DUSP2 tarafından kontrol edilebilmektedir. DUSP2, tercihen, ERK1/2, p38 ve JNK'yi defosforile edebilir, fakat JNK için fosfataz aktivitesi düşüktür. DUSP2, makrofajlarda Toll benzeri reseptör (TLR) ligandları tarafından ve mast hücrelerinde yüksek affiniteli IgE reseptör (FcεRI) ligasyonu ile uyarılır. Bu da çekirdekteki *DUSP2* geninin ekspresyonunu uyararak DUSP2'nin birikmesine sebep olur. DUSP2, hücrelerde JNK-ERK'in negatif çapraz kontrolünü sağlar, aynı zamanda ERK2'yi inaktif hale getirir ve defosforilasyon ile p38 sinyalizasyonunu bozar. Aslında, DUSP2 hem makrofaj hem de mast hücrelerinde enflamatuvar genlerin ekspresyonunu artırır (Şekil 12) (214).



Şekil 12. DUSP2 tarafından gerçekleştirilen immün hücre aktivasyonunun fosforilasyon yolağı. Oklar uyarılmayı, kırmızı çizgiler ise yolaktaki inhibisyonu gösterir (214)

DUSP2 eksikliği ise JNK aktivitesinde artışa ve ERK ve p38 aktivitesinde beklenmeyen bozulmalara yol açmıştır (216). DUSP'nin hastalıklarla olan ilişkisi değerlendirildiğinde, örneğin insan akut lösemilerinde beklenmedik şekilde DUSP2 seviyelerinde azalma görülür ve bu da ERK aktivasyonunun aşırı bir şekilde baskılanmasına sebep olur (245).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda hipoksi tarafından inhibe edilen *DUSP2* ekspresyonunun, endometriozis gelişimi için kritik bir faktör olduğu tespit edilmiştir. *DUSP2*'nin ekspresyonu, endometriotik stromal hücrelerde azalır ve transkripsiyonel olarak HIF- 1 α (Hipoksi-indüklenebilir faktör 1-alfa) tarafından baskılanır. Ayrıca, *DUSP2*'nin hipoksi yoluyla azalması, ERK ve p38 MAPK fosforilasyonunu ve siklooksijenaz-2'nin ekspresyonunu uyarır (246).

DUSP2, CLN3 hastalığı gibi öncelikle sinir sistemini etkileyen kalıtsal bir hastalıkta biyobelirteç olarak hedef haline gelmektedir (247).

DUSP2'nin mRNA ve protein düzeyleri, meme, kolon, akciğer, yumurtalık, böbrek ve prostat kanserinde oldukça azalır. *DUSP2*'nin baskılanması, tümör oluşumu ve ilerlemesiyle ilişkilidir (248). *DUSP2*, MAPK kaskadının inhibisyonuyla birlikte hücre büyümesini baskılar ve p53'ün aşağı yönlü efektörü olarak apoptozun uyarılmasında görev yapar (249).

DUSP2, başlangıçta hematopoetik hücrelerden klonlandığı için çalışmalar genelde bağışıklık sistemi hakkında yapılmıştır. Ancak son yıllarda, *DUSP2*'nin insan kanserindeki patolojik rolü ve diğer hastalıklarla olan ilişkisi ilgi çekmiştir. *DUSP2*'nin rollerinin ve MAPK sinyalizasyonunun daha iyi anlaşılmasıyla birlikte, bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklar, iltihaplanma, kanser veya diğer hastalıklar için yeni tedaviler geliştirmek umut vaadedici olabilir (250).

2.3.1.3.Çift özgülüklü fosfataz 4 (*DUSP4*)

DUSP ailesinin bir üyesi olan çift özgülüklü fosfataz 4 (*DUSP4*), MAPK fosfataz 2 (MKP2) olarak da bilinir. *DUSP4* geni kromozom üzerinde 8p12 konumunda yer alır. *DUSP4* geninin kodladığı protein ise 394 aminoasit içerir, yaklaşık 43 kDa'dır ve çekirdekte lokalizedir. *DUSP4* ekspresyonu mide, safra kesesi, mesane ve yağ dokularında yüksek bulunmuştur (Şekil 13).

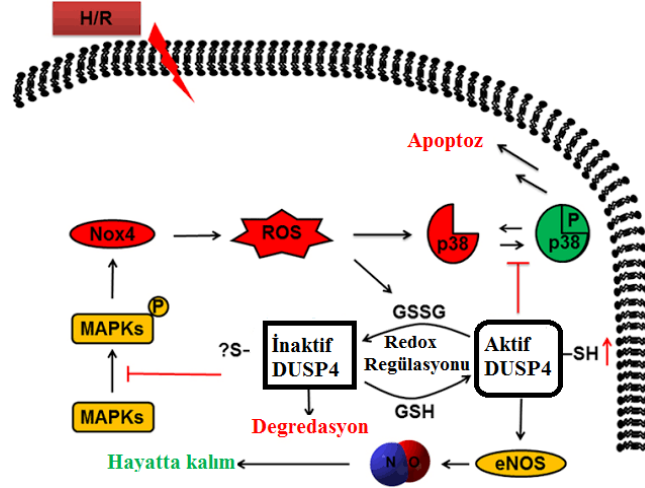


Şekil 13. *DUSP4* geninin kromozom üzerindeki konumu (251)

Diğer MAPK'lerden ziyade daha az çalışılan *DUSP4*, MAPK sinyalizasyonunu kontrol ederek hücre çoğalması ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol alır (22). Bununla birlikte, *DUSP4*'ün kanserdeki işlevi karmaşıktır. MAPK sinyal yolağının

negatif düzenleyicisi olarak, DUSP4 bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak davranabilir. DUSP4'ün ekspresyonundaki azalma, kolorektal kanser (252), meme kanseri (253), pankreas kanseri (254) ve yaygın B hücreli lenfoma (255) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde ilerlemeyle ilişkilidir. Ancak DUSP4'ün aşırı ekspresyonu da kanser gelişimi ve ilerlemesine yol açmaktadır. *DUSP4*'ün artmış mRNA seviyeleri, hepatomlarda, pankreas kanserinde, ailesel modüler tiroid karsinomu, çoklu endokrin neoplazi, papiller tiroid karsinomunda gözlenmektedir. Ayrıca, gliomada mRNA düzeyindeki aşırı artış ile *DUSP4*'ün epigenetik olarak susturulmuş bir gen olduğu bulunmuştur (256). Aynı zamanda birçok çalışmaya göre, DUSP4'ün kanserde ilaç direnci ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (257,258).

Yapılan çalışmalarda DUSP4'ün kanserden ziyade kardiyovasküler öneme sahip olduğu da bulunmuştur. DUSP4, hücreleri hayatta tutmak için hipoksi/reoksijenasyon (H/R) hasarına yanıt olarak MAPK'lerin aktivasyonunu düzenler. Buna bağlı olarak DUSP4'ün p38 aktivasyonunu baskılamasıyla hücre apoptozu önlenir. Bunun aksine DUSP4, H/R kaynaklı oksidatif stres altında bozulmaktadır. DUSP4'ün bozulması, hücre ölümü ve apoptoza yol açan p38'in aktivasyonunun aşırı şekilde artmasına neden olur. Ayrıca, DUSP4'ün ekspresyonundaki aşırı artış, hücrede fazla miktarda bulunan reaktif oksijen türleri (ROT) varlığında hayatta kalmaya yardımcı olmak için, hücrel nitrik oksit (NO) üretimini artıran endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunda ve stabilitesinde bir artışa yol açar. Benzer bir şekilde, *DUSP4*'ün aşırı ekspresyonu, ROT oluşumunu indirmek için *NADPH oksidaz 4* geninin (*Nox4*) ekspresyonunda bir azalmaya yol açar. Genel olarak, *DUSP4*, hücreye H/R kaynaklı oksidan strese karşı koruma için çoklu mekanizmalar yoluyla antioksidan bir gen olarak görev yapar (Şekil 14) (259).

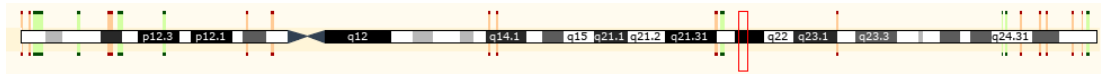


Şekil 14. DUSP4'ün H/R kaynaklı oksidan stresteki rolü (259)

Ayrıca DUSP4, forbol esterleri ve büyüme hormonları dahil olmak üzere bir dizi uyarana yanıt olarak da indüklenebilmektedir. Ek olarak, ERK2'nin DUSP4 aracılı inaktivasyonunun, insan fibroblastlarında replikatif yaşlanma oluşumunda kilit bir rol oynadığı bulunmuştur. DUSP4'ün fonksiyonları bunlarla kısıtlıdır ve daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir (260).

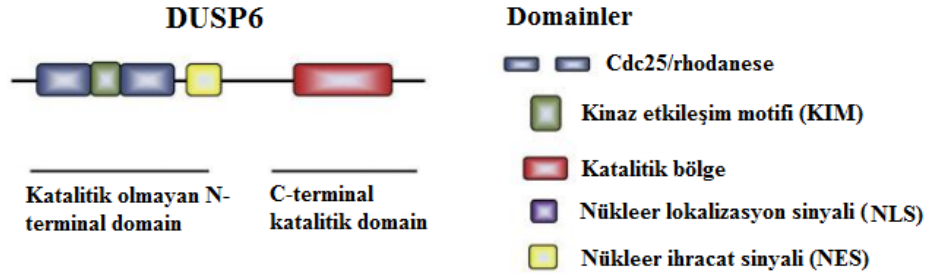
2.3.1.4.Çift özgüllüklü fosfataz 6 (DUSP6)

Çift özgüllüklü fosfataz olan DUSP6, MKP3 olarak bilinir ve sitoplazmada yer alır. *DUSP6* kromozomun 12q21.33 bölgesinde yer alır ve kodlama dizisi 1146 nükleotid içerir. *DUSP6* geninin kodladığı protein 381 amino asitten oluşur ve molekül kütlesi yaklaşık 42.3 kDa'dır (Şekil 15).



Şekil 15. DUSP6 geninin kromozom üzerindeki konumu (261)

DUSP6, yüksek oranda korunmuş C-terminal domaininde, kanonik tirozin / treonin-spesifik fosfataz işaret dizisi HCXXXXXR içerir. Burada sistein, esansiyel enzimatik nükleofil gibi davranır ve arjinin fosfotirozin veya fosfotreonin üzerindeki fosfat grubu ile doğrudan etkileşime girer. DUSP6'nın amino-terminal domaini, arginin bakımından zengin kinaz etkileşimi motifi (KIM) ve lösün yönünden zengin nükleer ihracat sinyali (NES) içerir (Şekil 16) (262).

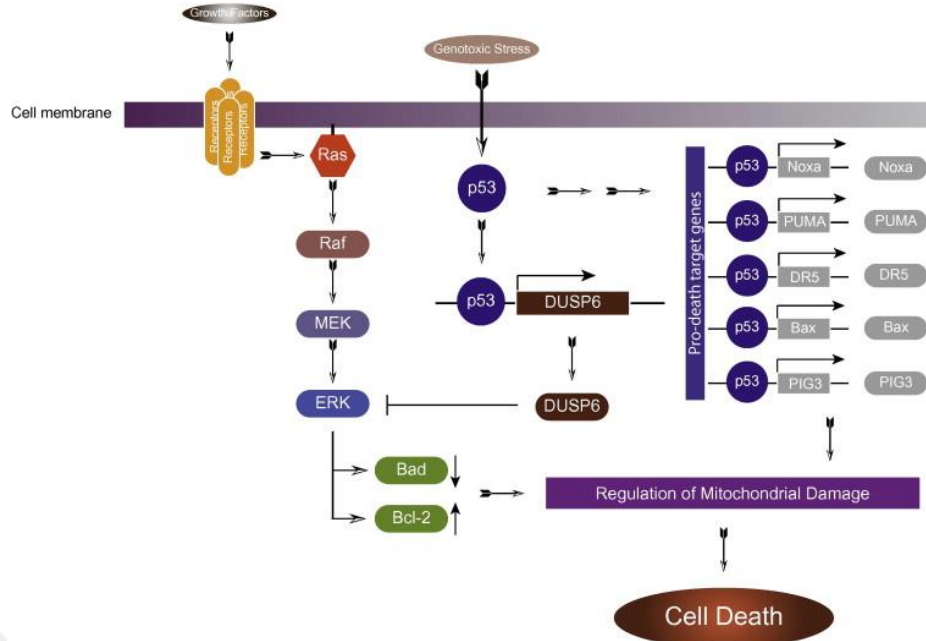


Şekil 16. *DUSP6*'nın domain yapısının gösterimi (262)

DUSP6'nın sitozoldeki lokalizasyonu, ERK spesifitesi için oldukça etkilidir ve *DUSP1* ve *DUSP4* gibi diğer MAPK fosfatazlardan farklılık sağlar, aynı zamanda ERK'in sitoplazmada tutulmasını ve hedef efektörlerin bulunduğu çekirdeğe translokasyonunun önlenmesi yoluyla, ERK için daha etkin bir inaktivatör yapar. Böylece *DUSP6*, ERK sinyalizasyonu düzenleme mekanizmasına aracılık eder ve ERK seviyelerini azaltan geri besleme düzenleyicisi olarak rol oynar (207,263).

DUSP6, ERK'nin negatif regülasyonu sayesinde tümör baskılayıcı işleve sahiptir. Tümör baskılayıcı olduğu, pankreas kanseri, akciğer kanseri, nazofarengeal karsinom, meme kanseri ve baş boyun kanseri gibi çeşitli kanserler üzerinde yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Daha ileri çalışmalarda, *DUSP6*'nın ERK aktivasyonunun düzenlenmesi aracılığıyla kemodirence sahip olduğu gösterilmiştir (22).

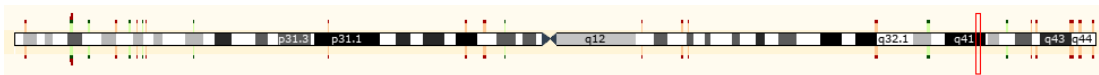
DUSP6, ayrıca genotoksik streslerin neden olduğu p53 kaynaklı hücre ölümünde görev alır. p53, farklı hedefteki gen gruplarıyla hücre döngüsünü durduran veya hücre ölümüne sebep olan kilit bir rol oynar. P53, ERK fosforilasyonunu ve genotoksik streslere cevap olarak B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) familyasına ait proteinlerin ekspresyon seviyelerini düzenleyerek *DUSP6*'yı indükler. Yani *DUSP6* hücre çoğalmasının inhibisyonunda rol oynayan p53 ile indüklenen hedef genlerden birisidir. p53, hücre ölümü yolağını hızlandıran hedef genleri (örneğin, Noxa, PUMA, DR5, Bax ve PIG3) aktive eder. Ek olarak, p53, ERK1/2'yi defosforile edebilen ve etkisiz hale getirebilen *DUSP6* gibi hedef genleri işleminden geçirerek hücrenin hayatta kalmasını inhibe edebilir. ERK1/2'nin fosforilasyonu, Bcl-2'nin bozulmasına ve Bcl-2 ilişkili ölüm promotörün (Bad'ın) aktivasyonuna neden olarak, mitokondriyal hasara ve sonuçta hücre ölümüne yol açar (Şekil 17) (264).



Şekil 17. p53-aracılı DUSP6 ekspresyonu arasındaki ilişkinin şematik diyagramı (264)

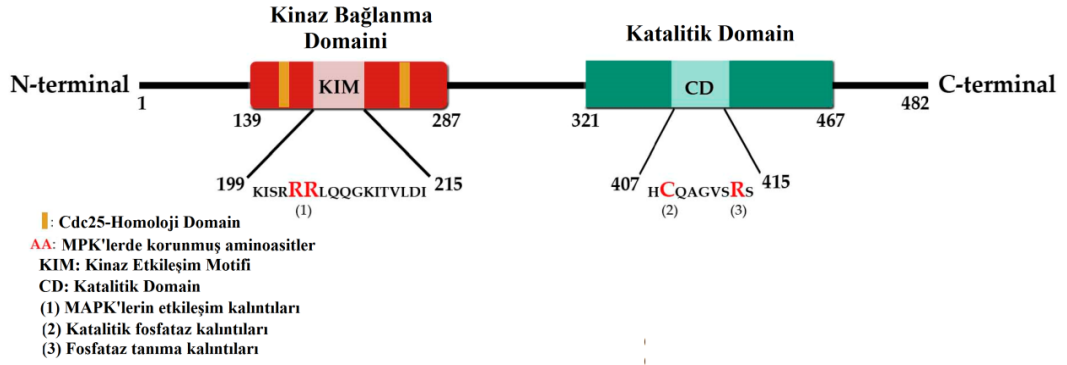
2.3.1.5.Çift özgüllüklü fosfataz 10 (DUSP10)

MAPK fosfataz-5 (MKP-5) olarak bilinen DUSP10, hem çekirdek hem de sitoplazmada bulunan, JNK ve p38'e spesifik olan bir MAPK fosfataz olarak tanımlanmıştır. *DUSP10* geni, kromozomun 1q41 konumunda lokalizedir. *DUSP10* geni tarafından kodlanan protein 482 amino asitten oluşur ve molekül kütlesi yaklaşık 52.6 kDa'dır. İnsan genomunda yer alan *DUSP10* sekansı içinde yaklaşık 3.4 ve 2.4 Kb'lik iki transkript tanımlanmıştır (Şekil 18) (210).



Şekil 18. *DUSP10* geninin kromozom üzerindeki konumu (265)

DUSP10 proteini, diğer aile üyelerinden farklı olarak iki CDC25 homoloji bölgesine, bir C-terminal katalitik domaine ve bilinmeyen fonksiyona sahip N-terminal uca 150 amino asit içeren diziye sahiptir (Şekil 19) (266).



Şekil 19. DUSP10'un domain yapısı (266)

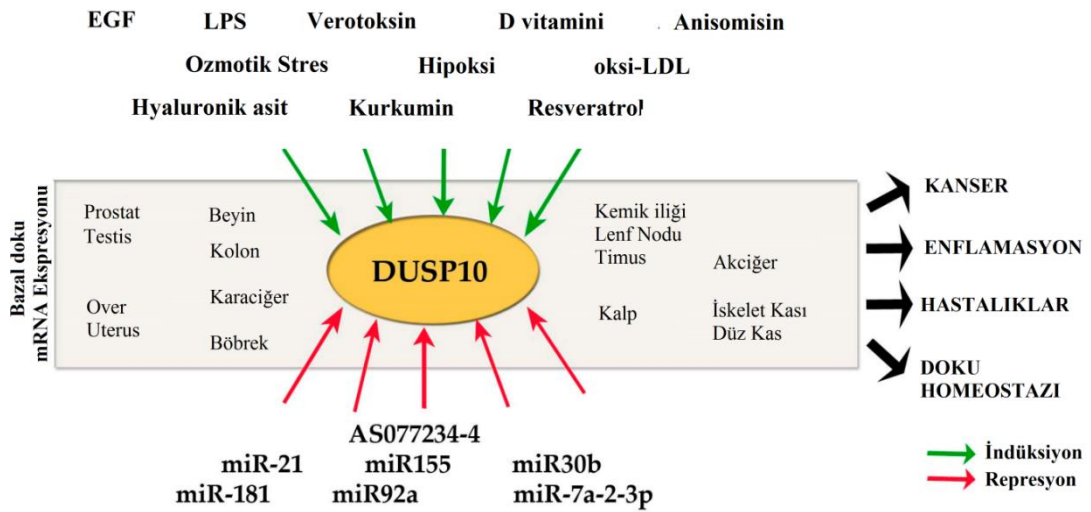
İnsana ait DUSP10'un katalitik ve kinaz bağlayıcı alanların kristal yapı karakterizasyonu, substratlara olan afinitesini tanımlamak için belirleyici olmuştur. MAP kinaz bağlayıcı domain, p38 ve JNK fosforilasyonu üzerinde etkisi çok az olan diğer MPK'lardan yapısal olarak ayrılır. DUSP10 katalitik domaini, kendi başına aktif bir konformasyon yapısı nedeniyle spesifiktir (267).

DUSP10, farklı afinitelerde aktive edilmiş MAPK'lerin hem pTyr (fosfo-tirozin) hem de pThr (fosfo-treonin) kalıntılarını defosforilleme yeteneğine sahiptir. p38 ve JNK MAPK'leri ERK 'e göre daha seçici ve etkili bir şekilde defosforile olmaktadır. DUSP10, p38 ve c-Jun N-terminal kinazın (JNK) negatif regülatörüdür. Buna ek olarak, DUSP10'un ERK2 aktivitesini düzenlediği ve fosfo-kalıntıları uzaklaştırdığı bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmaya göre DUSP10'nun, ERK için bir iskele proteini olarak görev aldığı bildirilmektedir. Yani DUSP10, ERK'yi sitoplazmada tutar, ERK'yı enzimatik olarak parçalamaktan korur ve ERK'ye bağlı genlerin transkripsiyonunu azaltarak negatif olarak düzenleme yapar. Bununla birlikte, güncel çalışmalar, DUSP10'un, MAPK olmayan substratlarının fosfo-serin (pSer) kalıntılarını defosforile edebildiğini de göstermiştir (268,269).

DUSP10, hemen hemen tüm dokularda eksprese edilir. Ancak hematopoetik sistem ve karaciğer hariç diğer dokulardaki ekspresyon seviyeleri düşüktür. En yüksek ekspresyon, miyeloid ve T hücrelerinde görülür (270).

DUSP10, temel olarak farmakolojik ajanlar, miRNA'lar gibi uyarıcılar veya belirli inhibitörler tarafından düzenlenebilmektedir. *DUSP10* ekspresyonunu uyaranlar Şekil 21'de özetlenmiştir. Bu uyarıcılar arasında epidermal büyüme faktörü (EGF), D vitamini ve hyaluronik asit bulunmaktadır. *DUSP10*'daki artışlar, hipoksi, anizomisin

veya ozmotik basınç gibi bazı streslere cevap olarak da gözlenmiştir. Ayrıca, pro-enflamatuar lipopolisakkarit (LPS), verotoksin ve oxi-LDL gibi çeşitli doğal immün reseptör ligandları makrofajlarda *DUSP10* ekspresyonunu indükler. Buna ek olarak *DUSP10* ekspresyonunu artıranlar arasında resveratrol ve kurkumin gibi birkaç anti-enflamatuar bileşik yer almaktadır. Buna bağlı olarak, MAPK'ların pro-enflamatuar aktivitelerinin *DUSP10* tarafından baskılanması yoluyla aracılık edebileceğini gösterir. Öte yandan, *DUSP10* geni, farklı hastalıklar ve kanserlerde indüklenen miRNA'lar tarafından negatif olarak düzenlenebilir. Bu durumda *DUSP10*, miR-21, miR-30b ve miR-155 için doğrudan bir hedef haline gelmektedir (Şekil 20) (271,272).



Şekil 20. Farklı sinyallerin *DUSP10*'un ekspresyonu üzerindeki etkisi (272)

DUSP10, immün yanıtlar sırasında indüklenebilir bir fosfataz olarak görev yapmaktadır. Fare lenfositlerinde yapılan bir çalışmada, *DUSP10* geninin yapısal olarak eksprese edildiği, ancak T hücre reseptörü aktivasyonunu takiben azalacak yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Buna karşılık, *DUSP10* makrofajlarda yapısal olarak eksprese edilmez ve LPS stimülasyonundan sonra azalacak yönde düzenlenir. Bu fosfatazın immün sistemin gelişimi için gerekli olmadığı, doğal ve adaptif immün yanıtlarda, p38 ve JNK aktivitesinin sınırlandırılmasında ve sitokin üretiminin düzenlenmesinde gerekli olduğu bildirilmiştir. Bunu takiben çoğu araştırmacı *DUSP10*'un hastalıklardaki bağışıklık ve iltihaplanma aktivitesine odaklanmıştır ve ekspresyonunun azalacak veya artacak yönde düzenlendiğini ortaya koymuştur (273).

