



**GEMSİTABİN UYGULANAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE  
HATLARINDA OXALİPLATİN VE SİSPLATİNİN KEMOTERAPÖTİK  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hatice Arzu ÖZYÜREK**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANLAR**

**Doç.Dr. Gülcan AVCI**

**Yrd. Doç. Dr. Nuray VAROL**

**Tez No: 2016-003**

**AFYONKARAHİSAR-2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GEMSİTABİN UYGULANAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE**  
**HATLARINDA OXALİPLATİN VE SİSPLATİNİN**  
**KEMOTERAPÖTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hatice Arzu ÖZYÜREK**

**BİYOKİMYA ANABİLİMDALI (VET)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANLAR**

**Doç. Dr. Gülcan AVCI**

**Yrd. Doç. Dr. Nuray VAROL**

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu**  
**tarafından 15.SAĞ.BİL.24 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez No: 2016-003**

**2016- Afyonkarahisar**

**KABUL ve ONAY**

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Biyokimya Programı

Çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

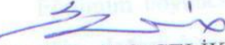
**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/05/2016

  
Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR

Afyon Kocatepe Üniversitesi

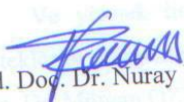
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Sefa ÇELİK


Afyon Kocatepe Üniversitesi

  
Doç. Dr. Gülcan AVCI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

  
Yrd. Doç. Dr. Nuray VAROL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

  
Yrd. Doç. Dr. Funda KARABAĞ ÇOBAN

Uşak Üniversitesi

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Hatice Arzu ÖZYÜREK'in "Gemsitabin uygulanan prostat kanseri hücre hatlarında oxaliplatin ve sisplatinin kemoterapötik etkilerinin belirlenmesi" başlıklı tezi 18.05.2016. günü saat 16:30'da Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. ABDULLAH ERYAVUZ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince değerli bilgi ve tecrübelerini aktararak akademik olarak yetişmemde bana örnek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülcan AVCI'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sürecinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ikinci danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nuray VAROL'a desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım

Yüksek lisans eğitimi süresince vermiş oldukları destek ve katkılarından dolayı Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR, Doç. Dr. İsmail KÜÇÜKKURT, Doç. Dr. Fatih FİDAN ve Veteriner Fakültesi Asistanlarına,

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan desteğini sonsuz hissettiğim değerli hocam Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e,

Rektörümüz ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa SOLAK hocama,

Ve yüksek lisans eğitimim boyunca sabır ve titizlikle bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Sayın Doç. Dr. S. Handan YILDIZ'a ve Sayın Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim, her konuda beni teşvik eden Tıp Fakültesi Acil Tıp AD. öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Şerife ÖZDİNÇ'e gönülden teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde karşılıksız destekleri ve fedakârlıklarını esirgemeyen varlığına sonsuz şükrettiğim sevgili annem Zeynep ÖZYÜREK'e, başarıya giden tek yolun emek ve dürüstlükten geçtiğine inanan ve beni buna inandıran canım babam Nurettin ÖZYÜREK'e ve iyi ki benim kardeşim dediğim canım kanım diğer yarım olan Kübra