DUSP10'un kanserdeki olası rolleri ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcuttur. *DUSP10* ekspresyon seviyesi, kanserli dokuların çoğunda, normal dokuya göre daha yüksektir ve tümör tipine göre değişkenlik gösterir. Bu da DUSP10'un pro-tümörjenik bir role sahip olduğunu belirtir. Örnek olarak bazı metastatik melanom türleri ve meme kanseri karsinomları yüksek *DUSP10* ekspresyonuna sahiptir. Bunun yanı sıra, DUSP10'un kanserde baskılayıcı rol oynadığını belirten bazı çalışmalar da vardır. Başka bir çalışmada, karaciğer ve bazı kan hücreleri hariç olmak üzere normal dokuların *DUSP10* ekspresyonunun düşük olduğu bulunmuştur (270,274). Öte yandan, son yıllarda kanser alanında yapılan birçok araştırma çalışması, kolon kanseri dokusunda *DUSP10* artışının, akciğer, meme, prostat ve glioblastoma gibi diğer kanser türlerine göre daha az oranda olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, DUSP10'un kanserdeki rolünü belirlemek için spesifik hastalıklarda daha basit ve klinik araştırmalar yapılması gerekecektir (269).

p38 ve JNK MAPK'lerin, çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalma gibi çeşitli hücre işlemlerine nasıl dahil edildiği iyi bilinmektedir. Bu sinyalizasyonun düzenlenmesi, tümör oluşumu için çok önemlidir. Sonuç olarak, DUSP10'un bu sinyalizasyonlardaki rolü ile kanser ilerlemesinin kontrolü ve terapötik stratejiler geliştirilmesi için bu yolun düzenlenmesi çok önemlidir (188,272).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazi (Denver Instrument Company, USA)
- Laminar hava akım kabini (Steril-Vbh)
- Maestro Nanodrop (Green Bioresearch, USA)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Masaüstü mikro santrifüj (Msc Micro Centaur, UK)
- Mikropipetler -10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl- (Gilson, USA)
- PH metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Real-Time PCR Cihazı/Rotor Gene 6000 (Qiagen, Germany)
- Vorteks (Clifton Cyclone, UK)
- Karbondioksitli İnkübatör
- Propsonikatör
- UV-Görünür Bölge spektrometresi
- Otoklav (Nüve- Türkiye)
- Zeta Potansiyel Cihazı
- Su Banyosu
- İnvart Mikroskop
- Dijital Pipet
- Mikroplaka Okuyucu
- 4°C Buzdolabı
- -80° C Derin Dondurucu

3.2.Kullanılan Plastik Malzemeler

- 0,2 ml ve 2,0 ml mikro santrifüj tüpleri (Axygen)
- 0,5–10 µl, 1–200 µl, 100–1000 µl mikropipet uçları (Axygen)
- 100 µl PCR tüpleri (Qiagen)
- 15 ml ve 50 ml konik uçlu falkon tüpleri (LP's)
- 5 ml, 10 ml, 25 ml plastik pipetler (LP Italiana SPA)
- 96 kuyucuklu plaka

- 6 kuyucuklu plaka
- 25'lik flask
- 75'lik flask
- Kriyoviyaller (1.8 ml)
- Pastör pipeti
- Eldiven

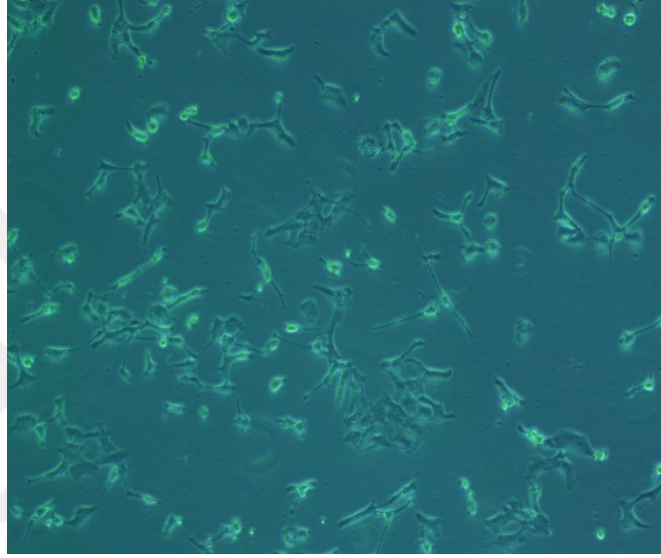
3.3.Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- Etil Alkol (Merck, Germany)
- Fosfat Tamponu (PBS) (Sigma, USA)
- RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)
- RT First standart kit (Qiagen, Germany)
- RT² qPCR Primer Assay (Qiagen, Germany)
- RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, Germany)
- DU-145 prostat kanseri hücre hattı
- MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)
- TiO₂ nanopartikülü
- PEG-maleik asit anhidrit
- Aqua koruyucu
- Ultra saf su
- DMEM
- EMEM
- Fetal sığır serumu
- Tripsin
- Penisilin

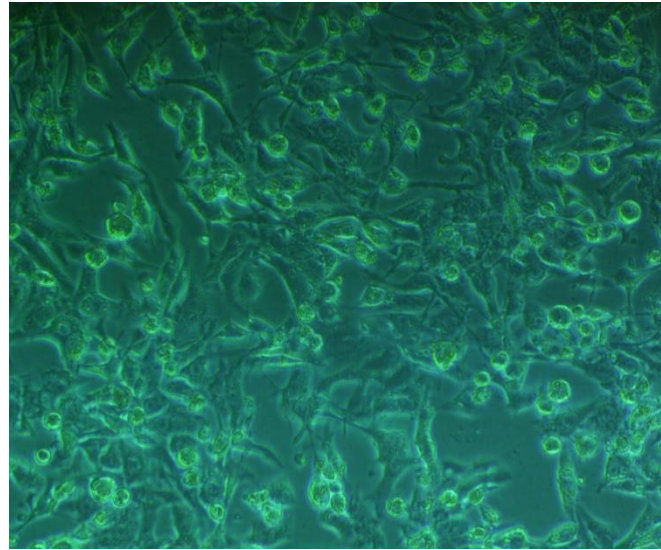
3.4.Kullanılan Hücre Hattı

3.4.1.DU145 (ATTC ® HTB-81™) prostat kanseri hücre hattı

Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hattı olan DU-145, insan prostat kanseri hücre hattıdır. DU-145, 69 yaşındaki primer prostat adenokarsinom kökenli merkezi sinir sistemi metastazı olan beyaz ırklı bir erkekten elde edilen, yüzeye tutunma özelliğine sahip, epiteliyal bir hücre hattıdır (Şekil 21, Şekil 22).



Şekil 21. Düşük yoğunluktaki DU-145 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 22. Yüksek yoğunluktaki DU-145 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (20x)

Ayrıca DU-145 hormona duyarlı değildir ve PSA ekspresyonu yoktur. DU145 hücreleri, yüksek metastatik potansiyele sahip olan PC3 hücrelerine kıyasla orta derecede metastatik potansiyele sahiptir. DU145 hücrelerinin androjen reseptörü pozitifdir.

3.5.TiO₂ nanopartiküllerinin ve PEG-TiO₂'nin sentezi

TiO₂ nanopartikülü sol jel yöntemi kullanılarak elde edildi. Bunun için 108 ml titanyum(III) fosfit (TIP), 252.5 ml isopropanol içerisine eklendi ve karışım 500 rpm de 5 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 2 ml hidroklorik asit (HCl) 25.5 ml n-propanol karışımı büret ile ekleme oranı 1ml/min olacak şekilde alkoksit çözeltisi üzerine eklendi. Bu durumda molar oran HCl//TIP 0.54 olarak ayarlandı. Karışım 30 dk karıştırıldı. Karıştırma işlemi bitiminde 25.33 ml su ve 160.3 ml isopropanol karışımı büret ile ekleme oranı 1ml/min. olacak şekilde alkoksit çözeltisi üzerine eklendi. Bu durumda molar oran H₂O/TIP 4 oldu. Karışım 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve sonunda jel ürün elde edildi. Jel, çözücü ve sudan ayrılmak üzere santrifüjlendi ve gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 400°C de 1 saat kül fırınında bekletildi. Bu işlemler sonucu da TiO₂ nanopartikülü elde edildi.

PEG-TiO₂'nin sentezinde ise öncelikle 100 mg/ml PEG-maleik asit anhidrit suda çözüldü ve pH'ı 0,1 M NaOH ile 4'e ayarlandı. Karboksil gruplarını aktive etmek için 0,8 mol/l derişiminde olan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) 0,6 ml hacimde eklendi ve solüsyon oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında 0,3 ml 0,2 M 4-amino-salisilik asit (ASA) solüsyonu eklendi ve solüsyon 40 °C'de 16 saat inkübe edildi. Tepkimeye girmeyen ASA ve diğer küçük moleküller 5 kez santrifüj işlemine tabi tutuldu ve tepkimeye giren PEGMA-ASA çözücüsünün değişimi 25 °C'de; 20 hPa 3 dakika ve 5 hPa 35 dakikada gerçekleştirildi. PEGMA-ASA'nın konsantrasyonu dimetil formamit (DMF) ile 50 mg/ml'ye ayarlandı. Asidik TiO₂ çözeltisi organik titanyum bileşiğinin hidrolize dayalı termal sentez yoluyla hazırlandı ve bu işlemin sonrasında peptizasyon yapıldı. Klorotitanyum triizopropoksidin hidrolizinden sonra nitrik asit ile peptizasyon 80 °C'de gerçekleştirildi. Tepkiyen maddenin (reaktantın) %20 'lik katı içeriği (ağırlık/hacim) 1.5 M HNO₃ ile ayarlandı. Sonrasında 30 dk 200 kHz ultrasonifikasyona tabi tutuldu ve zeta potansiyel cihazı ile partikül boyut

dağılımına bakılırdı. TiO₂ solüsyonu (0,75 ml) 10 ml DMF eklendikten sonra 5 ml 50 mg/ml PEGMA-ASA'nin içerisine eklendi ve karıştırıldı. 130 °C'de 16 saat inkübe edildi ve tepkime 600 rpm de hızlı bir şekilde karıştırılarak solüsyon elde edildi. Tepkime sona erdiğinde oda sıcaklığında soğutulan ve reaksiyona giren PEG-TiO₂ çözücüsünün değişimi 40 °C'de 5 hPa 10 dakikada gerçekleştirildi. PEG-TiO₂ sulu solüsyonunun konsantrasyonu su ile 10 mg/ml'ye ayarlandı ve PEG-TiO₂ sulu solüsyonu 5 kere santrifüj edilerek tekrar zeta potansiyel değerine bakıldı.

3.6.PEG-TiO₂ Nanotaşıyıcı sisteme DOX ve PTX ilaçlarının yüklenmesi

PEG-TiO₂ üzerine yüklenecek olan PTX ve DOX 0.5 mmol/L pH 8'de gece boyunca PEG-TiO₂ solüsyonları (~ 0.2 mg / mL) ile karıştırıldı. Bağlanmamış fazla PTX ve DOX 100 kDa filtreden geçirildi, ayrıldı ve yıkama işlemi tekrar edildi. Daha sonra elde edilen PEG-TiO₂-PTX ve PEG-TiO₂-DOX 4 ° C'de muhafaza edildi (275).

3.7.Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında, % 10 fetal sığır serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin ile takviye edilmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri kullanıldı. DU-145 prostat kanseri hücre hattı 37°C, % 95 nem ve % 5 CO₂' li etüvde inkübe edilerek çoğaltıldı. Çoğaltma işlemi ve sonrasında aşağıdaki adımlar izlendi (276,278).

1. % 10 DMSO ve % 90 FBS ile kriyotüpe hazırlanan, ardından -80°C' de dondurulan DU-145 prostat kanseri hücre hattı, sıcaklığı 37°C' ye ayarlanmış su banyosunda hızla çözdürülüp kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besiyeri ilave edildi.
2. Karışım 15 ml' lik santrifüj tüplerine alınıp ve 8 ml daha besiyeri ilave edilerek 300g'de 5 dk santrifüj edildi.
3. % 10 FBS (Fetal sığır serum), % 1 Penisilin-Streptomisin (PS) ve % 1 L-glutamin ile birlikte DMEM' den oluşan besiyeri karışımı hazırlandı.
4. Süpernatant uzaklaştırılıp, peletin üzerine 6 ml besiyerinden (DMEM-FBS-PS) eklenerek 25 ml' lik flaslara aktarıldı.
5. Flaskların 37°C'deki % 5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmasını müteakiben ilk gün 24 saat sonrasında, sonraki günlerde 48 saatte bir, besi ortamları yeniledi.

6. Hücreler bütün flaskın yüzeyini yoğun bir şekilde kapladığında başka flasklara pasaj yapıldı, kaplamamışsa flastaki sıvı dökülerek yüzen ölü hücreler uzaklaştırıldı. Daha sonra flaska besiyeri karışımından yaklaşık 5 ml eklenerek inkübasyona bırakıldı.
7. Pasajlama için, flaskta bulunan sıvı aspire edildi ve flasklar fosfat tamponu ile iki kez yıkandı.
8. Hücrelerin üzerine 1 ml tripsin ilave edilip flasklar 5-10 dakika inkübatörde beklendi.
9. İnkübatörden alınan flasklar mikroskopla incelenip, tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrolü yapıldı.
10. Hücreler kalktıktan sonra eklenen tripsinin aynı hacminde besiyeri eklenerek nötralizasyon yapıldı ve bulunan hacim 2 flaska ayrıldı.
11. Daha sonra çoğaltmak için flasklar tekrar inkübasyona bırakıldı.
12. Büyüyen DU-145 prostat kanseri hücre hattı 1×10^5 hücre/kuyu 96 oyuklu plakalara ekildi ve 24 saat boyunca kültüre edildi.

3.7.1.Hücre canlılığının belirlenmesi

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

3.7.2.Hücre sayımı

Hücre sayımı, boya dışlama metoduna göre tripan mavisi boya kullanılarak yapıldı. (278). Canlı hücrelerin membran yapısının korunduğu bu yöntemde tripan mavisi hücre içerisine giremezken, membran yapısının bozulduğu ölü hücrelerde boya hücre içine geçer ve hücreler mavi renge boyanır. Hücreler, hücre sayımı için tasarlanmış Thoma lamına damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak mikroskop altında tek tek sayım yapıldı.

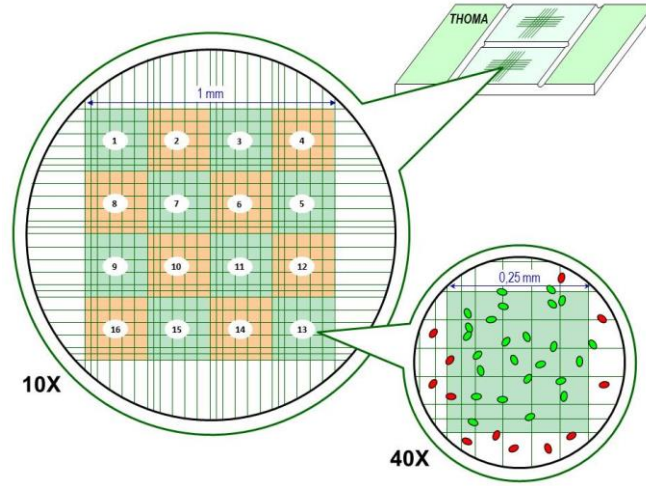
1. Hücreler inkübatörden çıkarıldı, tripsinizasyon işlemi ile hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandı ve eklenen tripsin miktarına uygun besiyeri ilave edilerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirildi. Çok az miktarı 1.5 ml'lik bir ependorfa alındı.
2. Elde edilen hücre süspansiyonun yoğunluğuna bağlı olarak seyreltme işlemi yapıldı. Ependorftan 50 µl hücre süspansiyonu ayrı bir 1.5 ml'lik ependorfa alındı, üzerine aynı hacimde (eşit hacimde olmalı 50 µl) tripan mavisi'nden (%0.4) ilave edilerek homojen hale gelecek şekilde pipetaj yapıldı.
3. 10 µl hücre/trippan mavi karışımı pipetle çekildi ve Thoma lamının tam ortasına damlatıldı. Thoma lamının üzeri hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel ile kapatıldı.
4. Mikroskoba yerleştirilen Thoma lamının sayım çizgileri 40x mikroskop ayarında bulundu. Şekil 23'te gösterildiği gibi, sadece merkezde çizgilerin keşiştiği 1 mm² 'lik alandaki 16 karenin içindeki maviye boyanmamış canlı hücreler sayıldı (Ölü hücrelerin her tarafı mavidir). Bu işlem 5 defa yapıldı ve ortalaması alındı.
5. Aşağıdaki formüle göre 1 ml'deki canlı hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı (hücre/ml)} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times 2 \times 10^5$$

Ortalama hücre sayısı: 5 defa 1 mm² 'lik alandaki 16 kare sayıldıktan sonra, toplam hücre sayısının 5'e bölünmesiyle elde edilir.

10⁵ : her 1 mm² alan hacim olarak 0.1 mm³ 'e, bu da 10⁻⁵ ml'ye eşit olduğu için, ml'deki hücre sayısını bulmak için 10⁵ ile çarpılır.

2: Alınan örnek hacmine eşit miktarda tripan mavisi konulduğu için 2 kat seyrelir, bu yüzden 2 ile çarpılır. Sayım için alınan örnek seyreltiliyse, bulunan sonuç en son seyreltme faktörü ile çarpılır.



Şekil 23. Thoma lamının mikroskop görüntüsü

3.8. Sitotoksikite Deneyleri

3.8.1.MTT testi

Araştırmanın ilk aşamasında; TiO_2 , PEG- TiO_2 , PEG- TiO_2 -DOX, PEG- TiO_2 -PTX, DOX ve PTX'in DU-145 prostat kanseri hücre hattına karşı sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi planlandı. Bu amaçla TiO_2 , PEG- TiO_2 , PEG- TiO_2 -DOX, PEG- TiO_2 -PTX, DOX ve PTX'in bu hücre hatları üzerine anti-kanser aktiviteleri (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) kullanılarak belirlendi. Öncelikle belirli yoğunluktaki hücreler, 96'lık plakalara ekildi. Ardından yukarıda belirtilen ilaçlar 0,5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralığındaki konsantrasyonlarda hücrelere 1 μL hacimde uygulandı. Hücreler bu ilaçlara, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere inkübasyona maruz bırakıldı. Bu süreler sonunda MTT ölçümü yapıldı. Bunun için kısaca, her bir oyuğa 10 μL MTT (5 mg/ mL) belirteci eklendi ve 2 saat süre ile 37°C 'de %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi. Besiyeri ve MTT aspire edildikten sonra formazan kristallerini çözmek için DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanıldı. 100 μL DMSO eklenerek 15 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde inkübe edildi ve 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Absorbans, bir mikropłaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Her bir örnek için bu ölçümler 3 tekrarlı yapıldı ve en az üç farklı pasaj numarasında tekrarlandı. Daha sonra, IC_{50} değerleri (inhibe edici konsantrasyon; hücre büyümesinin

%50' sini inhibe eden bir bileşik konsantrasyonu) hesaplandı ve işlemde geçirilmeyen kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] deneyi, daha önce bazı modifikasyonlarla tarif edilen mitokondriyal fonksiyonu araştırmak için kullanıldı. Sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesi için en sık kullanılan yöntemlerden birisi olan MTT, suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup çözeltisi sarımtırak renklidir. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT, çözünmeyen mor renkli formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrieleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri belirlemektedir. Oluşan bu formazan dimetil sülfoksit, izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk spektrofotometrik olarak okunup miktar tayini yapılır (276,277).

3.9.Hücrelerden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, katalog numarası 74104 olan RNeasy (Qiagen) mini izolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda yapıldı. Çalışmaya başlamadan önce bazı ön hazırlıklar yapıldı. İlk olarak 1 ml RLT tamponu içerisine 10 µl β-merkaptöetanol eklendi (alternatif olarak 2 M 20 µl dithiothreitolde eklenebilir). İkinci olarak RPE tamponuna % 96'lık etanolden 4 hacim eklendi. Daha sonra DNase I stok solüsyonu hazırlandı.

- 1) Hücreler üzerine yaklaşık 600 µl RLT tamponu eklenerek homejenizasyon işlemi ile hücreler lizat haline getirildi.
- 2) Lizat üzerine %70' lik etanolden bir hacim eklendi ve pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. Elde edilen lizat 3 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant kısım bir pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde ayrıldı.
- 3) Örnekten 700 µl alındı 2 ml toplama tüpü içerisinde bulunan RNeasy mini spin kolona dikkatli bir şekilde aktarıldı. Sonra 8000xg' de 15 saniye kadar santrifüj edildi.
- 4) RNeasy mini spin kolona 700 µl RW1 tamponu eklendi ve 8000xg' de 15 saniye kadar santrifüj edildi.

5) RNeasy mini spin kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 8000xg' de 15 saniye santrifüj edildi.

6) Yine RNeasy mini spin kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 8000xg' de 2 dakika santrifüj edildi. İsteğe bağlı olarak RNeasy mini spin kolon 2 ml' lik yeni bir tüpe alındı. Membranı kurutmak için 1 dakika tekrar santrifüj yapıldı.

7) RNeasy mini spin kolon yeni bir 1,5ml' lik yeni bir toplama tüpüne alındı. Kolon membranına direk olarak 30–50 µl RNeasy-free su eklendi. Toplama tüpünün kapakları kapatılarak 8000xg' de 1 dakika santrifüj edildi.

8) Elde edilen RNA' lar, nanodrop cihazı (Green Bioreserch, USA) ile kantitatif olarak ölçüldü. RNA' lar ya hemen kullanıldı ya da daha sonra kullanılmak üzere -80°C' ye kaldırıldı.

3.10.cDNA Sentezi

cDNA sentezi için RT2 First Strand cDNA Sentez Kiti (Qiagen, kat. no: 330404) kullanıldı (Tablo 5).

Tablo 5. cDNA sentez kitinin içeriği

Madde	Hacim
GE tampon	50µl
BC3 tampon	100µl
RE3 Reverse transkriptaz	50µl
Kontrol P2	25µl
Nükleaz free su	1ml

cDNA sentez protokolü:

1) RT2 First Strand cDNA sentez kiti çözündükten sonra 15 saniye kadar santrifüj edildi.

2) Her bir RNA örneğinden cDNA sentezi Tablo 6'ya göre gerçekleştirildi.

Tablo 6. Genomik DNA eliminasyon karışımı

Madde	Hacim
RNA	25ng – 5µg
GE tampon	2µl
Nükleaz free su	Uygun miktar
Toplam hacim	10µl

3) Genomik DNA eliminasyon karışımı 42°C’ de 5 dakika inkübe edildi. Sonra buz üzerinde 1 dakika bekletildi.

4) Reverse transkriptaz karışımı Tablo 7’ye göre hazırlandı.

Tablo 7. Reverse Transkriptaz karışımı

Madde	1 Reaksiyon	6 Reaksiyon	24 Reaksiyon
	Hacmi	Hacmi	Hacmi
5xBC3 Tampon	4µl	24µl	96µl
P2 Kontrol	1µl	6µl	24µl
RE3 Reverse Transkriptaz	2µl	12µl	48µl
Nükleaz free su	3µl	18µl	72µl
Toplam hacim	10µl	60µl	240µl

5) 10µl genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her tüpe 10 µl reverse transkriptaz karışımı eklendi. Elde edilen karışım dikkatli bir şekilde alt üst edilerek karıştırıldı.

6) mRNA analizi için qPCR protokolü

- 42°C’ de 15 dakika ilk inkübasyon

- 95°C’ de 5 dakika ikinci inkübasyon yapıp reaksiyon durduruldu.

7) Her bir reaksiyon tüpüne 91 µl RNase-free su eklendi. Bir kaç saniye pipetle alt üst edilerek örnekler karıştırıldı.

8) Reaksiyon tüpleri buz üzerine yerleştirildi ve RT-PCR analiz hazırlıkları yapıldı.

3.11. Real Time PCR (RT-PCR)

RT-PCR analizi RT² SYBR Green qPCR Mastermix kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Mastermix tüplerinde oluşabilecek çökelti için 42°C’de 1 dakika bekletilip vortekslendi. Çalışmada, 25 µl qPCR karışımı 1 µl dilüe cDNA içerecek şekilde hazırlandı. Deneylerde tüm cDNA örnekleri aynı şartlarda 3’er kez çalışıldı. Bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Çalışmada housekeeping gen(GAPDH), kontrol ve çalışma grubu arasındaki ekspresyon düzeyi farklılıklarını belirlemek amacıyla iç kontrol olarak kullanıldı (Tablo 8).

Tablo 8. RT-PCR koşulları

Madde	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5µl
cDNA	1µl
RT ² qPCR primer	1µl
RNase free su	10,5µl
Toplam Hacim	25µl

Real Time-PCR reaksiyonu Rototor Gene 6000 marka cihazda Tablo 9’da verilen döngü programı uygulanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 9. Döngü koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	10 dakika ¹	1
95°C	15saniye	40
60°C	1dakika ²	40

¹HotStart DNA polimerazın aktivasyonu

²Her döngünün uzama basamağında her bir örnek için SYBR Green floresans belirlenmesi ve kaydedilmesi.

3.12.Primerler

SYBR Green, gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA’ ya bağlanarak floresan özellik kazanan bir boyadır. Bu boyanın çift zincirli PCR

ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak floresans açığa çıkmasını sağlar. SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gereklidir. Çalışmamızda kullanılan primerler Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. RT-PCR yönteminde kullanılan primerler, firma ve katalog numaraları

Primerler	Katalog Numarası	Firma
DUSP1	QT00036638	Qiagen
DUSP2	QT00199794	Qiagen
DUSP4	QT00067018	Qiagen
DUSP6	QT00209986	Qiagen
DUSP10	QT00082117	Qiagen
GAPDH	PPH00150F	Qiagen

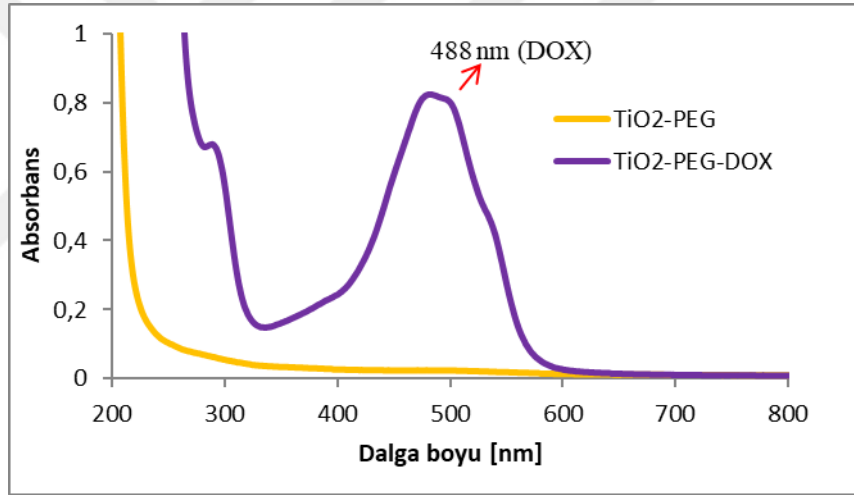
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sitotoksite çalışması için; tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama \pm standart hata ortalaması olarak ifade edildi. Veriler, tek yönlü varyans analizi kullanılarak analiz edildi. IC_{50} , istatistiksel yazılım GraphPad Prism7 (GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) tarafından belirlendi. Gen ekspresyon deneylerine ait tüm RT-PCR analiz sonuçları, Rotor-gene 6000 Series Software Version 1.7 yazılımı ile kantite edildi. Verilerin $\Delta\Delta CT$ metodu ile istatistiksel analizi "RT² profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5" (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

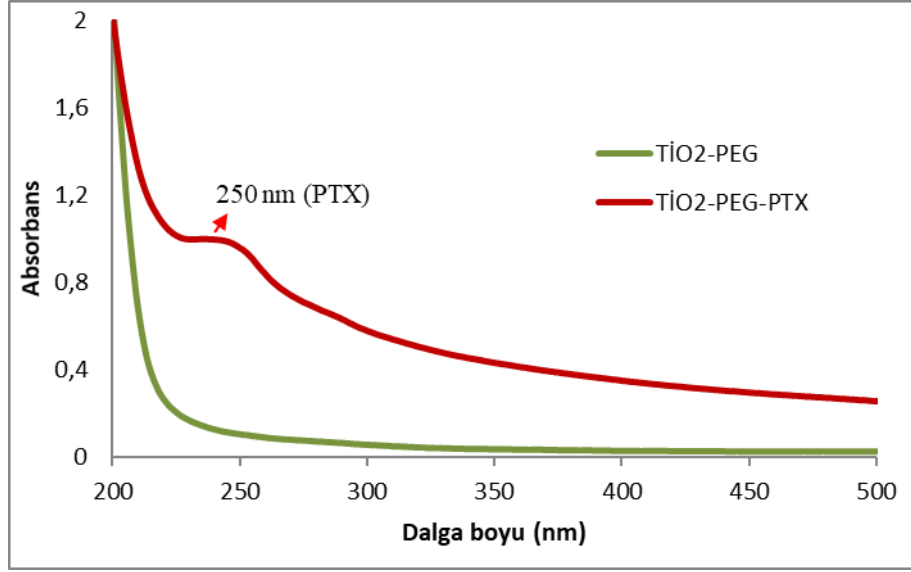
5.1.PEG-TiO₂, PEG-TiO₂-DOX ve PEG-TiO₂-PTX Sentezi ve Karakterizasyon Analizi

Sentez işleminde ilk olarak TiO₂ nanoparçacıkları elde edildi, daha sonra kararlılıklarını ve biyoyumluluklarını arttırmak için TiO₂ NP'leri PEG ile modifiye edildi. PEG-TiO₂-DOX nanotaşıyıcı temelli ilaçları sentezlemek amacıyla PEG-TiO₂ NP'lerine DOX eklendi. DOX'in PEG-TiO₂ NP'lerine başarıyla yüklenip yüklenmediğini belirlemek için UV spektrum analizi yapıldı. Şekil 24'de görüldüğü gibi, DOX'un karakteristik pik değeri 488 nm'dedir. Şekil ayrıca açıkça göstermektedir ki, 488 nm'de bulunan pik DOX, PEG-TiO₂ yüzeyine adsorbe edilmiştir.



Şekil 24. PEG-TiO₂ ve PEG-TiO₂-DOX nanopartiküllerinin UV-Görünür bölge absorpsiyon grafiği

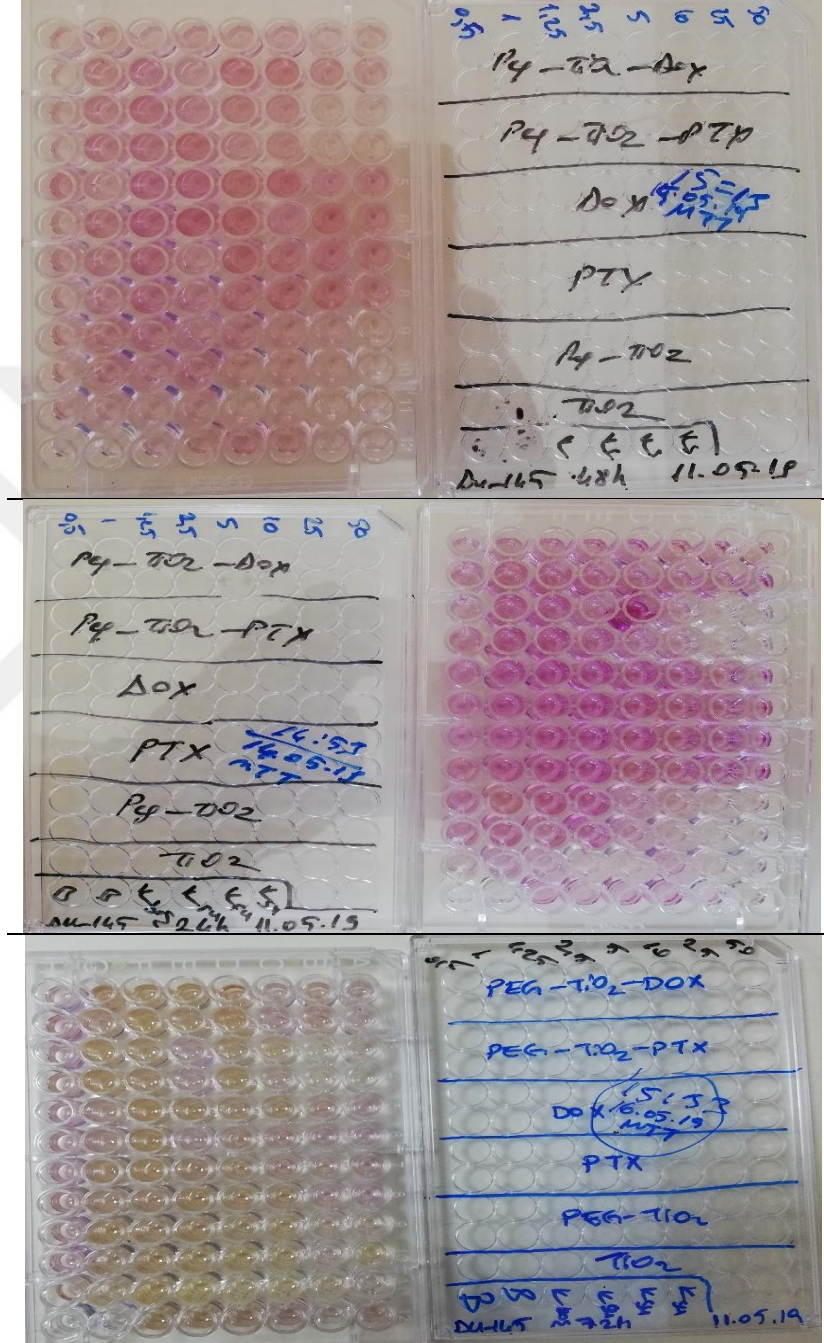
PTX'in PEG-TiO₂ nanotaşıyıcı sisteme başarıyla yüklenmesi ise aynı şekilde UV-görünür spektrum analizi ile doğrulandı. Şekil 25'da gösterildiği gibi, PTX'in karakteristik pik değeri yaklaşık 250 nm'de bulundu. Bu sonuçlar, PTX'in PEG-TiO₂ nanotaşıyıcı sisteme başarılı bir şekilde yüklendiğini gösterdi.



Şekil 25. PEG-TiO₂ ve PEG-TiO₂-PTX nanopartiküllerinin UV-Görünür bölge absorpsiyon grafiği

5.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

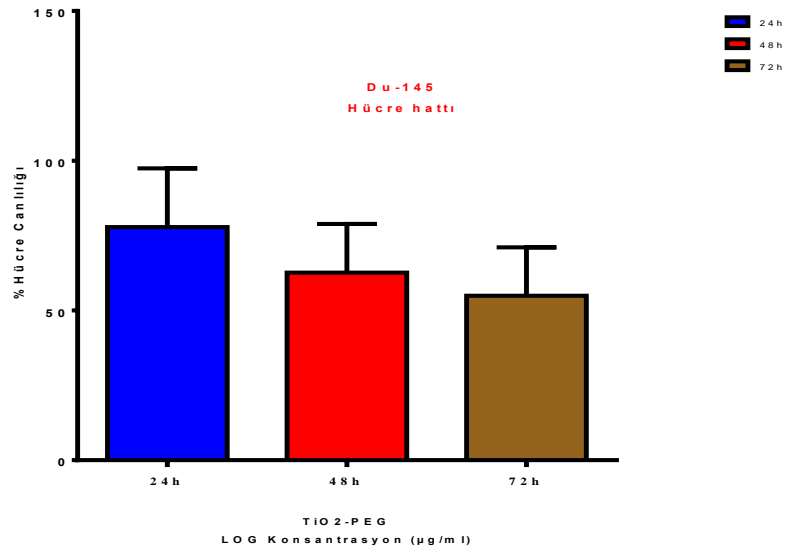
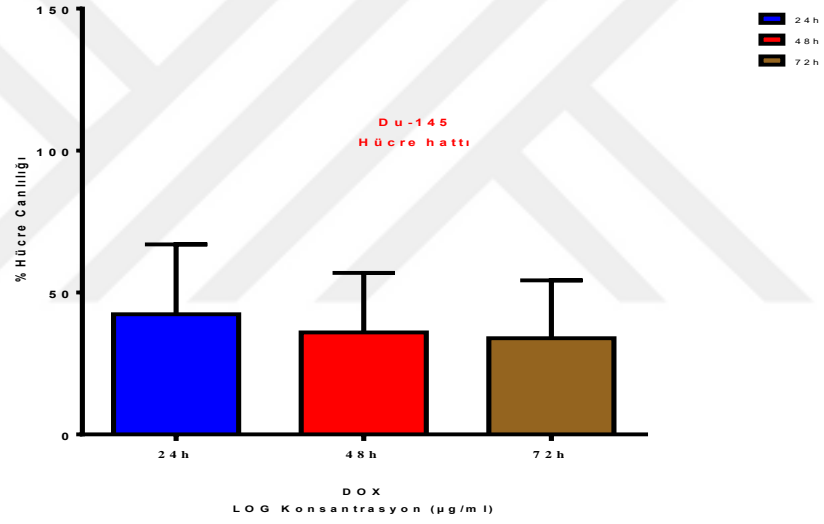
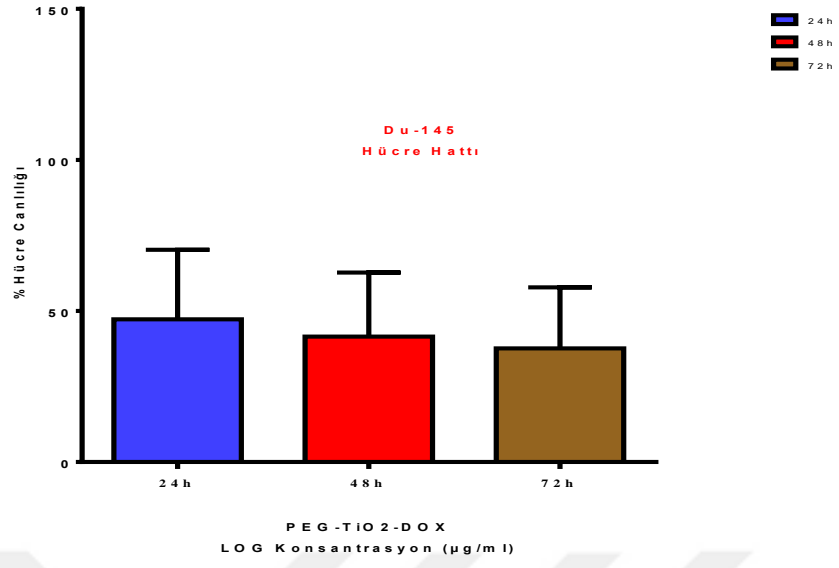
DU-145 hücre hattına uygulanan PEG-TiO₂-DOX, PEG- TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX'in sitotoksik dozu MTT testi ile belirlendi (Şekil 26).

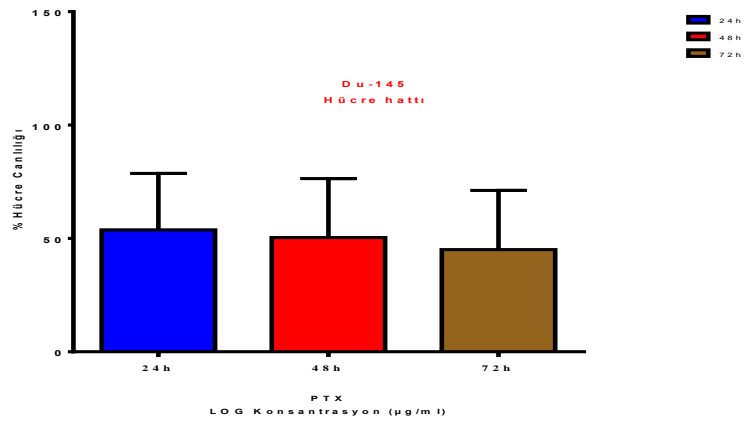
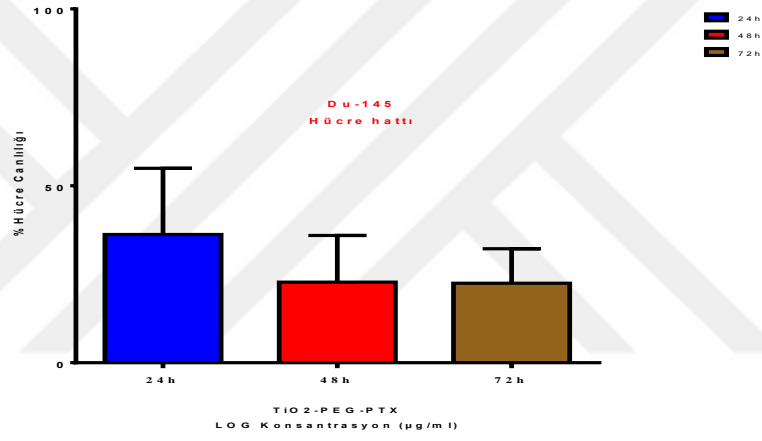
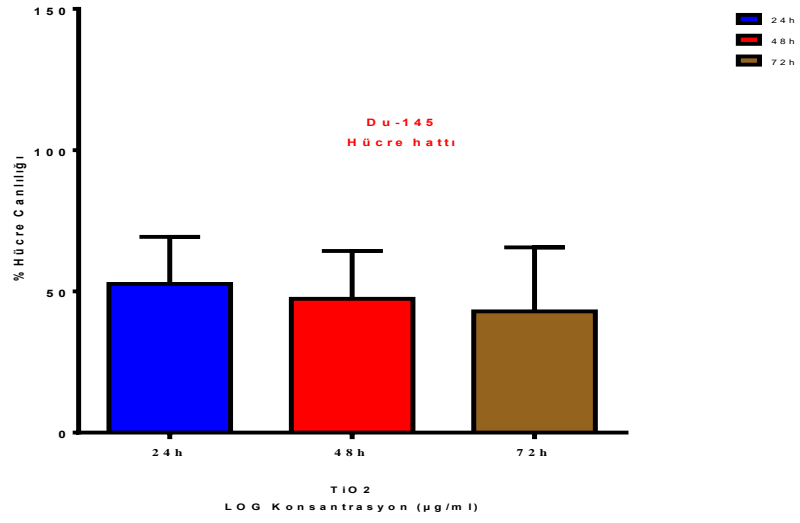


Şekil 26. DU-145 Prostat kanseri hücre hattında PEG-TiO₂-DOX, PEG- TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX'in IC₅₀ dozlarının belirlenmesi (MTT Testi)

5.3.PEG-TiO₂ Nanotaşıyıcı temelli DOX ve PTX ilaçlarının Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi

Prostat kanseri hücre hattı (DU-145) üzerine, PEG-TiO₂-DOX, PEG- TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX'in 0,5-50 µg/ml aralığındaki derişimleri uygulandı. Her biri 24, 48, 72 saat inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda yaşayan hücre sayısı MTT deneyi ile analiz edildi. Analiz sonuçları boş kontrol ve su kontrol grubuna dahil olan hücreler ile kıyaslama yapılarak elde edildi. Elde edilen bulgulara göre; prostat kanseri hücre hattına (DU-145) uygulanan PEG-TiO₂-DOX, PEG- TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX'in sitotoksik aktivitesi değerlendirildi. Bu durumda PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX'in DU-145 üzerindeki sitotoksitesinin kontrol grubundaki hücrelere nazaran en aktif 72 saat inkübasyonda olduğu saptandı. İlaç bağılı nanotaşıyıcı sistem dahilinde olan PEG-TiO₂-DOX ve PEG-TiO₂-PTX'in sitotoksik aktivitesinin 24, 48, 72 saatte DOX ve PTX ilaçlarına göre daha aktif olduğu bulundu. DOX ve PTX kendi aralarında değerlendirildiğinde ise PTX'in 24 saatteki sitotoksik aktivitesinin DOX'a göre yüksek olduğu gözlemlendi. Ayrıca PEG-TiO₂'in diğerlerine kıyasla en düşük sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Aynı zamanda TiO₂ nanopartikülünün hücreler üzerindeki toksik etkisinin PEG-TiO₂'ye nazaran yüksek olduğu değerlendirildi. Buna göre ilaç bağılı nanotaşıyıcı sistemlerin sadece ilaç tedavisine göre daha etkili olduğu ve kanser terapisi için umut verici olduğu kanısına varıldı (Şekil 27) (Tablo 11).





Şekil 27. DU-145 hücre hattında 24 saat, 48 saat ve 72 saat 0,5-50 µg/ml doz aralıklarında PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX'in uygulamasının hücre canlılığına etkisi

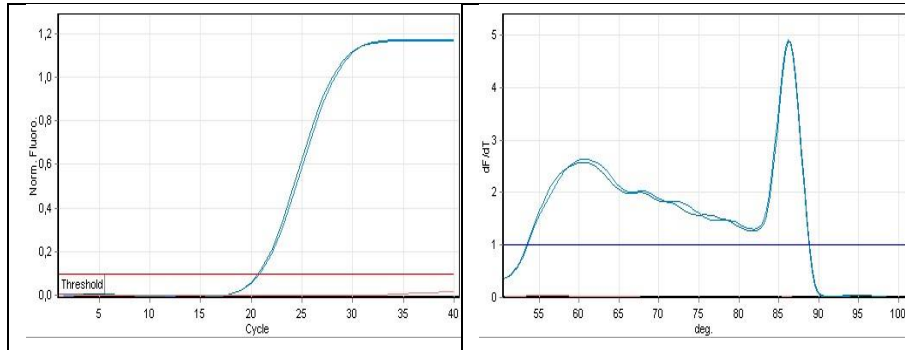
Tablo 11. PEG-TiO₂- DOX, PEG- TiO₂- PTX, PEG-TiO₂, TiO₂, DOX ve PTX'in 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonrası DU-145 prostat kanseri hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değerleri

	IC ₅₀ (µg/ml±SD*)		
	24h	48h	72h
PEG-TiO ₂ - DOX	5,87±0,89	2,42±1,07	1,94±0,33
PEG- TiO ₂ - PTX	3,10±1,03	1,72±1,06	0,53±0,11
PEG-TiO ₂	≥50,00	33,92±2,43	13,62±3,31
TiO ₂	11,68±0,69	4,99±1,08	1,12±0,16
DOX	7,24±0,39	3,48±1,28	1,15±2,11
PTX	4,61±0,59	3,32±0,44	2,42±0,28

5.4.Real Time-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi

5.4.1.Genlerin ekspresyon düzeyleri

DU-145 prostat kanseri hücre hatlarına uygulanan ilaçların 48 saat inkübasyonu sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *DUSP* genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR metoduyla analiz edilmiştir. Bu çalışmada housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. GAPDH ile çalışma genlerinin ekspresyon düzeyleri normalize edilmiştir. Real Time-PCR reaksiyonu sonucunda GAPDH için örnek olarak spesifik amplifikasyon eğrisi ve erime eğrileri aşağıdaki Şekil 28'da verilmiştir.



Şekil 28. GAPDH geninin amplifikasyon eğrisi ve erime eğrisi

No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
6	■	Boş K-DU145-GAPDH	Unknown	20,89			
7	■	Su K-DU145-GAPDH	Unknown	20,75			

DU145 prostat kanseri hücre hattından elde edilen boş kontrol, TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, PTX, PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX örneklerinin uygulanması sonrası RNA izolasyonu yapıldı. Sonra RNA örneklerinden elde edilen cDNA örneklerinde *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP10* genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz grupları aşağıdaki tabloda sınıflandırılmıştır (Tablo 12).

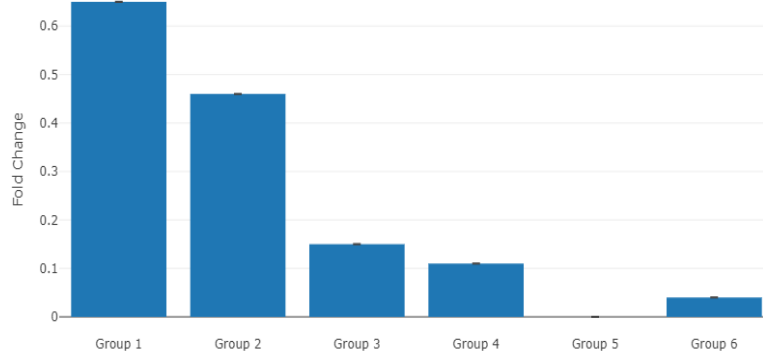
Tablo 12. *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP10* genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde grupların sınıflandırılması

Kontrol	Grup Kontrol
TiO ₂	Grup1
PEG-TiO ₂	Grup2
DOX	Grup3
PTX	Grup4
PEG-TiO ₂ -DOX	Grup5
PEG-TiO ₂ -PTX	Grup6

5.4.2.Çift özgülüklü fosfataz geninin (*DUSP1*) ekspresyon düzeyi

DU-145 prostat kanseri hücre hatlarına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, PTX, PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX'in IC₅₀ dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *DUSP1* geni ekspresyon düzeyleri RT-PCR metoduyla analiz edilmiştir. *DUSP1* geni ekspresyon düzeyleri, DU-145 kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde sırasıyla 1.54, 2.19, 6.77, 9.25, 143.15 ve 26.17

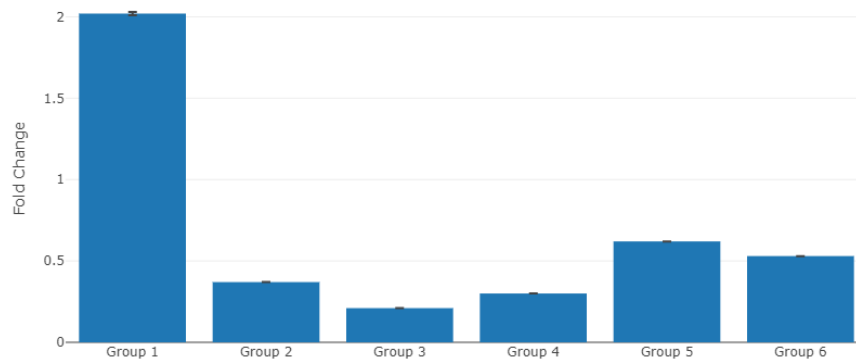
kat azalma izlendi. Sonuçlara bakıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (* $p < 0,0001$) (Şekil 29).



Şekil 29. *DUSP1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.4.3.Çift özgülüklü fosfataz geninin (*DUSP2*) ekspresyon düzeyi

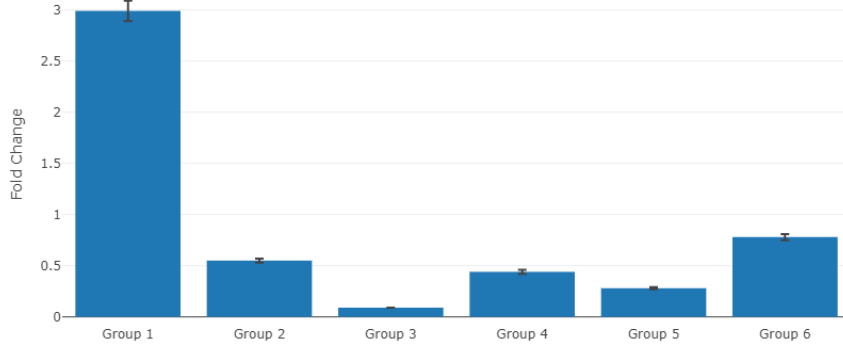
DU-145 prostat kanseri hücre hatlarına TiO_2 , PEG- TiO_2 , DOX, PTX, PEG- TiO_2 -DOX, PEG- TiO_2 -PTX'in IC_{50} dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *DUSP2* geni ekspresyon düzeyleri RT-PCR metoduyla analiz edilmiştir. *DUSP2* geni ekspresyon düzeyleri, DU-145 kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde sırasıyla grup1 de 2.02 kat artış diğer gruplarda ise 2.69, 4.85, 3.38, 1.62ve 1.90 kat azalma izlendi. Sonuçlara bakıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (* $p < 0,0001$) (Şekil 30).



Şekil 30. *DUSP2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.4.4.Çift özgülüklü fosfataz geninin (*DUSP4*) ekspresyon düzeyi

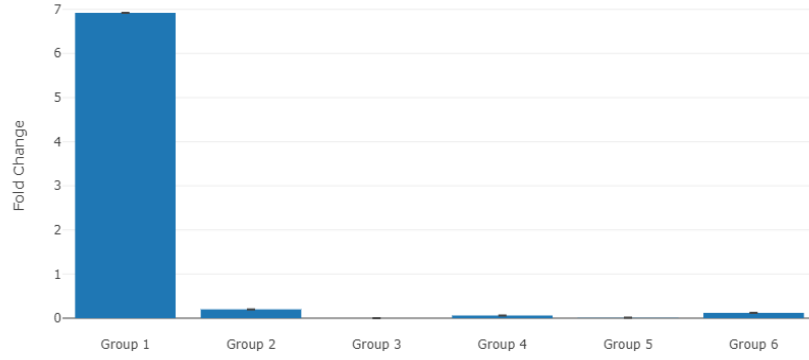
DU-145 prostat kanseri hücre hatlarına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, PTX, PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX'in IC₅₀ dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *DUSP4* geni ekspresyon düzeyleri RT-PCR metoduyla analiz edilmiştir. *DUSP4* geni ekspresyon düzeyleri, DU-145 kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde sırasıyla grup1 de 2.99 kat artış diğer gruplarda 1.82, 11.24, 2.28, 3.61 ve 1.28 kat azalma izlendi. Sonuçlara bakıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (* $p < 0,0001$) (Şekil 31).



Şekil 31. *DUSP4* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.4.5.Çift özgülüklü fosfataz geninin (*DUSP6*) ekspresyon düzeyi

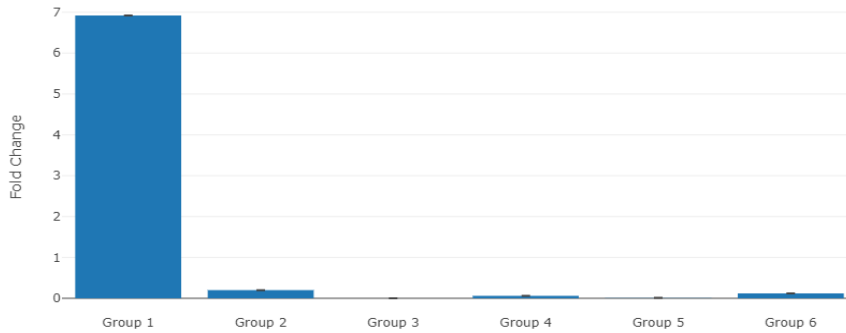
DU-145 prostat kanseri hücre hatlarına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, PTX, PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX'in IC₅₀ dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *DUSP6* geni ekspresyon düzeyleri RT-PCR metoduyla analiz edilmiştir. *DUSP6* geni ekspresyon düzeyleri, DU-145 kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde sırasıyla grup1 de 6.92 kat artış diğer gruplarda 5.10, 935.76, 16.11, 117.78 ve 8.34 kat azalma izlendi. Sonuçlara bakıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (* $p < 0,0001$) (Şekil 32).



Şekil 32. *DUSP6* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

5.4.6.Çift özgülüklü fosfataz geninin (*DUSP10*) ekspresyon düzeyi

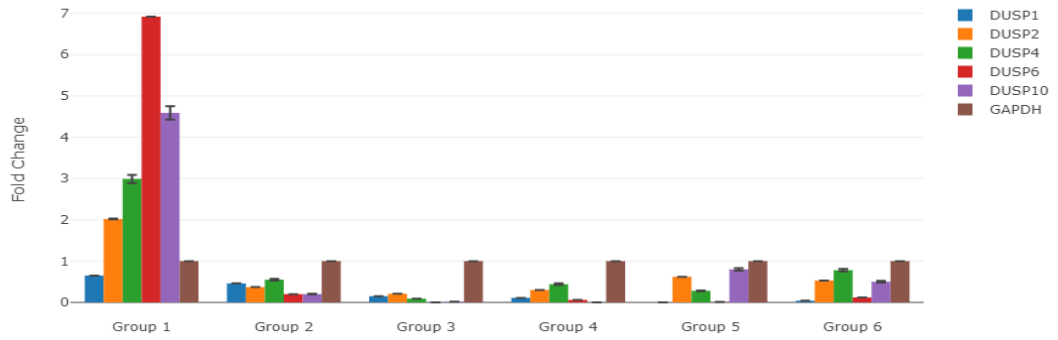
DU-145 prostat kanseri hücre hatlarına TiO₂, PEG-TiO₂, DOX, PTX, PEG-TiO₂-DOX, PEG-TiO₂-PTX'in IC₅₀ dozları uygulandıktan 48 saat inkübasyon sonrası izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak *DUSP10* geni ekspresyon düzeyleri RT-PCR metoduyla analiz edilmiştir. *DUSP10* geni ekspresyon düzeyleri, DU-145 kanser hücre hattında gruplar yönünden incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer grupların ekspresyon düzeyinde sırasıyla grup1 de 4.59 kat artış diğer gruplarda 4.92, 50.56, 407.31, 1.25 ve 2.01 kat azalma izlendi. Sonuçlara bakıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (**p*<0,0001) (Şekil 33).



Şekil 33. *DUSP10* genlerinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması

DUSP1, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubu ve diğer gruplar arasında kıyaslandığında tüm grupların *DUSP1* gen ekspresyon düzeyi azalmıştır. *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* genlerinin ekspresyon

düzeyleri ise grup1 'de artarken diğer tüm gruplarda azalmıştır. *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* gen ekspresyon düzeyleri Du-145 kanser hücre hattında tüm gruplar yönünden incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p<0,0001$) (Şekil 34). Tüm gen ve gruplara ait CT değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 13).



Şekil 34. *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6*, *DUSP10* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Tablo 13. RT-PCR verilerinin kontrol ve test gruplarında ortalama C_t değerleri

Ortalama C_t Değerleri						
Numuneler	<i>GAPDH</i>	<i>DUSP1</i>	<i>DUSP2</i>	<i>DUSP4</i>	<i>DUSP6</i>	<i>DUSP10</i>
Boş kontrol	20,89	23,72	35,89	38,51	25,96	27,03
TiO ₂	25,01	28,46	36,97	33,19	27,29	26,9
PEG-TiO ₂	22,57	26,53	37,24	35,22	29,99	28,96
DOX	15,98	21,57	29,26	31,04	30,92	25,73
PTX	22,24	28,28	30,33	30,76	31,32	35,36
PEG-TiO ₂ -DOX	18,65	31,97	30,35	32,07	30,6	20,06
PEG-TiO ₂ -PTX	27,07	30,61	33,75	31,46	31,2	28,17

6.TARTIŞMA

Kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilen veya vücudun diğer kısımlarına yayılma potansiyeline sahip, anormal hücre büyümesi ve çoğalması ile karakterize bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, kanserin dünyadaki ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olduğu bildirilmiştir. 2012 yılında Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiştir. 2015 yılında 8,8 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir. 2018'de ise kanserin tahmin edilen 9.6 milyon ölümden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak yeni kanser vakalarının gelecek yirmi yılda % 70 oranında artması beklenmektedir. Kanser, dünyadaki her bölgede ve tüm ülkelerde, morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Aynı zamanda küresel olarak, 6 ölümden yaklaşık 1 tanesinin kanserden kaynaklandığı bilinmektedir. Kanser ölümlerinin yaklaşık % 70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmüştür. Her iki cinsiyette yapılan değerlendirmelerde, akciğer kanserinin en yaygın görülen kanser türü olduğu ve kanserden ileri gelen ölümlerin başlıca nedeni haline geldiği tespit edilmiştir. Dünya çapında her iki cinsiyette en sık görülen kanser türleri arasında sırasıyla akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanserinin yer aldığı saptanmıştır. Kanserden ileri gelen ölümlerin arasında ise en çok akciğer kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, karaciğer kanseri ve meme kanserinin olduğu bilinmektedir (Tablo 14) (2,29,279,280).

Tablo 14. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünya çapında her iki cinsiyette görülen yeni kanser vakaları

Dünya Geneline		Erkek		Kadın	
Kanser türleri	Vaka Sayısı	Kanser Türleri	Vaka Sayısı	Kanser Türleri	Vaka Sayısı
Tüm kanserler	18 078 957	Tüm kanserler	9 456 418	Tüm kanserler	8 622 539
Akciğer	2 093 876	Akciğer	1 368 524	Meme	2 088 849
Meme	2 088 849	Prostat	1 276 106	Kolorektal	823 303
Kolorektal	1 849 518	Kolorektal	1 026 215	Akciğer	725 352
Prostat	1 276 106	Mide	683 754	Serviks uteri	569 847
Mide	1 033 701	Karaciğer	596 574	Tiroid	436 344
Karaciğer	841 080	Mesane	424 282	Yumurtalık	295 414

<http://gco.iarc.fr/today/home>

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı istatistiklerine göre yaklaşık 18 milyon kanser vakasının % 52'sinin erkek , % 48'inin ise kadın olduğu tespit edilmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre erkeklerde akciğer kanserinin en sık teşhis edilen kanser olduğu ve kanser ölümünün önde gelen nedeni olduğu, bunu insidans için prostat ve kolorektal kanser, mortalite için karaciğer ve mide kanserinin izlediği bildirilmiştir. Kadınlar için yapılan değerlendirmede ise meme kanserinin en sık tanı alan kanser olduğu ve kanser ölümünün önde gelen nedeni haline geldiği, bunu insidans için kolorektal ve akciğer kanserinin izlediği belirtilmiştir. Genel olarak, istatistiksel verilere göre ilk 10 kanser türünün, yeni tanı alan kanser vakalarının ve ölümlerin % 65'inden fazlasını oluşturduğu bilinmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verilerine göre, Türkiye'de ölüm nedeni incelendiğinde; kanser tüm ölümlerin yaklaşık %20 civarını oluşturmaktadır. Kanser, 2015 yılı içerisinde Türkiye'de 49.946 erkek, 27.022 kadının ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Gırtlak, soluk borusu, bronş ve akciğerin

kötü huylu tümörü erkeklerde 20.388 kişi ile en fazla ölüme neden olurken, kadınlarda ise meme kanseri 3.853 kişi ile en yüksek sayıda ölüme neden olmuştur (2,28).

2018’de tahmini istatistiklere göre tüm yaşlardaki erkeklerde kanser türleri olarak en çok sırasıyla akciğer kanseri, mide kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri, tiroid kanseri, mide kanseri, mesane kanseri ve pankreas kanseri görülmüştür. 2018’de Türkiye’deki her iki cinsiyetteki kanser ölüm oranlarına göre ise sırasıyla akciğer kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, pankreas kanseri, meme kanseri ve prostat kanseri kaydedilmiştir. Ayrıca, aynı yılda tahmini olarak kanserden dolayı ölen erkek sayısı 74 542, ölen kadın sayısı ise 42 168 olarak tespit edilmiştir (Tablo 15) (2).

Tablo 15. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre Türkiye’de kanser için erkek ve kadınlardaki ölüm oranları (<http://gco.iarc.fr/today/home>)

Erkek		Kadın	
Kanser türleri	Ölüm sayısı	Kanser türleri	Ölüm sayısı
Tüm kanserler	74 542	Tüm kanserler	42 168
Akciğer	28 525	Meme	5 452
Mide	6 376	Akciğer	5 158
Kolorektal	5 571	Kolorektal	4 462
Prostat	5 165	Mide	3 630
Pankreas	3 622	Yumurtalık	2 191

Prostat kanseri, erkekler arasında önemli bir hastalık ve ölüm sebebidir. Prostat kanserinin küresel yükü hem insidans hem de mortalite açısından ilk beş kanser arasında yer almaktadır. 2012 yılında dünya genelinde yaklaşık 1 milyon erkeğe prostat kanseri teşhisinin konulmuştur ve erkeklerde teşhis edilen malignitelerin % 15'inin ve tahmin edilen ölüm sayısının yaklaşık 307.000 olduğu tahmin edilmiştir. Prostat kanserinin, Amerikalılar arasında en sık görülen ikinci kanser olduğu bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2015 yılında erkekler arasında tahmin edilen yaklaşık 220.800 yeni prostat kanseri vakası olduğu ve tahmin edilen ölüm sayısının yaklaşık 27.540 olduğu tahmin edilmiştir. Buna ek olarak tüm malignitelerin % 26'sının prostat kanseri olduğu bildirilmiştir. Bir erkeğin prostat kanserine

yakalanma oranının yedi kişiden biri olduğu tespit edilmiştir. 2018 verilerine göre ise global olarak yaklaşık 1.3 milyon yeni prostat kanseri vakasının meydana geldiği ve prostat kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık 359 000 olduğu tahmin edilmiştir. Ayrıca küresel olarak 2030 yılına kadar dünya nüfusunun artması ve yaşlanmasıyla birlikte prostat kanseri kaynaklı 1,7 milyon yeni vakanın ve 499,000 ölümün görülmesi beklenmektedir (2,280,281,282).

Ülkemizde 2014 verilerine göre erkeklerde prostat kanseri insidansı 100000'de 32.9'dir ve akciğer kanserinden sonra ikinci sırada görülmektedir. 2018 Globocan verilerine göre ise Türkiye'de tahmini 17 332 yeni prostat kanseri vakası görülmüştür ve prostat kanserinden dolayı ölümlerin sayısı 5 165 olarak kaydedilmiştir (2,283).

Prostat kanserinin epidemiyolojik çalışmaları, prostat kanseri gelişmesini ve bu hastalıktan sağkalımı etkileyen, kişisel biyolojik ve yaşam biçimlerini içeren birçok risk faktörünün olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bazı erkeklerde prostat kanseri agresif olmasına rağmen, diğerlerinin çoğunda yavaş ilerleyen ya da zayıf bir hastalık şekli gözlenmiştir. Buna göre, prostat kanserinin klinik olarak heterojen bir hastalık olduğu bilinmektedir. Bu klinik heterojenite, hastalığın altında yatan etiyojolojiyi yansıtmaktadır. Risk faktörleri, kanserin başlamasından metastazlara ve ölüme kadar olan hastalığın patogenezi boyunca prostat kanserini etkileyebilir. Ölümcül olan ile yavaş seyreden prostat kanseri karşılaştırıldığında birkaç risk faktörü arasındaki farkı ortaya koyabilir. Bu nedenle, bir faktör ile prostat kanseri riski arasındaki ilişki, tümör evresi veya tümör derecesi gibi hastalığın klinik özelliklerine göre farklılık gösterebilir (284,285).

Prostat kanseri risk faktörleri genel itibarıyla yaş, ırk/etnik köken ve ailede prostat kanseri öyküsü ile tanımlanmıştır. Son zamanlarda, genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında prostat kanserine genetik yatkınlığın katkısı olduğu gösterilmiştir. Etnik olarak çeşitli kökenlere sahip popülasyonlarda, 180'den fazla genetik risk lokusu doğrulanmıştır. Yaş, prostat kanserinde yüksek oranda risk faktörüdür. Yapılan istatistiksel çalışmalarla prostat kanserinin, 40 yaşından küçük erkekler arasında nadir görüldüğü ve prostat kanseri insidansının 55 yaşından sonra, diğer epitelyal kanserler ile benzer bir eğilim izleyerek çarpıcı şekilde arttığı bildirilmiştir (281,286,287,288). Ayrıca, ırk ve etnik gruplar arasında prostat kanseri insidansı ve mortalite açısından çarpıcı farklılıklar vardır. Örneğin Amerika'da siyah erkeklerin beyaz erkeklere göre

en yüksek prostat kanseri insidansına sahip olmalarıyla birlikte, bu insidans oranında 3 kat farklılık olduğu tespit edilmiştir. Prostat kanseri kaynaklı ölümlerin ise, ABD'deki beyazlara göre siyah erkekler arasında 2.4 kat daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır (289).

Bir diğer risk faktörü olan ailede prostat kanseri öyküsü, prostat kanserine yakalanmada etkili olmaktadır. İsveç Aile Kanseri Veri Tabanı'nda yapılan bir çalışmaya göre, prostat kanseri teşhisi koyulmuş baba veya kardeşe sahip erkeklerin, aile öyküsü olmayan erkeklerle karşılaştırıldığında prostat kanserine yakalanma riskinin 2 ila 3 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine benzer bir çalışmaya göre buna benzer ilişki ölümcül prostat kanseri için de gözlenmiştir. Prostat kanserinden ölen babası veya erkek kardeşi olan erkeklerin, aile öyküsü olmayan erkeklere kıyasla iki kat daha ölüm riski taşıdığı bulunmuştur (290).

Prostat kanserinde bir diğer risk faktörü olarak obezite belirlenmiştir. Obezite artmış prostat kanseri mortalitesi ve nüks riski ile ilişkilidir. Prostat kanseri olan erkeklerin teşhisi sonrası yapılan çalışmalarının meta-analizine göre, vücut kitle indeksinde (BKİ) 5 kg / m²lik bir artış, % 20 daha yüksek ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir (291). Ek olarak, boy uzunluğunun da prostat kanseri riskini artırabileceğine ve hastalık için güçlü kanıtlara neden olabileceğine dair yüksek olasılıklar vardır. Yapılan 58 çalışmanın meta-analizine göre, prostat kanserinde vücut büyüklüğünün her 10 santimetre artışında risk oranının anlamlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (292).

Prostat kanseri de dahil olmak üzere bütün kanserlerde sigara içmenin rolü halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. ABD Genel Cerrahi Kurulu tarafından yayınlanan 2014 raporunda, sigaranın prostat kanserinden ölüm riskini, ayrıca ileri evre hastalık riskini ve daha az farklılaşmış kanser riskini arttırdığı konusunda kanıtlar olduğu sonucuna varılmıştır (293). Başka büyük bir çalışmaya göre ise, prostat kanseri teşhisi konan 5366 erkek, 22 yıl boyunca prospektif olarak takip edilmiştir ve 524 prostat kanseri ölümü gözlenmiştir. Çalışmada yer alan sigara içmeyen erkeklere kıyasla, mevcut sigara içenlerde prostat kanseri ölüm riskinin % 60 daha yüksek olduğu saptanmıştır (294). Sigara içmenin prostat kanseri mortalitesini etkileyebileceği diğer bir olası mekanizma ise tedaviye yanıtın etkilenmesidir. Radyasyon, androjen yoksunluğu tedavisi ve radikal prostatektomi ile tedavi edilen prostat kanseri

hastalarında sigara içmeyenlere kıyasla sigara içenler arasında daha kötü sonuçlara ilişkin tutarlı bulgular elde edilmiştir (295-297).

Değiştirilebilen bazı risk faktörlerinin bilinmesi, prostat kanserini önlemede veya mevcut prostat kanserinin ilerlemesini azaltmada umut verici olduğu bildirilmiştir. Fakat yaş, ırk / etnik köken, aile öyküsü ve genetik değişkenler gibi belirlenmiş risk faktörlerinin değiştirilemez olması, prostat kanseri riskini artırdığı bilinmektedir. Önemli olarak, birçok yaşam tarzı değişikliğinin, prostat kanserinin agresif olma riskini düşürebildiği veya prostat kanseri hastalarına hayatta kalma faydaları sağlayabildiği kanıtları mevcuttur. Bu nedenle gelecekteki araştırmalar, hedeflenen müdahalelerle bu önleme stratejilerinin etkinliğini geliştirme potansiyeline sahiptir (298).

Mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPK'ler), fizyolojik ve patolojik süreçlerde hücrenin kilit düzenleyicileridir. Evrimsel olarak korunmuş mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) kaskadları, hücre proliferasyonu, farklılaşma, metabolizma, hayatta kalma ve apoptoz gibi çok çeşitli hücresel süreçleri koordine eder (188). Memeli türlerinde 3 ana MAPK grubu vardır. Bunlar; hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinazlar (ERK1/2), p38 MAP kinazları (α, α, γ, δ izoformları) ve c-Jun NH₂-terminal kinazlarıdır (JNK1/ 2/3). Bu MAPK yolları, MAPK kinazlarının (MAPKK'ler) Ser/Thr kalıntılarının, MAPK kinaz kinazları (MAPKKK'ler) tarafından fosforilasyonun başlamasıyla ve ek olarak büyüme faktörleri, sitokinler ve hücresel stres dahil olmak üzere çeşitli hücre uyarıcıları ile aktive edilebilir. Aktive edilmiş MAPKK'lar, komşu treonin ve tirozin tortularındaki aktivasyon ilmekleri içinde korunmuş Thr-X-Tyr (TXY) motifinde MAPK'ları fosforilasyona uğratar. X ile belirtilen amino asit, ERK'deki glutamik aside, JNK'deki proline veya p38'deki glisine karşılık gelir.

Aktive edilmiş MAPK'lar, MAPK tarafından düzenlenen genlerin transkripsiyonunu kolaylaştıran protein kinazlar ve transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek aktive edebilir. (188,299). MAPK yollarının hücresel tepkisi uyarıcının doğasına ve sinyalin süresine bağlıdır. Genel olarak, ERK yolu büyüme, farklılaşma ve gelişme ile ilgilidirken, JNK ve p38 MAPK yolları iltihaplanma, apoptoz, büyüme ve farklılaşma ile ilgilidir. Anormal MAPK sinyalleri, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde ve ayrıca kanser tedavisine yanıtların belirlenmesinde kritik bir rol oynar. ERK1/2 yolağındaki

bozukluk, hepatoselüler karsinom, mide adenokarsinom ve renal hücreli karsinom dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde gösterilmiştir. JNK ve p38 gibi stresle aktive olan MAPK'lerin kanserdeki rolü ise, karmaşıktır ve bazı durumlarda tartışmalıdır. Araştırmalara göre, fosforile edilmiş p38'in artmış seviyeleri, foliküler lenfoma, akciğer, tiroid ve meme karsinomlarında, ek olarak glioma ve baş boyun skuamöz hücreli karsinomlarda gözlenmiştir. Ayrıca p38 yolağının, p53 ve p53 aracılı apoptozun aktivasyonunda da rol oynadığı kaydedilmiştir (188). JNK yolağının ise kanserde tümör baskılayıcı fonksiyonlarının olduğu rapor edilmiştir. Buna göre JNK'nin tümör baskılayıcı fonksiyonları genellikle proapoptotik aktivitelerine bağlıdır. Ek olarak JNK'nin onkojenik fonksiyonları, aşağı yönlü hedef c-Jun'u fosforile etme ve transkripsiyon faktörü AP-1'i aktive etme yeteneklerine bağlıdır. Hepatoselüler karsinomda, JNK1 aktivitesinin artmasının, tümör hücresi proliferasyonu ve değişmiş histon H3 metilasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (300).

Çift özgülüklü fosfataz (DUSP) protein ailesi, MAPK'lerin ana negatif düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır ve MAPK fosfataz (MKP) olarak da bilinmektedir. Memeli çift özgülüklü MAPK fosfatazları (DUSP'ler), korunmuş domain yapısına sahip katalitik olarak aktif 10 enzimin alt ailesini içermektedir. Bu 10 enzim, amino asit dizisi homolojisi, hücredeki lokalizasyonu ve substrat spesifikliğine dayanarak üç alt gruba ayrılmaktadır. Bu alt gruplar indüklenebilir çekirdeksel, ERK'e spesifik sitoplazmik ve p38 ve JNK'e spesifik hem sitoplazmik hem de çekirdeksel olarak sınıflandırılmıştır. İndüklenebilir çekirdeksel grubunda dahil olan DUSP'ler, DUSP1/MKP-1, DUSP2, DUSP4/MKP-2 ve DUSP5; ERK'e spesifik sitoplazmik olan DUSP'ler, DUSP6/MKP-3, DUSP7/MKP-X ve DUSP9/MKP-4; hem sitoplazmada hem de hücre çekirdeğinde bulunup, p38 ve JNK'e spesifik olan DUSP'ler ise DUSP8, DUSP10/MKP-5 ve DUSP16/MKP-7 olarak belirlenmiştir. DUSP'lerin doğal veya adaptif immün yanıtlarda, aynı zamanda metabolik homeostazda önemli olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, normal ve kötü huylu dokularda DUSP'lerin fonksiyonlarının artmasının ya da azalmasının, kanserlerin patogeneğinde önemli olduğu vurgulanmıştır. DUSP'lerin kanser tedavisine direnç göstermesi, DUSP'leri kanser önleyici tedavi için potansiyel bir hedef haline getirerek önem kazanmıştır (200).

DUSP1, ilk olarak keşfedilen MAPK fosfatazıdır. DUSP1'in metabolik sinyal, iskelet kası fonksiyonu, inflamatuvar yanıt ve kanser gibi çeşitli fonksiyonlarda yer aldığı bilinmektedir (301-305). Buna karşılık, DUSP1'in ve MAP kinaz sinyallemesinin düzenlenmesindeki rolünün keşfedilmesinden bu yana geçen 25 yıl boyunca, çok çeşitli insan tümörlerinde DUSP1'in ekspresyonunun arttığını veya azaldığını bildiren çok sayıda yayın bulunmaktadır. DUSP1 ekspresyon seviyelerinin belirli kanserlerde tutarsızlık gösterdiği bulunmuştur. Buna bağlı olarak DUSP1'in mRNA düzeyindeki artmış seviyeleri meme kanseri (235), akciğer kanseri (236), yumurtalık kanseri (306), pankreas kanseri (307), mide kanseri (231) ve prostat kanserinde (234) kaydedilmiştir. Prostat, yumurtalık, kolon ve mide kanseri gibi çoğu kanserde ise, histolojik dereceli artışla birlikte, progresif DUSP1 kaybı tespit edilir. Yapılan çalışmalara göre DUSP1'in ekspresyon seviyesinin, kötü huylu meme kanseri dokularının normal dokularla karşılaştırılması sonucu yüksek olduğu tespit edilmiştir (235,307). Liao ve ark. yapmış olduğu çalışmada pankreas kanserindeki DUSP1 ekspresyon seviyelerini yüksek bulmuştur, ayrıca DUSP1 ekspresyonunun baskılanmasının in vivo pankreas kanseri hücrelerindeki tümörjenez baskıladığı kanıtını elde etmiştir (308). Tsujita ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre ise hepatoselüler karsinomu olan 77 hastadan cerrahi olarak dokular alınmıştır ve bu dokularda DUSP1'in immünohistokimyasal analizine göre hepatoselüler karsinomda *DUSP1* ekspresyonunda azalma kaydedilmiştir (238). Primer yumurtalık tümörlerin invazif karsinomlarının % 57.6'sında *DUSP1* ekspresyonu orta veya yüksek seviyeli olarak saptanmıştır (306). *DUSP1* ekspresyonunun, insan baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (SCC) dokularının, tümürlü olmayan bitişik kontrol dokularıyla karşılaştırılmasıyla azaldığı gözlenmiştir. Son çalışmalar, *DUSP1* eksikliği olan farelerde kanserojene yanıt olarak inflamatuvar bir mikro-ortam geliştirme yatkınlığıyla baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu oluşmasında hassasiyet gözlenmiştir. Bir başka deyişle *DUSP1*, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu oluşumunu inhibe etmek için tümör proinflamatuvar mikro-ortamındaki IL-1 β 'i azaltmıştır (239). Prostat kanseri üzerine yapılan bir çalışmaya göre ise, *DUSP1*'in prostat kanserinin erken evrelerinde aşırı eksprese edildiği ve ardından daha yüksek histolojik dereceli ve metastazlı dokuda ekspresyonun kaybı olduğu bulunmuştur (232). Prostat kanseri hücre hattında (LNCaP) androjen ablasyonuna cevap olarak

düşük seviyelerde *DUSP1* ekspresyonu gözlenmiştir, ayrıca *DUSP1*'in mRNA ekspresyonunun, LNCaP hücrelerinin androjen tedavisine cevap olarak, artacak şekilde regüle edildiği kanısına varılmıştır (309). Ek olarak başka bir çalışmada androjenden bağımsız prostat kanseri hücre hattı olan DU145'te, *DUSP1*'in ekspresyonunun, kaspaz-1 ve kaspaz-3'ün FasL (Fas ligand) kaynaklı aktivasyonunu azalttığı ve böylece hücreleri apoptozdan koruduğu bildirilmiştir (310).

DUSP1 ayrıca kanser tedavisi ve tedaviye direnç ile ilgili olarak değerlendirilmiştir. Buna bağlı olarak *DUSP1*'in bir dizi kimyasal ve fiziksel tepkileri sayesinde kanser tedavisinde önemli olduğu saptanmıştır. P38 ve JNK MAPK'lerin *DUSP1* için tercih edilen substratlar olduğu netleştikten sonra, bu fosfatazın aşırı ekspresyonunun hem UV radyasyonuna hem de kemoterapötik ilaç olan cisplatine karşı hücrel direnci arttırdığı ve JNK aracılı apoptozun baskılanmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (311,312).

Birçok başka çalışma *DUSP1*'in meme kanseri hastalarında olumsuz bir prognostik faktör olabileceğini ve kemoterapiye direnç gösterdiğini tespit etmiştir (313).

Ayrıca, *DUSP1* geni çıkarılan farelerden türetilen embriyonik fibroblastların UV radyasyonuna, cisplatin, hidrojen peroksit ve anisomisine duyarlı olduğu tespit edilmiş ve *DUSP1*'in bu gibi maruziyetlere hassasiyetin modüle edilmesinde çok önemli bir rol oynadığı doğrulanmıştır (314).

Normal hücrelerde, *DUSP1* ekspresyonu, p38 MAPK'nın aktivasyonu yoluyla UV ve cisplatin tarafından uyarılır, oysa hücre ölümünü modüle eden *DUSP1* tarafından JNK aktivitesinin baskılanmasıdır. Bu iki farklı MAPK yolu ve *DUSP1* arasındaki bağlantı hücrel duyarlılığı düzenler. Bu nedenle, tümörlerde *DUSP1*'in yüksek ekspresyonunun kemodirence aracılık etmesi muhtemeldir.

DUSP1'in aşırı ekspresyonunun gözlendiği ve cisplatin ile tedavi edilen hastaların tedaviye dirençli hale geldiği küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) çalışmaları ile desteklenir. *DUSP1*'in yapısal olarak eksprese edildiği küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hatlarında gen baskılaması ile, cisplatin hassasiyetinin 10 kat arttığı gözlenmiştir ve bu hücre hatları uygulanmış farelerde tümörlerin büyümesinin azaldığı ve sonuçta ortaya çıkan tümörlerin cisplatin duyarlılığının arttığı tespit edilmiştir (315). Akciğer kanseri hastalarında, deksametazon, tedavinin istenmeyen yan etkilerini hafifletmek için sıklıkla cisplatin ile birlikte uygulanmıştır. Bununla birlikte,

glukokortikoidlerin *DUSP1* ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur. Ayrıca, deksametazonun, *DUSP1*'in ekspresyonundaki artışa bağlı p38 protein kinazının deaktivasyonu ile akciğer adenokarsinom hücre hattında cisplatin kaynaklı apoptozu etkili bir şekilde bastırdığı kanısına varılmıştır. Ek olarak, *DUSP1* geninin etkinliğinin azaltılması ile de cisplatin kaynaklı hücre apoptozunun deksametazon tarafından inhibisyonunu tersine çevirdiği görülmüştür (316).

İnsan pankreas hücre hatları kullanılarak yapılan bir çalışmaya göre, gempitabinin, iki ana stresle aktive olan JNK ve p38 sinyalleme yolundaki anahtar kinazları aktive ettiği gösterilmiştir. Gempitabine bağlı JNK ve p38 MAPK aktivasyonunun, artan apoptozu aracılık ettiği, fakat aynı zamanda, transkripsiyonel olarak *DUSP1*'i de yükselttiği bulunmuştur. Bunun tersi olarak, siRNA aracılı *DUSP1* inhibisyonu ile, JNK ve p38 MAPK aktivasyonunun ve gempitabin kemosenitivitesinin arttığı gözlenmiştir. Gempitabine bağlı *DUSP1* ekspresyonunun artmasının, pankreas kanserinde *DUSP1*'i hedeflemenin, anjiyogenezi baskılayarak gempitabin kemosenitivitesini artırma avantajına sahip olabileceği olasılığını artırarak, stres yolları ve apoptoz üzerindeki faydalı etkilerini hafifleten bir negatif geri besleme döngüsüne katkıda bulunduğunu göstermektedir (317).

Hana Yu ve ark. *DUSP1* genini inaktif hale getirerek glioblastoma hücrelerine 10 farklı antikanser ilacı (cisplatin, siklofosfoamid, doksorubisin, epirubisin, etoposid, 5-floroürasil, gempitabin, irinotekan, mitomisin C ve vinkristin) uygulamıştır. Antikanser ilaçlara bağlı hücre ölümü, *DUSP1*'inde inaktif olmasıyla büyük ölçüde artmıştır. *DUSP1*'in inaktif olması ve ilaca bağlı olarak da JNK'nin fosforilasyonu artmıştır. Buna göre *DUSP1*'in regülasyonu, glioblastoma hücrelerini kemoterapötik ajanlar tarafından indüklenen sitotoksositeye duyarlı hale getirmiştir. JNK yolu da kemoterapötik ajanlara karşı *DUSP1* aracılı tümör direncinde rol oynamıştır (318).

DUSP1 ekspresyonu, cisplatin ile tedavi edilmiş safra kesesi kanseri hücre hattında sağlıklı hücre hattına göre (SGC996) belirgin şekilde artmıştır. *DUSP1* indüksiyonunu daha fazla doğrulamak için deri altı ksenograft safra kesesi kanseri olan fare modelleri, normal SGC996 hücrelerinin farelere nakledilmesiyle üretilmiştir. *DUSP1* seviyeleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında cisplatin ile tedavi edilen grupta artmıştır. Buna göre *DUSP1*'in ekspresyonunun yüksek olması, safra kesesi kanserinde artmış kemodirenç ile sonuçlanmıştır (319).

Montagut ve ark. yaptıkları çalışmada, setuksimab adlı kemoterapik ilaç ile tedavi edilen 48 metastatik kolorektal karsinoma hastasının tümör örneklerini immünohistokimya ile değerlendirdiğinde *DUSP1* ekspresyonunun yüksek olduğunu ve bunun kemodirençle ilgili olduğunu belirtmiştir (320). Ayrıca hepatoselüler karsinom hücre hatlarında, *DUSP1* geninin baskılanması ile kemoterapinin kombine edilmesi, tek başına kemoterapi uygulamasının aksine daha yüksek etkinlikle sonuçlanmasını sağlamıştır. Kemoterapötik ajan olan cisplatinin yumurtalık kanseri hücre hatlarında *DUSP1*'i indüklediği ve bunun ERK'ye bağlı bir yolla gerçekleştiği gösterilmiştir. Çalışmalar, ERK'nin *DUSP1*'i fosforile edebildiğini belirtmiştir, bunun da protein stabilizasyonu ve ubikuitin aracılı bozulmaya karşı dirençle alakalı olduğu bulunmuştur. *DUSP1*'in aşırı ekspresyonunun meme kanseri hücrelerini, doksorubisin, miklorethamin ve paklitaksel ilaçları tarafından tetiklenen apoptozdan koruduğu kaydedilmiştir. Buna göre, *DUSP1*'in, JNK yolunu inhibe ederek bu kemoterapötik ajanlara karşı direnç kazandırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, *DUSP1*'in MAPK yollarını düzenleyerek kemoterapiye direncin aracılık ettiği kanıtını sunmaktadır. Bununla birlikte, *DUSP1* tarafından kemo-direnç kazandırmak için düzenlenen spesifik MAPK yolu, hücre/doku tipine ve kullanılan kemoterapötik maddeye bağlı görünmektedir. Genel olarak, bu bulgular *DUSP1*'in kanser gelişiminde kritik bir rol oynayabileceğini, kanser hastalarının hayatta kalmasını öngörmede yararlı bir belirteç olabileceğini ve tedavi sonuçlarının belirlenmesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir (313).

DUSP2, başlangıçta hematopoetik hücrelerden klonlanmıştır. Bu nedenle, *DUSP2* çalışmaları başlangıçta bağışıklık sistemindeki role odaklanmıştır. Son yıllarda, *DUSP2*'nin insan kanserinin patolojik süreçlerindeki rolü araştırmacılar için büyük ilgi görmüştür. İlk olarak, *DUSP2*, Erk sinyalleşme yolunun etkisizleştirilmesinde belirgin bir rolü olan hematopoetik dokuda maksimal olarak eksprese edilen bir protein tirozin fosfataz olarak tanımlanmıştır. Çalışmalar Erk kaskadı aktivasyonunun *DUSP2*'nin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, *DUSP2*'nin ekspresyonu, insan akut lösemilerinde beklenmedik bir şekilde azalmıştır ve bu da Erk aktivasyonunun aşırı baskılanması ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur (245). *DUSP2*'nin mRNA ve protein düzeyleri, meme, kolon, akciğer, yumurtalık, böbrek ve prostat kanserinde önemli ölçüde azalmıştır. *DUSP2*'nin baskılanmasının, tümörjenez

ve malignite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. *DUSP2*'nin ekspresyonu, kanser hücrelerinde HIF-1 α tarafından inhibe edildikten sonra artmıştır. *DUSP2*'nin hipoksik hücrelerde Erk fosforilasyonunun negatif regülasyonu olarak kilit çekirdeksel bir DUSP olduğunu göstermektedir. Ek olarak, hipoksinin inhibe ettiği *DUSP2* ekspresyonunun birincil olarak çoklu kanser hücresi tiplerinde HIF-la tarafından kontrol edildiği, böylece uzun süreli Erk fosforilasyonunun sağlandığı gösterilmiştir. *DUSP2* apoptozu tetikler, tümör büyümesini inhibe eder ve hipoksiye bağlı ilaç direncini ortadan kaldırır. Bununla birlikte, *DUSP2* ekspresyonunun inhibisyonu ilaç direncini artırabilir (248).

Sano ve ark. epirubisin/siklofosamid kombinasyon kemoterapisine bireysel cevap için bir öngörü modeli aracılığıyla meme kanseri için potansiyel biyobelirteç genlerini belirlemeye çalışmıştır. Sonuç olarak *DUSP2*'yi belirteçlerden biri olarak seçmişlerdir (321).

Yin ve arkadaşları, p53'ün, apoptoz sırasında, *DUSP2*'nin promotöründeki bir palindromik bölgeye bağlanarak *DUSP2* transkripsiyonunu aktive ettiğini bulmuşlardır. *DUSP2*'nin transkripsiyonu oksidatif strese yanıt olarak indüklenir, bu da p53'e bağlı apoptozise yol açar. *DUSP2* transkripsiyonunun azaltılması, insan kolon kanseri hücre hattında (EB-1 hücreleri) p53 aracılı apoptozu inhibe ederken, *DUSP2*'in aşırı ekspresyonu apoptoza duyarlılığı artırır ve tümör oluşumunu baskılar. Ayrıca, p53'ün aktivasyonu, MAP kinaz aktivitesini önemli ölçüde inhibe eder (249).

DUSP2'nin ekspresyonunun, over seröz karsinomu efüzyon hücrelerinde arttığı bildirilmiştir. Givant-Horwitz ve arkadaşları seröz over karsinomu tanısı olan hastaların 39'unun malign efüzyonunda *DUSP2* mRNA ekspresyonunu saptamıştır. Sonuçlar, *DUSP2*'nin hücrelerin büyük çoğunluğunda ifade edildiğini göstermiştir. Yani *DUSP2* ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu aynı zamanda *DUSP2*'nin yumurtalık karsinomu hücrelerinde MAPK'nın gerçek bir negatif regülatörü olduğunu göstermektedir (322).

Bizim çalışmamızda, Şekil 36'da verilen tüm gruplarda *DUSP1* geninin ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir. Ekspresyon en fazla grup5 (PEG-TiO₂-DOX) (IC₅₀=2,42 \pm 1,07 μ g/ml) en az ise grup1 (TiO₂)'de (IC₅₀=4,99 \pm 1,08 μ g/ml) anlamlı derecede azaltmıştır (p<0,0001) (Şekil 36). Hücreye uygulanan IC₅₀ dozlarına bakıldığında TiO₂ dozunun PEG-TiO₂-DOX'un iki katı olmasına rağmen PEG-TiO₂-

DOX nanotaşıyıcı temelli ilacın daha fazla hücelere etki ederek *DUSP1* ekspresyonunu baskıladığı belirlenmiştir.

DUSP2'nin apoptotik sinyalleşmede doğrudan E2F-1'in (E2F transkripsiyon faktörü 1) transkripsiyonel bir hedefi olduğu bulunmuştur. E2F-1 kanser hücrelerinde ifade edilir. E2F-1, RB (Retinoblastoma protein) tümör baskılayıcısının aktivitesine aracılık eder ve hedef genlerinin transkripsiyonel regülasyonu yoluyla hücre döngüsünün kontrolünde önemli bir role sahiptir. Meme kanseri hücreleri (MB425) ve osteosarkoma hücrelerinde (Saos-2, *DUSP2* ekspresyonu hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde E2F-1 ile arttırılabilir. Ayrıca, E2F-1, kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla ortadan kaldırılmasına yol açan kemoterapötik ajan olan N-4-hidroksifenilretinamid tedavisine duyarlılığını arttırmak için *DUSP2* yoluyla Erk aktivitesini baskılar. Açıklandığı gibi, bulgular kanser gelişimi ve malignitede iki kritik faktör olan hipoksi ile ERK aktivasyonu arasında mekanik bir bağlantı olduğunu ortaya koyar. *DUSP2*'nin in vivo ortamdaki spesifik mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Birbirleriyle bağlantılı olan *DUSP2*, MAPK ve apoptoz, kanser hücresi ölümüne aracılık etmesi ile gelecekte kanser tedavisinde moleküler bir hedef haline gelebilir. Ayrıca, potansiyel bir hastalık belirteci olarak, *DUSP2*'nin kanser tanısında kullanılması olasıdır (323).

Bizim çalışmamıza göre ise; *DUSP2* gen ekspresyonu grup1'de (TiO_2) ($\text{IC}_{50}=4,99\pm 1,08 \mu\text{g/ml}$) artarken, diğer tüm gruplarda anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0,0001$). Yukarıda bahsedilen bilgilere göre grup1 sitotoksik etki gösteren bir molekül olmasına rağmen, ilginç bir şekilde *DUSP2* geninin ekspresyonunu artırmıştır. Bu artma hücrelerde grup1'e karşı bir direnç gelişiminin bir sonucu olabilir. Ancak en fazla ekspresyon düzeyinde azalma grup3'te (DOX) ($\text{IC}_{50}=3,48\pm 1,28 \mu\text{g/ml}$) olduğu belirlendi. Grup 4'ün (PTX) 48 saat inkübasyon IC_{50} değeri ($\text{IC}_{50}=3,32\pm 0,44 \mu\text{g/ml}$) grup3 ile benzer olmasına rağmen grup3 *DUSP2* genin ekspresyonunu daha fazla azaltmıştır.

DUSP4'ün kanserle ilişkisi, *DUSP1* ile kıyaslandığında daha az bilinmektedir. Genetik çalışmalara göre, hepatomlarda, pankreas kanserlerinde, ailesel modülatör tiroid karsinomunda (FMTC), multipl endokrin neoplazisinde ve papiller tiroid karsinomunda *DUSP4*'ün artmış mRNA düzeylerinin bulunduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, *DUSP4* ekspresyonu, insan meme kanseri numunelerinde malign olmayan

numunelere kıyasla, *DUSP1* ile birlikte eksprese edilerek 3 kat artış göstermiştir. Pankreas kanseri hücrelerinde ise, MAPK'ye bağlı *DUSP4*'ün aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (324).

Ayrıca yumurtalıktaki iyi huylu seröz tümörlerde yüksek *DUSP4* ekspresyonu varlığına dair kanıtlar da mevcuttur. *DUSP4*'ün ekspresyon seviyelerinin, yumurtalıktaki iyi huylu seröz tümörlerde, seröz yumurtalık karsinomlara kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur ve hücre dışı matrisin degradasyonu ile ilişkili olarak yumurtalıktaki iyi huylu seröz tümörlerde ERK'ye bağlı olayların *DUSP4* aracılı baskılanma ile gerçekleşmiş olabileceği belirtilmiştir (263). Gröschl ve ark. tarafından yapılan son bir araştırmada, *DUSP4*'nin, mikrosatellit kararlılığı olan kolorektal karsinomaya göre, yüksek sıklıktaki mikrosatellit kararsızlığı olan kolorektal karsinomada yüksek oranda eksprese edildiği keşfedilmiştir. Ek olarak, *DUSP4*'ün kolorektal karsinoma hücre hatlarındaki ekspresyonunun yüksek olması, muhtemelen Myc ve siklin D1 gibi hücre büyümesini teşvik eden genleri uyararak hücre proliferasyonunun artmasına neden olmuştur (325).

DUSP4'ün ayrıca KRAS ve BRAF'ın onkojenik formlarını eksprese eden intestinal epitel hücrelerinde ve çekirdeksel ERK inhibisyonundan sorumlu KRAS ve BRAF mutant kolorektal hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir. Buna karşın, başka birçok çalışma *DUSP2*'yi negatif bir kanser düzenleyici olarak dahil etmiştir. Tarama çalışmaları, *DUSP2*'nin, meme ve prostat kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan 8p kromozomuna bağlı bir tümör baskılayıcı/kansere duyarlılık geni olabileceğini göstermiştir. Düşük *DUSP4* ekspresyonu seviyeleri, aynı zamanda neoadjuvan kemoterapi sonrası kanser hücresi proliferasyonunun artması ve meme kanseri hastalarında nüksüz sağkalımda azalma ile ilişkili bulunmuştur. Ek olarak, EGFR (epidermal büyüme faktörü resptörü) mutasyonlarının, akciğer kanserinde 8p lokusunda yer alan *DUSP4* kaybıyla da ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu, meme kanseri hücre hatlarında *DUSP4*'e bitişik veya içinde olan markörlerde yüksek oranda heterozigozite kaybı gözlemlendiğine ve aday tümör baskılayıcı genler olarak durumlarını desteklediğine dair başka bir çalışma ile desteklenir. Meme kanseri hücre hatlarında *DUSP4* de dahil olmak üzere belirli genlerin yüksek oranda heterozigozite (LOH) kaybını gözlemleyen çalışmada *DUSP4*'ün tümör baskılayıcı gen olarak desteklendiği gösterilmiştir. Ayrıca, *DUSP4*'ün gliomada epigenetik olarak

susturulmuş ortak bir gen olduğu bilinmektedir. Yüksek *DUSP4* ekspresyon düzeyinin, glioblastoma hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur. Daha yakın zamanlarda, *DUSP4*'ün meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) tamoksifen tarafından indüklendiği ve bu hücrelerdeki yüksek *DUSP4* ekspresyon seviyesinin, ERK aracılı proliferasyonu ve tamoksifen direncini inhibe ederek, tamoksifen tedavisine duyarlılığını arttırdığı tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, *DUSP4* ekspresyonunun, JNK aktivasyonunun negatif regülasyonu yoluyla UV veya sisplatin maruziyeti üzerine apoptozdan 293T hücrelerini kurtardığı, ancak ERK regülasyonu yoluyla rapor edilmediği bildirilmiştir. Bu bulgular *DUSP4*'ün kanser gelişiminde hem olumlu hem de olumsuz düzenleyici rollere sahip olabileceğini ve mekanizmaların hala yeterince anlaşılmadığını göstermektedir (22).

Bizim çalışmamızda *DUSP4* ekspresyonunun *DUSP2* genine benzer olarak grup1'de (TiO_2) ($\text{IC}_{50}=4,99\pm 1,08 \mu\text{g/ml}$) anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0,0001$) ve diğer tüm gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. *DUSP4* geninin en fazla ekspresyon düzeyinde azalması ise grup3'te (DOX) ($\text{IC}_{50}=3,48\pm 1,28 \mu\text{g/ml}$) olduğu belirlenmiştir.

DUSP6, sitoplazmik olan fosfatazların en iyi şekilde karakterize edileni olarak bilinmektedir. *DUSP6*'nın özellikle strese bağlı indüklenen ERK1/2 yolunu hedeflediği bildirilmiştir. *DUSP6* esasen ERK sinyalizasyonunun negatif regülasyonu yoluyla olan tümör baskılayıcı işleve sahiptir. *DUSP6*'nın bu işlevi, pankreas kanseri, akciğer kanseri, nazofarengeal karsinom, meme kanseri ve baş boyun kanseri gibi çeşitli kanserler üzerinde yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Örneğin *DUSP6*, pankreas kanseri hücre hatlarında sık görülen allel kayıp bölgelerinden biri olan 12q21 kromozomunda lokalize olup, bu molekülün kanser patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. *DUSP6* ekspresyonu genellikle primer pankreas kanseri dokularında ve displastik in situ karsinom hücrelerinde hafif bir şekilde artmıştır, ancak invaziv karsinomda, özellikle zayıf şekilde farklılaşmış tipte azalarak regüle edilmiştir. Ek olarak pankreas kanseri hücre hatlarının çoğunda, KRAS'taki mutasyonların aktive edilmesiyle, azalmış *DUSP6* seviyeleri görülmüştür. *DUSP6*'nın ayrıca, yapısal olarak aktif mutant bir gen olan NRAS genini barındıran miyelom hücrelerinde ve BRAF'da aktive edici mutasyonlara sahip insan melanom hücre hatlarında indüklendiği gözlenmiştir. Bu çalışmalar, *DUSP6*'nın ifadesinin, aktive edilmiş RAS veya RAF'a cevap olarak, RAS/RAF/MEK/ERK1/2 yolağına negatif bir

geri besleme olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. *DUSP6* ekspresyonunun primer akciğer kanserinde azaldığı, buna bağlı olarak da akciğer kanseri hücrelerinde büyümenin ve tümörlerin histolojik derecesinin arttığı gösterilmiştir. Ancak yapılan çalışmaya göre *DUSP6*'nın zorunlu ifadesinin bu kanser hücre hatlarının büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Özofagus skuamöz hücreli karsinom ve nazofarengeal kanseri ile ilgili olan çalışmada ise, *DUSP6*'nın, kontrol gruplarına kıyasla özofagus skuamöz hücreli karsinom biyopsilerinde % 40 ve nazofarengeal kanser biyopsilerinde % 75 oranında azaldığı saptanmıştır. Çalışma aynı zamanda, ERK'nin ölümsüzleştirilmiş özofagus kanseri ve nazofarengeal kanseri hücre hatlarına *DUSP6* ile negatif regülasyonunu gösteren kıyasla düşük *DUSP6* seviyelerini ifade eden ESCC ve NPC hücre hatlarında ERK aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir. Çalışma aynı zamanda düşük *DUSP6* seviyelerini ifade eden özofagus kanseri ve nazofarengeal kanseri hücre hatlarında ERK aktivitesinde artış olduğunu belirtmiştir. Özofagus kanseri ve nazofarengeal kanseri hücre hatlarında *DUSP6*'nın aşırı ekspresyonu, in vivo olarak azalmış tümör büyümesinin yanı sıra, in vitro kanser hücresi çoğalması ve in vitro hücre göçü ile sonuçlanmıştır. İleri çalışmalar *DUSP6*'nın ERK aktivasyonunun düzenlenmesi yoluyla kemo dirençlendirmede rol oynadığını göstermiştir. Yumurtalık kanserinde, *DUSP6*'nın ekspresyonunun zorla artırılması veya bir ERK inhibitörü ile tedavisi, cisplatin duyarlılığını artırmıştır. Ancak *DUSP6* geninin susturulması ile, cisplatin kaynaklı hücre ölümünde azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Melanoma hücrelerinde, *DUSP6*'nın aşırı ekspresyonu cisplatin duyarlılığının artmasına neden olmuştur. Bunun aksine, *DUSP6*'nın aşırı ekspresyonu, in vitro ve in vivo glioblastoma hücrelerinde cisplatin aracılı hücre ölümüne karşı direnci arttırmıştır, bu da *DUSP6*'nın bu kanserde bir tümör promotörü olarak işlev görebileceğini göstermiştir. Bu, *DUSP6* rolünün, ERK'nin, DNA'ya zarar veren ajanlara yanıt olarak apoptozu tetikleme veya direnci artırma işlevine bağlı olduğuna dair kanıt sağlamaktadır. Prostat kanseri üzerine yapılan çalışmalar ise *DUSP6*'nın aşırı ekspresyonunun DU-145 insan prostat kanseri hücrelerinin büyümesini baskıladığını gösterirken, *DUSP6*'nın susturulması ile LNCap insan prostat adenokarsinom hücrelerinin proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. Ancak diğer deneyler, *DUSP6*'nın aşırı ekspresyonunun farelerde DU-145 hücrelerinin proliferasyonunu ve karaciğer metastazını inhibe ettiğini göstermiştir. Birlikte ele

alındığında, bu bulgular *DUSP6*'nın prostat kanseri hücre büyümesi ve metastazının düzenlenmesinde negatif bir aracı olarak hareket edebileceğini göstermektedir (22,326,327).

Bizim çalışmamızda *DUSP6* ekspresyonunun *DUSP2* ve *DUSP4* genlerine benzer olarak grup1'de (TiO₂) (IC₅₀=4,99±1,08 µg/ml) anlamlı bir şekilde arttığı (p<0,0001) ve diğer tüm gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. *DUSP6* geninin en fazla ekspresyon düzeyinde azalması ise grup3'te (DOX) (IC₅₀=3,48±1,28 µg/ml) olduğu belirlenmiştir. *DUSP10*, hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunan, memeli hücrelerinde yaygın bir şekilde eksprese edilen JNK ve p38'e spesifik olup ERK1/2'ye spesifik olmayan bir MAPK fosfataz olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, *DUSP10* eksikliği olan farelerin kullanıldığı çalışmalarda, bu proteinin, üç MAPK grubunu da defosforile edilebildiği gösterilmiştir (328). Hepatoselüler karsinom hücre hattı olan HepG2'de, çevresel kanserojenler, *DUSP10*'u hedefleyerek p38 aktivasyonunu arttırmak için miR-181'yi (microRNA-181) yükseltmiştir. miR-181'in inhibisyonu, *DUSP10*'un ekspresyonunun artmasına ve buna karşılık olarak p38 aktivasyonunun baskılanmasına neden olmuştur ve bu da kanser hücresi göçünü azaltmıştır (329). Pankreas kanseri hücre hatlarında miRNA-92a, JNK aktivasyonunu teşvik etmek için *DUSP10*'u hedefler ve böylece hücre çoğalmasını artırır. Bu çalışmalar, *DUSP10*'un hepatoselüler karsinomda ve pankreas kanserinde p38 veya JNK'yi inhibe ederek bir tümör baskılayıcısı olduğunu göstermektedir (330). Nomura ve ark. *DUSP10* ekspresyonunun, kolorektal kanserde artarak düzenlendiğini ancak akciğer karsinomunda, meme kanserinde ve glioblastomlarda bu şekilde olmadığını belirlemiştir (269).

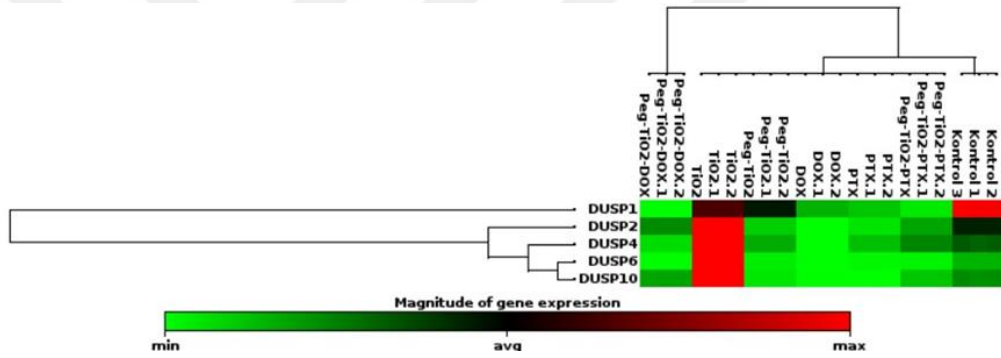
DUSP10'un ERK için bir iskele proteini olduğu ve sitoplazmik tutucu olarak işlev gördüğü, fosfo-ERK'nin çekirdeksel translokasyonunu önlediği ve böylece ERK'ye bağlı transkripsiyon ve kanser ilerlemesini önlediği bulunmuştur. İntestinal epitel hücrelerinde *DUSP10* ve tümör oluşumu konusundaki çalışmada, bu proteinin, intestinal epitel hücresinde yara iyileşmesini baskıladığını ve ERK aracılı sinyalizasyonu baskılayarak tümör oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu bulgulara göre *DUSP10*, kolorektal kanserde tümör baskılayıcı olarak görev almıştır ve terapötik yöntemlerin geliştirilmesinde potansiyel bir hedef olarak belirlenmiştir (331). Ayrıca *DUSP10*, meme kanseri çalışmalarında ekspresyonunun arttığı bilinen

bir gendir. Ek olarak DUSP10, HER2-pozitif (insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2-pozitif) olan meme tümörlerinde indüklenmiş bir gen olarak tanımlanmıştır. Ek olarak, DUSP10, H₂O₂ gibi oksidatif stresler tarafından indüklenebilir (332). DUSP10'un yüksek orandaki ekspresyonu ayrıca, akut miyeloid lösemi (AML) gibi yaygın bir kemik iliği hastalığında da bulunur (333). Prostat kanserinde, bugüne kadar yapılan çalışmalar, bu hastalığı tedavi etmek için kullanılan D vitamininin hormonal olarak aktif metaboliti olan 1,25D (1,25-dihidroksi vitamin D) ile *DUSP10* ekspresyonu arasındaki ilişki üzerine odaklanmıştır. Bu nedenle, cDNA mikrodizi analizi ile *DUSP10* ekspresyonunun insan prostatik normal ve kanser epitel hücrelerinin primer kültürlerinde artmış olduğu, ancak 1.25D tedavisinden sonra normal prostat stromal hücrelerinde artmadığı tespit edilmiştir (334). *DUSP10*'un 1,25D ile yükselmesi, primer prostatik adenokarsinomda meydana gelmiştir. Ancak *DUSP10* ekspresyonu, kanserojenik iltihaplanmaya yol açan prostat kanseri hücre hatlarından türetilmiş metastazlarda yoktur. DUSP10'daki bu artış, DUSP10 promotörü içindeki spesifik bir D vitamini reseptörü (VDR) yanıt elemanından kaynaklanmaktadır (335). *DUSP10*'u indüklemenin yanı sıra, 1,25D tedavisi, COX-2 ve prostaglandin E2 ve F2a reseptörü (EP ve FP) ekspresyonunu azaltarak ve 15-prostaglandin dehidrojenazı artırarak prostaglandin sentezini de inhibe eder. Sonuç olarak, DUSP10 prostat kanserinde anti-enflamatuar bir etkiye sahiptir, bununla birlikte ekspresyonunun yüksek olması karsinojenezi teşvik eder. Bununla birlikte, bir anti-enflamatuar mikro-ortam ve *DUSP10* ekspresyon seviyeleri arasındaki denge prostat kanserini düzenlemek için önemli olabilir (336).

Bizim çalışmamızda *DUSP10* ekspresyonunun *DUSP2*, *DUSP4* ve *DUSP6* genlerine benzer olarak grup1'de (TiO₂) (IC₅₀=4,99±1,08 µg/ml) anlamlı bir şekilde arttığı (p<0,0001) ve diğer tüm gruplarda azaldığı tespit edilmiştir. *DUSP10* geninin en fazla ekspresyon düzeyinde azalması ise grup3'te (DOX) (IC₅₀=3,48±1,28 µg/ml) olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, grup1 (TiO₂) *DUSP1* geni hariç diğer tüm genlerin ekspresyonunu artırmıştır. TiO₂ molekülü normalde sitotoksiktir. Bu sitotoksik etkisi sebebiyle, kanser hücrelerinde ekspresyon düzeyleri yüksek olan *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* genlerinin ekspresyonunu baskılaması beklenmekteydi. Bu sonuca bakıldığında hücrelerde grup1'e karşı bir direnç gelişimi söz konusu olabilir.

Bu çalışmada ilaç taşıyıcı olarak kullanmak amacıyla TiO₂ nanopartikülleri, toksisiteyi gidermek için PEG ile modifiye edildi. Ayrıca geleneksel olarak kullanılan grup3 (DOX) ve grup4 (PTX) ilaçların sağlıklı dokular üzerine olan toksitesini azaltmak amacıyla bu temel çalışmada bu ilaçlar PEG-TiO₂ nanotaşıyıcıya yüklendi. Ancak grup2 (PEG-TiO₂) ilginç bir şekilde *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* genlerinin ekspresyonunu anlamlı derecede azaltmıştır (p<0,0001). 48 saat sonrası grup2 (PEG-TiO₂) sitotoksitesi diğer gruplara göre düşük olmasına rağmen hücrelere toksik etki gösterdiği belirlendi. PEG-TiO₂ nanotaşıyıcı temelli DOX (grup5) ve PTX (grup6) hipotezimize dayanarak beklentimiz doğrultusunda *DUSP1*, *DUSP2*, *DUSP4*, *DUSP6* ve *DUSP10* genlerinin ekspresyonunu anlamlı derecede azaltmıştır (p<0,0001). Grup3 (DOX) ve grup4 (PTX) sonuçları bu sonuçlara benzer olarak *DUSP* genlerinin ekspresyonunu anlamlı derecede azaltmıştır (p<0,0001).



Şekil 36. DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP6 DUSP10 ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması

Sonuç olarak PEG-TiO₂-DOX ve PEG-TiO₂-PTX nanopartikül temelli ilaçların kanser tedavisinde farklı mekanizmalar üzerine olan etkileri hem *in vitro* hem de *in vivo* daha geniş araştırılmalıdır. Ayrıca sağlıklı dokular üzerine olan toksiteyi azaltmak ve kanser dokusu üzerine olan sitotoksiteyi artırmak amaçlı, ekspresyonu artan bir protein ile bu moleküller işaretlenerek hedefli hale getirilebilir ve bu şekilde tedavi etkinliği daha fazla artırılabilir.

7.KAYNAKLAR

- 1) Djojsubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL. (2003). Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 15(2).
- 2) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- 3) Schatten H. (Ed.). (2018). *Cell. Molecular Biology of Prostate Cancer: Updates, Insights and New Frontiers* (Vol. 1095). Springer.
- 4) Singh OP, Nehru RM. (2008). Nanotechnology and cancer treatment. *Asian J Exp Sci*, 22(2), 6.
- 5) Wang X, Wang Y, Chen Z, Shin M D. (2009) Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology , *Cancer Res. Treat.* , 41 (1) : 1 – 11.
- 6) Jordan MA, Wilson L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253.
- 7) Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara Jr PN, Jones JA, Taplin ME, Benson MC. (2004). Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(15), 1513-1520.
- 8) Sartor AO. (2011). Progression of metastatic castrate-resistant prostate cancer: impact of therapeutic intervention in the post-docetaxel space. *Journal of hematology & oncology*, 4(1), 18.
- 9) Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Komiya S. (2011). Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth. *Cancer biology & therapy*, 12(4), 270-277.
- 10) Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. (2005). The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB life*, 57(2), 73-81.
- 11) Roti ECR, Leisman SK, Abbott DH, Salih SM. (2012). Acute doxorubicin insult in the mouse ovary is cell-and follicle-type dependent. *PloS one*, 7(8), e42293.

- 12) Yueying H, Yan Z, Chunhua G, Weifeng D, Meidong L. (2010). Micellar carrier based on methoxy poly (ethylene glycol)-block-poly (ϵ -caprolactone) block copolymers bearing ketone groups on the polyester block for doxorubicin delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(2), 567-574.
- 13) Panno J. (2005). *Cancer: The role of genes, lifestyle, and environment*. Infobase Publishing.
- 14) Sunderland CJ, Steiert M, Talmadge JE, Derfus AM, Barry SE. (2006). Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Development Research*, 67(1), 70-93.
- 15) Smith L, Kuncic Z, Ostrikov K, Kumar S. (2012). Nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 10.
- 16) Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Ramakrishnan V, Kumar J. (2013). Folate targeted PEGylated titanium dioxide nanoparticles as a nanocarrier for targeted paclitaxel drug delivery. *Advanced Powder Technology*, 24(6), 947-954.
- 17) Chen Y, Wan Y, Wang Y, Zhang H, Jiao Z. (2011). Anticancer efficacy enhancement and attenuation of side effects of doxorubicin with titanium dioxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 2321.
- 18) Li Q, Wang X, Lu X, Tian H, Jiang H, Lv G, Chen B. (2009). The incorporation of daunorubicin in cancer cells through the use of titanium dioxide whiskers. *Biomaterials*, 30(27), 4708-4715.
- 19) Lopez T, Sotelo J, Navarrete J, Ascencio JA. (2006). Synthesis of TiO₂ nanostructured reservoir with temozolomide: structural evolution of the occluded drug. *Optical Materials*, 29(1), 88-94.
- 20) Kim C, Kim S, Oh WK, Choi M, Jang J. (2012). Efficient intracellular delivery of camptothecin by silica/titania hollow nanoparticles. *Chemistry—A European Journal*, 18(16), 4902-4908.
- 21) Huang CY, Tan TH. (2012). DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & bioscience*, 2(1), 24.
- 22) Low HB, Zhang Y. (2016). Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer. *Immune network*, 16(2), 85-98.
- 23) Arnoldussen YJ, Saatcioglu F. (2009). Dual specificity phosphatases in prostate cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 309(1-2), 1-7.

- 24) World health organization 12 september 2018 erişim:21.07.2019.
- 25) Omran AR. (1971). The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. *The Milbank Quarterly*, 83(4), 731-757.
- 26) Gersten O, Wilmoth JR. (2002). The cancer transition in Japan since 1951. *Demographic Research*, 7, 271-306.
- 27) Rebecca SMPH, Siegel MP, Kimberly D, Miller MPH, & Ahmedin Jemal DVM. (2017). Cancer statistics. *Ca Cancer J Clin*, 67(27), 7-30.
- 28) Türkiye İstatistik Kurumu , 2015 Türkiye Kanser İstatistikleri https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserd/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf Erişim tarihi: 28.08.19.
- 29) Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- 30) Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Bray F. (2019). Global cancer observatory: cancer today. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*.
- 31) Panigrahi GK, Praharaj PP, Kittaka H, Mridha AR, Black OM, Singh R, Agarwal R. (2019). Exosome proteomic analyses identify inflammatory phenotype and novel biomarkers in African American prostate cancer patients. *Cancer medicine*, 8(3), 1110-1123.
- 32) Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Cho H. (2013). SEER cancer statistics review, 1975–2010. *Bethesda, MD: National Cancer Institute*, 12.
- 33) Rawla P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology*, 10(2), 63.
- 34) De Angelis R, Santn M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Bielska-Lasota M. (2014). Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE-5—a population-based study. *The lancet oncology*, 15(1), 23-34.
- 35) Harper D. *Online Etymology Dictionary*, <http://www.etymonline.com/index.php?term=prostate> (2019).

- 36) InformedHealth.org [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. How does the prostate work? 2011 Feb 15 [Updated 2016 Aug 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279291/>.
- 37) Kirby R, Montorsi F, Smith JA, Gontero P. (Eds.). (2007). *Radical Prostatectomy: from open to robotic*. CRC Press.
- 38) Villers A, Mcneal JE, Freiha FS, Boccon-Gibod L, Stamey TA. (1993). Invasion of Denonvilliers' fascia in radical prostatectomy specimens. *The Journal of urology*, 149(4), 793-798.
- 39) De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nelson WG. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 256.
- 40) Walsh PC, Retik AB, Kavoussi LR, Vaughan ED, Novick AC, Wein AJ. (2005). Campbell Üroloji. *Anafarta MK, Yaman MÖ (çeviren) s, 64*.
- 41) Fowke JH, Motley SS, Cookson MS, Concepcion R, Chang SS, Wills ML, Smith Jr JA. (2007). The association between body size, prostate volume and prostate-specific antigen. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 10(2), 137.
- 42) Gilany K, Minai-Tehrani A, Savadi-Shiraz E, Rezadoost H, Lakpour N. (2015). Exploring the human seminal plasma proteome: an unexplored gold mine of biomarker for male infertility and male reproduction disorder. *Journal of reproduction & infertility*, 16(2), 61.
- 43) Kalinska M, Meyer-Hoffert U, Kantyka T, Potempa J. (2016). Kallikreins the melting pot of activity and function. *Biochimie*, 122, 270-282.
- 44) Medrano A, Fernández-Novell JM, Ramió L, Alvarez J, Goldberg E, Montserrat Rivera M, Rodríguez-Gil JE. (2006). Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 73(3), 369-378.
- 45) Franz MC, Anderle P, Bürzle M, Suzuki Y, Freeman MR, Hediger MA, Kovacs G. (2013). Zinc transporters in prostate cancer. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 735-741.

- 46) Franklin RB, Milon B, Feng P, Costello LC. (2005). Zinc and zinc transporters in normal prostate function and the pathogenesis of prostate cancer. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 10, 2230.
- 47) Johnson LA, Kanak MA, Pestaner JP, Bagasra O. (2010). Differential zinc accumulation and expression of human zinc transporter 1 (hZIP1) in prostate glands. *Methods*, 52(4), 316-321.
- 48) Costello LC, Franklin RB. (2006). The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: connecting the dots. *Molecular cancer*, 5(1), 17.
- 49) Cozzini P, Kellogg GE. (Eds.). (2012). *Computational Approaches to Nuclear Receptors* (No. 30). Royal Society of Chemistry.
- 50) Takayama KI, Inoue S. (2013). Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *International Journal of Urology*, 20(8), 756-768.
- 51) Horie-Inoue K, Inoue S. (2013). Genome-wide integrated analyses of androgen receptor signaling in prostate cancer based on high-throughput technology. *Current drug targets*, 14(4), 472-480.
- 52) Lamont KR, Tindall DJ. (2010). Androgen regulation of gene expression. *Adv. Cancer Res.* **107**, 137–162.
- 53) Thorek DL, Evans MJ, Carlsson SV, Ulmert D, Lilja H. (2013). Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. *Thrombosis and haemostasis*, 110(09), 484-492.
- 54) Wagenlehner F, Pilatz A, Linn, T, Diemer T, Schuppe HC, Schagdarsurengin U, Weidner W. (2013). Prostatitis and andrological implications. *Minerva urologica e nefrologica= The Italian journal of urology and nephrology*, 65(2), 117-123.
- 55) Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Timms B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 101(S10), 2371-2490.
- 56) Dagnelie PC, Schuurman AG, Goldbohm RA, Van den Brandt PA. (2004). Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *BJU international*, 93(8), 1139-1150.

- 57) Pienta KJ, Esper PS. (1993). Risk factors for prostate cancer. *Annals of internal medicine*, 118(10), 793-803.
- 58) Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. (2004). The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 519.
- 59) Kolonel LN. (2001). Fat, meat, and prostate cancer. *Epidemiologic reviews*, 23(1), 72-81.
- 60) Wolk A. (2005). Diet, lifestyle and risk of prostate cancer. *Acta Oncologica*, 44(3), 277-281.
- 61) Wilson KM, Giovannucci EL, Mucci LA. (2012). Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer. *Asian journal of andrology*, 14(3), 365.
- 62) Markozannes G., Tzoulaki I, Karli D, Evangelou E, Ntzani E, Gunter MJ, Tsilidis KK. (2016). Diet, body size, physical activity and risk of prostate cancer: An umbrella review of the evidence. *European Journal of Cancer*, 69, 61-69.
- 63) American Cancer Society. *Prostate Cancer* .(2017). <https://www.cancer.org/cancer/prostatecancer.html>
- 64) Tan DS, Mok TS, Rebbeck TR. (2016). Cancer genomics: diversity and disparity across ethnicity and geography. *J Clin Oncol*, 34(1), 91-101.
- 65) Barber L, Gerke T, Markt SC, Peisch SF, Wilson KM, Ahearn T, Mucci LA. (2018). Family history of breast or prostate cancer and prostate cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 24(23), 5910-5917.
- 66) Schaid DJ. (2004). The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human molecular genetics*, 13(suppl_1), R103-R121.
- 67) Hjelmborg JB, Scheike T, Holst K, Skytthe A, Penney KL, Graff RE, Nuttall E. (2014). The heritability of prostate cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 23(11), 2303-2310.
- 68) Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, McIntosh C. (2016). Familial risk and heritability of cancer among twins in Nordic countries. *Jama*, 315(1), 68-76.
- 69) Venkateswaran V, Klotz LH. (2010). Diet and prostate cancer: mechanisms of action and implications for chemoprevention. *Nature Reviews Urology*, 7(8), 442.

- 70) Pauwels EK. (2011). The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Medical principles and practice*, 20(2), 103-111.
- 71) Lloyd JC, Masko EM, Wu C, Keenan MM, Pilla DM, Aronson WJ, Freedland SJ. (2013). Fish oil slows prostate cancer xenograft growth relative to other dietary fats and is associated with decreased mitochondrial and insulin pathway gene expression. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 16(4), 285.
- 72) Demark-Wahnefried W. (2007). Dietary intervention in the management of prostate cancer. *Current opinion in urology*, 17(3), 168.
- 73) Greenwald P. (2004). Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3507S-3512S.
- 74) McBride RB. (2012). *Obesity and Aggressive Prostate Cancer: Bias and Biology* (Doctoral dissertation, Columbia University).
- 75) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, & International Agency for Research on Cancer. (2004). *Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*. World Health Organization.
- 76) Huncharek M, Haddock KS, Reid R, Kupelnick B. (2010). Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American journal of public health*, 100(4), 693-701.
- 77) Nock NL, Liu X, Cicek MS, Li L, Macarie F, Rybicki BA, Witte JS. (2006). Polymorphisms in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and conjugation genes, interactions with smoking and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 15(4), 756-761.
- 78) Li J, Thompson T, Joseph DA, Master VA. (2012). Association between smoking status, and free, total and percent free prostate specific antigen. *The Journal of urology*, 187(4), 1228-1233.
- 79) Huggins C, Hodges CV. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *The Journal of urology*, 167(2 Part 2), 948-951.

- 80) Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer research*, 50(12), 3748-3753.
- 81) Webber MM, Bello D, Quader S. (1996). Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications part I. Cell markers and immortalized nontumorigenic cell lines. *The Prostate*, 29(6), 386-394.
- 82) Bladou F, Vessella RL, Buhler KR, Ellis WJ, True LD, Lange PH. (1996). Cell proliferation and apoptosis during prostatic tumor xenograft involution and regrowth after castration. *International journal of cancer*, 67(6), 785-790.
- 83) Ahmad I, Sansom OJ, Leung HY. (2008). Advances in mouse models of prostate cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10.
- 84) Michaud JE, Billups KL, Partin AW. (2015). Testosterone and prostate cancer: an evidence-based review of pathogenesis and oncologic risk. *Therapeutic advances in urology*, 7(6), 378-387.
- 85) Gurel B, Lucia MS, Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR, Peskoe SB. (2014). Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 23(5), 847-856.
- 86) Stallone G, Cormio L, Netti GS, Infante B, Selvaggio O, Di Fino G, Tortorella S. (2014). Pentraxin 3: a novel biomarker for predicting progression from prostatic inflammation to prostate cancer. *Cancer research*, 74(16), 4230-4238.
- 87) De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, Nelson WG. (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*, 62(5), 55-62.
- 88) Roberts RO, Lieber MM, Rhodes T, Girman CJ, Bostwick DG, Jacobsen SJ. (1998). Prevalence of a physician-assigned diagnosis of prostatitis: the Olmsted County Study of Urinary Symptoms and Health Status Among Men. *Urology*, 51(4), 578-584.

- 89) Kirby RS, Lowe D, Bultitude MI, Shuttleworth KED. (1982). Intra-prostatic urinary reflux: An aetiological factor in abacterial prostatitis. *British journal of urology*, 54(6), 729-731.
- 90) Shinohara DB, Vaghasia AM, Yu SH, Mak TN, Brüggemann H, Nelson WG, Sfanos KS. (2013). A mouse model of chronic prostatic inflammation using a human prostate cancer-derived isolate of *Propionibacterium acnes*. *The Prostate*, 73(9), 1007-1015.
- 91) Elkahwaji JE, Zhong W, Hopkins WJ, Bushman W. (2007). Chronic bacterial infection and inflammation incite reactive hyperplasia in a mouse model of chronic prostatitis. *The Prostate*, 67(1), 14-21.
- 92) Poletti F, Medici MC, Alinovi A, Menozzi MG, Sacchini P, Stagni G, Benoldi D. (1985). Isolation of *Chlamydia trachomatis* from the prostatic cells in patients affected by nonacute abacterial prostatitis. *The Journal of urology*, 134(4), 691-692.
- 93) Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, Rabkin C, Pope V, Swanson GM, Hoover R. N. (2000). Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. *British journal of cancer*, 82(3), 718.
- 94) Taylor ML, Mainous AG, Wells BJ. (2005). Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis. *FAMILY MEDICINE-KANSAS CITY-*, 37(7), 506.
- 95) Sutcliffe S. (2010). Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses. *Future oncology*, 6(8), 1289-1311.
- 96) Cuzick J. (1995). Human papillomavirus infection of the prostate. *Cancer surveys*, 23, 91-95.
- 97) Myles P, Evans S, Lophatananon A, Dimitropoulou P, Easton D, Key T, O'brien L. (2008). Diagnostic radiation procedures and risk of prostate cancer. *British journal of cancer*, 98(11), 1852.
- 98) B1 World Health O. Manual of the International Statistical Classification of Diseases, Injuries, and Causes of Death. [S.l.]: *World Health Organization* ; 1977.

- 99) www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosisstaging/howdiagnosed. Html Last Medical Review: August 1, 2019
Last Revised: August 1, 2019.
- 100) Descotes JL. (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian journal of urology*.
- 101) Hodge KK, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA. (1989). Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *The Journal of urology*, 142(1), 71-74.
- 102) Kvåle R, Møller B, Wahlqvist R, Fosså SD, Berner A, Busch C, Halvorsen OJ. (2009). Concordance between Gleason scores of needle biopsies and radical prostatectomy specimens: a population-based study. *BJU international*, 103(12), 1647-1654.
- 103) Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. (2012). Harrison's principles of internal medicine. 18. Auflage, *MacGraw-Hill Companies Inc., New York*.
- 104) Wein AJ, Kavoussi LR. (2007). *Campbell-Walsh urology ninth edition review*. WB Saunders Company.
- 105) Messina LE, Lima H, Andrade E, Pinto GA, Srougi M, Ortiz V. (2005). Study on the preferred position Brazilian urologists use for prostate exam. In: *30 Congresso Brasileiro de Urologia, Brasilia. Anais do Congresso (vol. 30)*. Rio de Janeiro: Press Graphic & Publishing Ltd, p. 19.
- 106) Hinman F. Rectal examination of prostate and seminal vesicles. In: Hinman F, (1935). *The Principles and Practice of Urology*. Philadelphia and London: WB Saunders Company, pp. 303–305.
- 107) Roehrborn CG, Girman CJ, Rhodes T, Hanson KA, Collins GN, Sech SM, Lieber MM. (1997). Correlation between prostate size estimated by digital rectal examination and measured by transrectal ultrasound. *Urology*, 49(4), 548-557.
- 108) Izawa JI, Klotz L, Siemens DR, Kassouf W, So A, Jordan J, Iansavichene AE. (2011). Prostate cancer screening: Canadian guidelines 2011. *Canadian Urological Association Journal*, 5(4), 235.
- 109) Koulikov D, Mamber A, Fridmans A, Abu Arafah W, Shenfeld OZ. (2012). Why I cannot find the prostate? Behind the subjectivity of rectal exam. *ISRN urology*, 2012.

- 110) Zhang A, Fear T, Ahmed H. (2013). Digital rectal examination in prostate cancer screening. *UWOMJ Volume 82, Issue 1, Spring 2013*, 82(1), 10.
- 111) Khoury AE, Bägli DJ, Mc-Dougal WS, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Peters CA. (2012). Campbell-Walsh urology tenth edition review.
- 112) Goroll AH, Mulley AG. (2014). *Primary care medicine: office evaluation and management of the adult patient*. Lippincott Williams & Wilkins.
- 113) Loeb S, Eastman JA. (2016). Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Wein: *Campbell-Walsh Urology. 11th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier*; Ch 111. 2601-2608.e7.
- 114) Morgan T, Palapattu G, Partin A, Wei J. (2016). Prostate Cancer Tumor Markers. In: Wein, AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Wein: *Campbell-Walsh Urology. 11th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier*; Ch 108. 2565-2578.e6.
- 115) National Cancer Institute (NCI). Prostate-Specific Antigen (PSA) Test. Reviewed October 4, 2017 Accessed March 3, 2019. Available at URL address: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/PSA>.
- 116) Ferri's Clinical Advisor. Prostate Cancer. In: Ferri FF, editor. Ferri's Clinical Advisor 2019. 1st ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2019. 1144-1147.e3.
- 117) National Comprehensive Cancer Network® (NCCN). NCCN GUIDELINES™ Clinical Guidelines in Oncology™. © National Comprehensive Cancer Network, Inc 2018, All Rights Reserved. Prostate cancer early detection. Volume 1.2019-Jan 31, 2019. Accessed March 4, 2019. Available at URL address: <http://www.nccn.org/>
- 118) Carter HB, Ferrucci L, Kettermann A, Landis P, Wright EJ, Epstein JI, Metter EJ. (2006). Detection of life-threatening prostate cancer with prostate-specific antigen velocity during a window of curability. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(21), 1521-1527.
- 119) Bussemakers MJ, Van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Isaacs WB. (1999). Dd3:: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer research*, 59(23), 5975-5979.

- 120) Hessels D, Gunnewiek JMK, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, Schalken JA. (2003). DD3PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *European urology*, 44(1), 8-16.
- 121) Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, Chypre C. (2004). uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology*, 64(2), 311-315.
- 122) De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, Schalken JA. (2002). DD3PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer research*, 62(9), 2695-2698.
- 123) Deras IL, Aubin SM, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, Grosskopf J. (2008). PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *The Journal of urology*, 179(4), 1587-1592.
- 124) Marks LS, Fradet Y, Deras IL, Blase A, Mathis J, Aubin SM, Grosskopf J. (2007). PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology*, 69(3), 532-535.
- 125) Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. (2004). DD3PCA3 RNA analysis in urine—a new perspective for detecting prostate cancer. *European urology*, 46(2), 182-187.
- 126) Marks LS, Bostwick DG. (2008). Prostate cancer specificity of PCA3 gene testing: examples from clinical practice. *Reviews in urology*, 10(3), 175.
- 127) Castillejos-Molina, R. A. (2016). Ricardo Alonso Castillejos-Molina, MD, (Fernando Bernardo Gabilondo-Navarro, MD, *Urol. salud pública de México*, 58(2).
- 128) Wallace DM, Chisholm GD, Hendry WF. (1975). TNM classification for urological tumours (UICC)—1974. *British journal of urology*, 47(1), 1-12.
- 129) Walz J, Marcy M, Pianna JT, Brunelle S, Gravis G, Salem N, Bladou F. (2011). Identification of the prostate cancer index lesion by real-time elastography: considerations for focal therapy of prostate cancer. *World journal of urology*, 29(5), 589-594.
- 130) Edge SB, Compton CC. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, 17(6), 1471-1474.

- 131) Gjertson CK, Albertsen PC. (2011). Use and assessment of PSA in prostate cancer. *Medical Clinics*, 95(1), 191-200.
- 132) Albertsen PC, Hanley JA, Gleason DF, Barry MJ. (1998). Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. *Jama*, 280(11), 975-980.
- 133) Albertsen PC, Hanley JA, Fine J. (2005). 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *Jama*, 293(17), 2095-2101.
- 134) Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 40(2), 244-252.
- 135) National Nanotechnology Initiative www.nano.gov. Erişim Tarihi: 18.10.19.
- 136) The Lycurgus Cup
www.britishmuseum.org/explore/highlights/highlight_objects/pe_mla/t/the_lycurgus_cup.aspx. Erişim Tarihi: 19.10.19.
- 137) Ng CT, Li JJ, Perumalsamy R, Watt F, Yung LYL, Bay BH. (2010). Localizing cellular uptake of nanomaterials in vitro by transmission electron microscopy. *Microsc. Sci. Technol. Appl. Educ*, 1, 316-320.
- 138) Kreuter J. (2007). Nanoparticles a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*, 331(1), 1-10.
- 139) Issa B, Obaidat IM, Albiss BA, Haik Y. (2013). Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 21266-21305.
- 140) McNamara K, Tofail SA. (2013). 10 Biomedical applications of nanoalloys. *Nanoalloys: From Fundamentals to Emergent Applications*, 345.
- 141) Johnston RL and Wilcoxon JP (ed) 2012 Frontiers of Nanoscience (Oxford: Elsevier).
- 142) Wu H, Yang T, Fan L. (2016). Construction and Biological Evaluation of Nanoparticle-Based Tumor Targeting Drug Delivery Systems. *Micro and Nanotechnologies for Biotechnology*, 59.

- 143) Khare V, Alam N, Saneja A, Dubey RD, Gupta PN. (2014). Targeted drug delivery systems for pancreatic cancer. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(12), 3462-3482.
- 144) Mohanraj V, Chen Y, Chen M. Nanoparticles A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* Trop J Pharm Res [Internet]. 2006;5:561–573. Available from: <http://www.tjpr.freehosting.net>.
- 145) Lövestam G, Rauscher H, Roebben G, Klüttgen BS, Gibson N, Putaud JP, Stamm H. (2010). Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. *Joint Research Centre (JRC) Reference Reports*, 80004-1.
- 146) Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology*, 10(1), 15.
- 147) Bogdan J, Pławińska Czarnak, J, Zarzyńska J. (2017). Nanoparticles of titanium and zinc oxides as novel agents in tumor treatment: a review. *Nanoscale research letters*, 12(1), 225.
- 148) Yin ZF, Wu L, Yang HG, Su YH. (2013). Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Physical chemistry chemical physics*, 15(14), 4844-4858.
- 149) Qin Y, Sun L, Li X, Cao Q, Wang H, Tang X, Ye L. (2011). Highly water-dispersible TiO₂ nanoparticles for doxorubicin delivery: effect of loading mode on therapeutic efficacy. *Journal of Materials Chemistry*, 21(44), 18003-18010.
- 150) Jokerst JV, Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine*, 6(4), 715-728.
- 151) Wang W, Xiong W, Wan J, Sun X, Xu H, Yang X. (2009). The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress. *Nanotechnology*, 20(10), 105103.
- 152) Matsumura S, Sato S, Yudasaka M, Tomida A, Tsuruo T, Iijima S, Shiba K. (2009). Prevention of carbon nanohorn agglomeration using a conjugate composed of comb-shaped polyethylene glycol and a peptide aptamer. *Molecular pharmaceutics*, 6(2), 441-447.

- 153) Eck W, Craig G, Sigdel A, Ritter G, Old LJ, Tang L, Mason MD. (2008). PEGylated gold nanoparticles conjugated to monoclonal F19 antibodies as targeted labeling agents for human pancreatic carcinoma tissue. *ACS nano*, 2(11), 2263-2272.
- 154) Chou AJ, Gorlick R. (2006). Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert review of anticancer therapy*, 6(7), 1075-1085.
- 155) Prencipe G, Tabakman SM, Welsher K, Liu Z, Goodwin AP, Zhang L, Dai H. (2009). PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation. *Journal of the American Chemical Society*, 131(13), 4783-4787.
- 156) Zhang Y, Xu Y, Li Z, Chen T, Lantz SM, Howard PC, Biris AS. (2011). Mechanistic toxicity evaluation of uncoated and PEGylated single-walled carbon nanotubes in neuronal PC12 cells. *ACS nano*, 5(9), 7020-7033.
- 157) Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. (1993). Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). In *Seminars in oncology* (Vol. 20, No. 4 Suppl 3, pp. 1-15).
- 158) Henderson IC, Allegra JC, Woodcock T, Wolff S, Bryan S, Cartwright K, Henry D. (1989). Randomized clinical trial comparing mitoxantrone with doxorubicin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 7(5), 560-571.
- 159) Sternberg CN. (2005). "Satraplatin in the treatment of hormone-refractory prostate cancer" *BJU international*, 96(7), 990-994.
- 160) Thomas E, Taberero J, Fornier M, Conté P, Fumoleau P, Lluch A, Baselga J. (2007). Phase II clinical trial of ixabepilone (BMS-247550), an epothilone B analog, in patients with taxane-resistant metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(23), 3399-3406.
- 161) Youlten DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. (2012). The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer epidemiology*, 36(3), 237-248.

- 162) Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. “Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity” *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229.
- 163) McCurrach ME, Connor TM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Lowe SW. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2345–2349.
- 164) Buzdar AU, Marcus C, Smith TL, Blumenschein GR. (1985) *Cancer* 55, 2761–2765.
- 165) Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA. (1999) *Circ. Res.* 84, 257–265.
- 166) Chen Y, Wan Y, Wang Y, Zhang H, Jiao Z. (2011). Anticancer efficacy enhancement and attenuation of side effects of doxorubicin with titanium dioxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 2321.
- 167) Du Y, Ren W, Li Y, Zhang Q, Zeng L, Chi C, Tian J. (2015). The enhanced chemotherapeutic effects of doxorubicin loaded PEG coated TiO₂ nanocarriers in an orthotopic breast tumor bearing mouse model. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(8), 1518-1528.
- 168) Vermorken JB. (2001). The integration of paclitaxel and new platinum compounds in the treatment of advanced ovarian cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 11(Suppl 1), 21-30.
- 169) Windebank AJ. (1999). Chemotherapeutic neuropathy. *Curr Opin Neurol* (12), 565–71.
- 170) Cavaletti G, Bogliun G, Marzorati L, Zincone A, Piatti M, Colombo N, Fei F. (2004). Early predictors of peripheral neurotoxicity in cisplatin and paclitaxel combination chemotherapy. *Annals of Oncology*, 15(9), 1439-1442.
- 171) McKeage MJ, Haddad GG, Ding L, Galettis, P, Screnci D, Zhuang L, Baguley B. C. (1999). Neuroprotective interactions in rats between paclitaxel and cisplatin. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 11(6), 287-293.
- 172) Singla AK, Garg A, Aggarwal D. (2002). Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics*, 235(1-2), 179-192.
- 173) Spencer CM, Faulds D. (1994). Paclitaxel. *Drugs*, 48(5), 794-847.
- 174) Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277(5698), 665.

- 175) Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*, 79(1), 143-180.
- 176) Robinson MJ, Cobb MH. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology*, 9(2), 180-186.
- 177) Kolch W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351(2), 289-305.
- 178) Vanderbilt C, Cobb MH. (2001). MAP kinases. *Chem. Rev*, 101, 2449-2476.
- 179) Cargnello M, Roux PP. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(1), 50-83.
- 180) Kuo WL, Duke CJ, Abe MK, Kaplan EL, Gomes S, Rosner MR. (2004). ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23073-23081.
- 181) Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Woodgett JR. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 369(6476), 156.
- 182) Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Møller NP, Ullrich A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 4355-4359.
- 183) Engelberg D. (2004, August). Stress-activated protein kinases tumor suppressors or tumor initiators?. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 14, No. 4, pp. 271-282). Academic Press.
- 184) Wada T, Penninger JM. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 23(16), 2838.
- 185) Ray LB, Sturgill TW. (1988). Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(11), 3753-3757.
- 186) Schubert S, Shannon K, Bollag G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 295.

- 187) Lu Z, Xu S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life*, 58(11), 621-631.
- 188) Wagner EF, Nebreda ÁR. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537.
- 189) Timofeev O, Lee TY, Bulavin DV. (2005). A subtle change in p38 MAPK activity is sufficient to suppress in vivo tumorigenesis. *Cell Cycle*, 4(1), 118-120.
- 190) Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Davis RJ. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 288(5467), 870-874.
- 191) Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Firestein GS. (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 108(1), 73-81.
- 192) English JM, Cobb MH. (2002). Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends in pharmacological sciences*, 23(1), 40-45.
- 193) Alonso A, Pulido R. (2016). The extended human PTP ome: a growing tyrosine phosphatase family. *The FEBS journal*, 283(8), 1404-1429.
- 194) Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Mustelin T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), 699-711.
- 195) Tonks NK. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(11), 833.
- 196) Camps M, Nichols A, Arkininstall S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal*, 14(1), 6-16.
- 197) Pulido R, Stoker AW, Hendriks WJ. (2013). PTPs emerge as PIPs: protein tyrosine phosphatases with lipid-phosphatase activities in human disease. *Human molecular genetics*, 22(R1), R66-R76.
- 198) Kondoh K, Nishida E. (2007). Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1227-1237.

- 199) Owens DM, Keyse SM. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26(22), 3203.
- 200) Seternes OM, Kidger AM, Keyse SM. (2019). Dual-specificity MAP kinase phosphatases in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1866(1), 124-143.
- 201) Dorfman K, Carrasco D, Gruda M, Ryan C, Lira, SA, Bravo R. (1996). Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene*, 13(5), 925-931.
- 202) Lawan A, Zhang L, Gatzke F, Min K, Jurczak MJ, Al-Mutairi M, Flach RJR. (2015). Hepatic mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 selectively regulates glucose metabolism and energy homeostasis. *Molecular and cellular biology*, 35(1), 26-40.
- 203) Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Rommel C. (2006). Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nature immunology*, 7(3), 274.
- 204) Lu D, Liu L, Ji X, Gao Y, Chen X, Liu Y, Jin Y. (2015). The phosphatase DUSP2 controls the activity of the transcription activator STAT3 and regulates T H 17 differentiation. *Nature immunology*, 16(12), 1263.
- 205) Al-Mutairi MS, Cadalbert LC, McGachy HA, Shweash M, Schroeder J, Kurnik M, Plevin R. (2010). MAP kinase phosphatase-2 plays a critical role in response to infection by *Leishmania mexicana*. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001192.
- 206) Rushworth LK, Kidger AM, Delavaine L, Stewart G, Van Schelven S, Davidson J, Keyse SM. (2014). Dual-specificity phosphatase 5 regulates nuclear ERK activity and suppresses skin cancer by inhibiting mutant Harvey-Ras (HRasQ61L)-driven SerpinB2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(51), 18267-18272.
- 207) Li C, Scott DA, Hatch E, Tian X, Mansour SL. (2007). Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development*, 134(1), 167-176.

- 208) Muda M, Boschert U, Smith A, Antonsson B, Gillieron C, Chabert C, Arkinstall S. (1997). Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5141-5151.
- 209) Fukuda H, Imamura M, Tanaka Y, Iwata M, Hirose H, Kaku K, Kawamori R. (2012). A single nucleotide polymorphism within DUSP9 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *PLoS One*, 7(9), e46263.
- 210) Tanoue T, Moriguchi T, Nishida E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19949-19956.
- 211) Masuda K, Shima H, Watanabe M, Kikuchi K. (2001). MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39002-39011.
- 212) Matsuguchi T, Musikacharoen T, Johnson TR, Kraft AS, Yoshikai Y. (2001). A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines. *Molecular and cellular biology*, 21(20), 6999-7009.
- 213) Kidger AM, Keyse SM. (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 50, pp. 125-132). Academic Press.
- 214) Lang R, Hammer M, Mages J. (2006). DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *The Journal of Immunology*, 177(11), 7497-7504.
- 215) Nunes-Xavier C, Roma-Mateo C, Rios P, Tarrega C, Cejudo-Marin R, Tabernero L, Pulido R. (2011). Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 11(1), 109-132.

- 216) Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews Drug discovery*, 6(5), 391.
- 217) Bermudez O, Pagès G, Gimond C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(2), C189-C202.
- 218) Ensembl release 98: [ENSG00000120129](https://ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000120129;r=5:172768096-172771195;t=ENST00000239223), Ekim, 2019. http://sep2019.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000120129;r=5:172768096-172771195;t=ENST00000239223.
- 219) Li CY, Yang LC, Guo K, Wang YP, Li YG. (2015) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1: a critical phosphatase manipulating mitogen-activated protein kinase signaling in cardiovascular disease. *International journal of molecular medicine*. 35(4):1095-102.
- 220) Kwak SP, Hakes DJ, Martell KJ, Dixon JE. (1994). Isolation and characterization of a human dual specificity protein-tyrosine phosphatase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269(5), 3596-3604.
- 221) Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology*, 2(2), 110.
- 222) Theodosiou A and Ashworth A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol*. 3:reviews3009.1–reviews3009.10.
- 223) Alessi DB, Smythe C, Keyse SM. (1993). The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene*, 8, 2015-2020.
- 224) Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM. (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38 α and JNK MAP kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of MAP kinase phosphatase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16491-16500.
- 225) Jeanneteau F, Deinhardt K. (2011). Fine-tuning MAPK signalling in the brain: The role of MKP-1. *Communicative & integrative biology*, 4(3), 281-283.

- 226) Broome DT, Datta NS. (2016). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1: function and regulation in bone and related tissues. *Connective tissue research*, 57(3), 175-189.
- 227) Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science*, 286(5449), 2514-2517.
- 228) Chen P, Li J, Barnes J, Kokkonen GC, Lee JC, Liu Y. (2002). Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *The Journal of Immunology*, 169(11), 6408-6416.
- 229) Lin YW, Yang JL. (2006). Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 915-926.
- 230) Shen J, Zhang Y, Yu H, Shen B, Liang Y, Jin R, Cai X. (2016). Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy. *Cancer medicine*, 5(8), 2061-2068.
- 231) Bang YJ, Kwon JH, Kang SH, Kim JW, Yang YC. (1998). Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 250(1), 43-47.
- 232) Loda M, Capodiceci P, Mishra R, Yao H, Corless C, Grigioni W, Stork PJ. (1996). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *The American journal of pathology*, 149(5), 1553.
- 233) Manzano RG, Montuenga LM, Dayton M, Dent P, Kinoshita I, Vicent S, Auersperg N. (2002). CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential. *Oncogene*, 21(28), 4435.

- 234) Magi-Galluzzi C, Mishra R, Fiorentino M, Montironi R, Yao H, Capodieci P, Loda M. (1997). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is overexpressed in prostate cancers and is inversely related to apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 76(1), 37-51.
- 235) Wang HY, Cheng Z, Malbon CC. (2003). Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer letters*, 191(2), 229-237.
- 236) Vicent S, Garayoa M, López-Picazo JM, Lozano MD, Toledo G, Thunnissen FB, Montuenga LM. (2004). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clinical Cancer Research*, 10(11), 3639-3649.
- 237) Moncho-Amor V, De Caceres II, Bandres E, Martinez-Poveda B, Orgaz JL, Sanchez-Perez I, Rojo F. (2011). DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 30(6), 668.
- 238) Tsujita E, Taketomi A, Gion T, Kuroda Y, Endo K, Watanabe A, Maehara Y. (2005). Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 69(4), 342-347.
- 239) Leelahavanichkul K, Amornphimoltham P, Molinolo AA, Basile JR, Koontongkaew S, Gutkind JS. (2014). A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Molecular oncology*, 8(1), 105-118.
- 240) [GRCh38: Ensembl release 89: ENSG00000158050 - Ensembl](http://sep2019.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Multi?db=core;g=ENSG00000158050;r=2:96143169-96145440), Ekim 2019. http://sep2019.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Multi?db=core;g=ENSG00000158050;r=2:96143169-96145440.
- 241) Rohan PJ, Davis P, Moskaluk CA, Kearns M, Krutzsch H, Siebenlist U, Kelly K. (1993). PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science*, 259(5102), 1763-1766.
- 242) Lisbona C, Alemany S, Fernández-Renart M. (1997). Regulation of ERK2 Dephosphorylation in G 1-Stimulated Rat T Lymphoblasts. *Journal of clinical immunology*, 17(6), 494-501.

- 243) Boschert U, Muda M, Camps M, Dickinson R, Arkininstall S. (1997). Induction of the dual specificity phosphatase PAC1 in rat brain following seizure activity. *Neuroreport*, 8(14), 3077-3080.
- 244) Grumont RJ, Rasko JE, Strasser A, Gerondakis S. (1996). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway induces transcription of the PAC-1 phosphatase gene. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2913-2921.
- 245) Kim SC, Hahn JS, Min YH, Yoo NC, Ko YW, Lee WJ. (1999). Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood*, 93(11), 3893-3899.
- 246) Wu MH, Lin SC, Hsiao KY, Tsai SJ. (2011). Hypoxia-inhibited dual-specificity phosphatase-2 expression in endometriotic cells regulates cyclooxygenase-2 expression. *The Journal of pathology*, 225(3), 390-400.
- 247) Lebrun AH, Moll-Khosrawi P, Pohl S, Makrypidi G, Storch S, Kilian D, Cotman S. (2011). Analysis of potential biomarkers and modifier genes affecting the clinical course of CLN3 disease. *Molecular Medicine*, 17(11-12), 1253-1261.
- 248) Lin SC, Chien CW, Lee JC, Yeh YC, Hsu KF, Lai YY, Tsai SJ. (2011). Suppression of dual-specificity phosphatase-2 by hypoxia increases chemoresistance and malignancy in human cancer cells. *The Journal of clinical investigation*, 121(5), 1905-1916.
- 249) Yin Y, Liu YX, Jin YJ, Hall EJ, Barrett JC. (2003). PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature*, 422(6931), 527.
- 250) Wei W, Jiao Y, Postlethwaite A, Stuart JM, Wang Y, Sun D, Gu W. (2013). Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases. *Genes and immunity*, 14(1), 1.
- 251) Ensembl GRCh37: release 98: : [ENSG00000120875](http://ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core:g=ENSG0000120875;r=8:29190581-29208185) September 2019
http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core:g=ENSG0000120875;r=8:29190581-29208185.

- 252) Saigusa S, Inoue Y, Tanaka K, Toiyama Y, Okugawa Y, Shimura T, Kusunoki M. (2013). Decreased expression of DUSP4 is associated with liver and lung metastases in colorectal cancer. *Medical oncology*, 30(3), 620.
- 253) Jung HH, Lee SH, Kim JY, Ahn JS, Park YH, Im YH. (2016). Statins affect ETS1-overexpressing triple-negative breast cancer cells by restoring DUSP4 deficiency. *Scientific reports*, 6, 33035.
- 254) Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Nguyen LT, Kai T, Matsuura K, Amada K. (2016). Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma. *Cancer research*, 76(9), 2612-2625.
- 255) Schmid CA, Robinson MD, Scheifinger NA, Müller S, Cogliatti S, Tzankov A, Müller A. (2015). DUSP4 deficiency caused by promoter hypermethylation drives JNK signaling and tumor cell survival in diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, 212(5), 775-792.
- 256) Waha, A., Felsberg, J., Hartmann, W., von dem Knesebeck, A., Mikeska, T., Joos, S., Wiestler, O. D. (2010). Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells. *Cancer research*, 70(4), 1689-1699.
- 257) Liu Y, Du F, Chen W, Yao M, Lv K, Fu P. (2013). Knockdown of dual specificity phosphatase 4 enhances the chemosensitivity of MCF-7 and MCF-7/ADR breast cancer cells to doxorubicin. *Experimental cell research*, 319(20), 3140-3149.
- 258) Balko JM, Cook RS, Vaught DB, Kuba MG, Miller TW, Bhola NE, Salter J. (2012). Profiling of residual breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance. *Nature medicine*, 18(7), 1052.
- 259) Barajas-Espinosa A, Basye A, Angelos MG, Chen CA. (2015). Modulation of p38 kinase by DUSP4 is important in regulating cardiovascular function under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 170-181.
- 260) Misra-Press A, Rim CS, Yao H, Roberson MS, Stork PJ. (1995). A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), 14587-14596.

- 261) Ensembl release 98: ENSG00000139318, Ekim 2019. http://sep2019.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000139318;r=12:89347235-89352501.
- 262) Farooq A, Chaturvedi G, Mujtaba S, Plotnikova O, Zeng L, Dhalluin C, Zhou M. M. (2001). Solution structure of ERK2 binding domain of MAPK phosphatase MKP-3: structural insights into MKP-3 activation by ERK2. *Molecular cell*, 7(2), 387-399.
- 263) Keyse SM. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(2), 253-261.
- 264) Piya S, Kim JY, Bae J, Seol DW, Moon AR, Kim TH. (2012). DUSP6 is a novel transcriptional target of p53 and regulates p53-mediated apoptosis by modulating expression levels of Bcl-2 family proteins. *FEBS letters*, 586(23), 4233-4240.
- 265) Ensembl release 98: [ENSG00000143507](http://sep2019.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000143507;r=1:221701424-221742089), Ekim, 2019. http://sep2019.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000143507;r=1:221701424-221742089.
- 266) Theodosiou A, Smith A, Gillieron C, Arkinstall S, Ashworth A. (1999). MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene*, 18(50), 6981.
- 267) Tao X, Tong L. (2007). Crystal structure of the MAP kinase binding domain and the catalytic domain of human MKP5. *Protein science*, 16(5), 880-886.
- 268) Zhou B, Wang ZX, Zhao YU, Brautigan DL, Zhang ZY. (2002). The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31818-31825.
- 269) Nomura M, Shiiba KI, Katagiri C, Kasugai I, Masuda K, Sato I, Nakamura Y. (2012). Novel function of MKP-5/DUSP10, a phosphatase of stress-activated kinases, on ERK-dependent gene expression, and upregulation of its gene expression in colon carcinomas. *Oncology reports*, 28(3), 931-936.
- 270) Goldman M, Craft B, Brooks A, Zhu J, Haussler D. (2018). The UCSC Xena Platform for cancer genomics data visualization and interpretation. *BioRxiv*, 326470.

- 271) Vlad G, Suciú-Foca N. (2012). Induction of antigen-specific human T suppressor cells by membrane and soluble ILT3. *Experimental and molecular pathology*, 93(3), 294-301.
- 272) Jiménez-Martínez M, Stamatakis K, Fresno M. (2019). The Dual-Specificity Phosphatase 10 (DUSP10): Its Role in Cancer, Inflammation, and Immunity. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1626.
- 273) Zhang Y, Blattman JN, Kennedy NJ, Duong J, Nguyen T, Wang Y, Dong C. (2004). Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature*, 430(7001), 793.
- 274) Rios P, Nunes-Xavier CE, Tabernero L, Koehn M, Pulido R. (2014). Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxidants & redox signaling*, 20(14), 2251-2273.
- 275) Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson JT, Goodwin A, Zaric S, Dai H. (2008). Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*, 1(3), 203-212.
- 276) In Vitro Investigation of Development and Efficiency of TiO₂ Targeted Drug Delivery Systems For Breast Cancer Treatment. Taş Ayça, Keklikcioğlu Çakmak Neşe, Gümüş Erkan, Siliğ Yavuz (2018), 5th International Conference On Materials Science And Advanced-Nanotechnology For Next Generation.
- 277) Boric Acid-Glycerine System Effect Of In Vitro In MDA-MB-231 Cell Lines. Keklikcioğlu Çakmak Neşe, Gümüş Erkan, Taş Ayça, Siliğ Yavuz (2018), 5th International Conference On Materials Science And Advanced-Nanotechnology For Next Generation.
- 278) Strober W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111(1), A3-B.
- 279) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2012). Cancer statistics, 2012. *Ca Cancer J Clin*, 62(1), 10-29.
- 280) Siegel RL, Miller KD, Jemal A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(1), 5-29.

- 281) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D M, Forman D, Bray F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- 282) Bashir MN. (2015). Epidemiology of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(13), 5137-41.
- 283) Yılmaz B ve Sarıkaya D. (2017). Prostat Kanseri İnsidansı ve Risk Faktörleri. *Turkiye Klinikleri Medical Oncology-Special Topics*, 10(4), 337-342.
- 284) Jahn JL, Giovannucci EL, Stampfer MJ. (2015). The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era. *International journal of cancer*, 137(12), 2795-2802.
- 285) Giovannucci E, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. (2007). Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *International journal of cancer*, 121(7), 1571-1578.
- 286) Eeles RA, Al Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Dadaev T. (2013). Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nature genetics*, 45(4), 385.
- 287) Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti DV, Schumacher F, Han Y, Leongamornlert D. (2014). A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nature genetics*, 46(10), 1103.
- 288) Salinas CA, Tsodikov A, Ishak-Howard M, Cooney KA. (2014). Prostate cancer in young men: an important clinical entity. *Nature Reviews Urology*, 11(6), 317.
- 289) Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse S, Kosary C, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, et al. (2016). SEER Cancer Statistics Review 1975–2013. National Cancer Institute, Bethesda, MD (seer.cancer.gov/csr/1975_2013).
- 290) Brandt A, Sundquist J, Hemminki K. (2011). Risk for incident and fatal prostate cancer in men with a family history of any incident and fatal cancer. *Annals of oncology*, 23(1), 251-256.

- 291) Cao Y, Ma J. (2011). Body mass index, prostate cancer–specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer prevention research*, 4(4), 486-501.
- 292) Zuccolo L, Harris R, Gunnell D, Oliver S, Lane JA, Davis M, Savovic J. (2008). Height and prostate cancer risk: a large nested case-control study (ProtecT) and meta-analysis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17(9), 2325-2336.
- 293) U.S. Department of Health and Human Services. 2014. The health consequences of smoking—50 years of progress: A report of the Surgeon General (www.surgeongeneral.gov/library/reports/50-years-of-progress/index.html).
- 294) Kenfield SA, Stampfer MJ, Chan JM, Giovannucci E. (2011). Smoking and prostate cancer survival and recurrence. *Jama*, 305(24), 2548-2555.
- 295) Oefelein MG, Resnick MI. (2004). Association of tobacco use with hormone refractory disease and survival of patients with prostate cancer. *The Journal of urology*, 171(6 Part 1), 2281-2284.
- 296) Pantarotto J, Malone S, Dahrouge S, Gallant V, Eapen L. (2007). Smoking is associated with worse outcomes in patients with prostate cancer treated by radical radiotherapy. *BJU international*, 99(3), 564-569.
- 297) Joshu CE, Mondul AM, Meinhold CL, Humphreys EB, Han M, Walsh PC, Platz EA. (2011). Cigarette smoking and prostate cancer recurrence after prostatectomy. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(10), 835-838.
- 298) Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. (2018). The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(12), a030361.
- 299) Cargnello M, Roux PP. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(1), 50-83.
- 300) Chang Q, Zhang Y, Beezhold KJ, Bhatia D, Zhao H, Chen J, Chen F. (2009). Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. *Journal of hepatology*, 50(2), 323-333.

- 301) Zhou JY, Liu Y, Wu GS. (2006). The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Oxidative Damage-Induced Cell Death. *Cancer research*, 66(9), 4888-4894.
- 302) Shi H, Boadu E, Mercan F, Le AM, Flach RJR, Zhang L, Bennett AM. (2010). MAP kinase phosphatase-1 deficiency impairs skeletal muscle regeneration and exacerbates muscular dystrophy. *The FASEB Journal*, 24(8), 2985-2997.
- 303) Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, Flavell RA. (2006). Dynamic regulation of pro-and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2274-2279.
- 304) Zhang Y, Reynolds JM, Chang SH, Martin-Orozco N, Chung Y, Nurieva RI, Dong C. (2009). MKP-1 is necessary for T cell activation and function. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 30815-30824.
- 305) Boutros T, Chevet E, Metrakos P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological reviews*, 60(3), 261-310.
- 306) Denkert C, Schmitt WD, Berger S, Reles A, Pest S, Siegert A, Hauptmann S. (2002). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *International journal of cancer*, 102(5), 507-513.
- 307) Candas D, Lu CL, Fan M, Chuang FY, Sweeney C, Borowsky AD, Li JJ. (2014). Mitochondrial MKP1 is a target for therapy-resistant HER2-positive breast cancer cells. *Cancer research*, 74(24), 7498-7509.
- 308) Liao Q, Guo J, Kleeff J, Zimmermann A, Büchler MW, Korc M, Friess H. (2003). Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology*, 124(7), 1830-1845.
- 309) Arnoldussen YJ, Lorenzo PI, Pretorius ME, Wæhre H, Risberg B, Mælandsmo GM, Saatcioglu F. (2008). The Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase Vaccinia H1-Related Protein Inhibits Apoptosis in Prostate Cancer Cells and Is Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer research*, 68(22), 9255-9264.

- 310) Srikanth S, Franklin CC, Duke RC, Kraft AS. (1999). Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligand-induced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 199(1-2), 169-178.
- 311) Franklin CC, Srikanth S, Kraft AS. (1998). Conditional expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3014-3019.
- 312) Sánchez-Pérez I, Martínez-Gomariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R. (2000). CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*, 19(45), 5142.
- 313) Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ. (2007). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer research*, 67(9), 4459-4466.
- 314) Staples CJ, Owens DM, Maier JV, Cato AC, Keyse SM. (2010). Cross-talk between the p38 α and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 25928-25940.
- 315) Chattopadhyay S, Machado-Pinilla R, Manguan-García C, Belda-Iniesta C, Moratilla C, Cejas P, Gonzalez-Baron M. (2006). MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 25(23), 3335.
- 316) Huang J, Wang H, Song Z, Lin X, Zhang C. (2011). Involvement of MAPK phosphatase-1 in dexamethasone-induced chemoresistance in lung cancer. *Journal of Chemotherapy*, 23(4), 221-226.
- 317) Liu F, Gore AJ, Wilson JL, Korc M. (2014). DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. *PLoS One*, 9(1), e84982.
- 318) Yu H, Park J, Lee J, Choi K, Choi C. (2012). Constitutive expression of MAP kinase phosphatase-1 confers multi-drug resistance in human glioblastoma cells. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, 44(3), 195.

- 319) Fang J, Ye Z, Gu F, Yan M, Lin Q, Lin J, Wang Y. (2018). DUSP1 enhances the chemoresistance of gallbladder cancer via the modulation of the p38 pathway and DNA damage/repair system. *Oncology letters*, 16(2), 1869-1875.
- 320) Montagut C, Iglesias M, Arumi M, Bellosillo B, Gallen M, Martinez-Fernandez A, Lema L. (2010). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) impairs the response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *British journal of cancer*, 102(7), 1137.
- 321) Sano H, Wada S, Eguchi H, Osaki A, Saeki T, Nishiyama M. (2012). Quantitative prediction of tumor response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: novel marker genes and prediction model using the expression levels. *Breast Cancer*, 19(1), 37-45.
- 322) Givant-Horwitz V, Davidson B, Goderstad JM, Nesland JM, Tropé CG, Reich R. (2004). The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology*, 93(2), 517-523.
- 323) Wu J, Jin YJ, Calaf GM, Huang WL, Yin Y. (2007). PAC1 is a direct transcription target of E2F-1 in apoptotic signaling. *Oncogene*, 26(45), 6526-6535.
- 324) Hasegawa T, Enomoto A, Kato T, Kawai K, Miyamoto R, Jijiwa M, Ohara K. (2008). Roles of induced expression of MAPK phosphatase-2 in tumor development in RET-MEN2A transgenic mice. *Oncogene*, 27(43), 5684.
- 325) Gröschl B, Bettstetter M, Giedl C, Woenckhaus M, Edmonston T, Hofstädter F, Dietmaier W. (2013). Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation. *International journal of cancer*, 132(7), 1537-1546.
- 326) Ahmad MK, Abdollah NA, Shafie NH, Yusof NM, Razak SRA. (2018). Dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6): A review of its molecular characteristics and clinical relevance in cancer. *Cancer biology & medicine*, 15(1), 14.
- 327) Zhai X, Han Q, Shan Z, Qu X, Guo L, Zhou Y. (2014). Dual specificity phosphatase 6 suppresses the growth and metastasis of prostate cancer cells. *Molecular medicine reports*, 10(6), 3052-3058.









- 328) James SJ, Jiao H, Teh HY, Takahashi H, Png CW, Phoon MC, Yamamoto N. (2015). MAPK phosphatase 5 expression induced by influenza and other RNA virus infection negatively regulates IRF3 activation and type I interferon response. *Cell Rep.* 10 (10), 1722e1734.
- 329) Song MK, Park YK, Ryu JC. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-mediated upregulation of hepatic microRNA-181 family promotes cancer cell migration by targeting MAPK phosphatase-5, regulating the activation of p38 MAPK. *Toxicology and applied pharmacology*, 273(1), 130-139.
- 330) He G, Zhang L, Li Q, Yang L. (2014). miR-92a/DUSP10/JNK signalling axis promotes human pancreatic cancer cells proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(1), 25-30.
- 331) Png CW, Weerasooriya M, Guo J, James SJ, Poh HM, Osato M, Zhang Y. (2016). DUSP10 regulates intestinal epithelial cell growth and colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 35(2), 206.
- 332) Lucci MA, Orlandi R, Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, Villa-Moruzzi E. (2010). Expression profile of tyrosine phosphatases in HER2 breast cancer cells and tumors. *Analytical Cellular Pathology*, 32(5-6), 361-372.
- 333) Grönroos T. (2019). Transcriptional regulation and cell signaling in acute lymphoblastic leukemia and hematopoiesis.
- 334) Han J, Sun P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in biochemical sciences*, 32(8), 364-371.
- 335) Farooq A, Zhou MM. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling*, 16(7), 769-779.
- 336) Nonn L, Peng L, Feldman D, Peehl DM. (2006). Inhibition of p38 by vitamin D reduces interleukin-6 production in normal prostate cells via mitogen-activated protein kinase phosphatase 5: implications for prostate cancer prevention by vitamin D. *Cancer research*, 66(8), 4516-4524.

8. İZİNLER

	CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU
---	--

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Paklitaksel ve Doksorubisin ile Modifiye Edilmiş Nanotaşıyıcı İlaç Sistemlerinin DUSP Genlerin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>			
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>			
	İLAN	<input type="checkbox"/>			
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>			
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>			
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/> Başlık değişikliğine dair dilekçe				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2019-05/52	Tarih: 22.05.2019			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili dilekçede; 17.04.2019 tarih ve 2019-04/30 karar numarası ile kabul edilen "Prostat ve Meme Kanseri Tedavisine Yönelik Paklitaksel ve Doksorubisin ile Modifiye Edilmiş Nanotaşıyıcı İlaç Sistemlerinin MikroRNA Biyogenezindeki Genlerin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi" başlıklı yüksek lisans tez çalışmasında hücre hatlarının kontamine olması nedeniyle çalışmadaki genlerin adını değiştirilerek başlığın "Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Paklitaksel ve Doksorubisin ile Modifiye Edilmiş Nanotaşıyıcı İlaç Sistemlerinin DUSP Genlerin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi" olarak değiştirilmesinde araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Muhittin Sönmez

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Muhittin Sönmez	Anatomi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yalçın Karagöz	Biyoistatistik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hatice Özer	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Binnur Bağcı	Beslenme ve Diyetetik	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Mehmet Atas	Farmasötik Mikrobiyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Engin Altınkaya	İç hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğret. Üyesi Melih Ülgey	Protetik Diş Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez
İmza:



**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanseri Tedavisine Yönelik Paklitaksel ve Doksorubisin ile Modifiye Edilmiş Nanotaşıyıcı İlaç Sistemlerinin <i>DUSP</i> Genlerin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 219 10 10 / Dahili: 2092
	FAKS	-
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Yavuz Silig
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yüksek lisans tezi
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> ULUSAL <input type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez
İmza:

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Zuhal TUNÇBİLEK
Doğum Yeri ve Tarihi Ödemiş-1993
Medeni Hali Bekar
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, 58140-Sivas
E-posta Adresi zuhalt.07@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Prof. Dr. Muzaffer Kula Lisesi, İzmir/Ödemiş, 2011
Lisans Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2016
Yüksek Lisans Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, 2016-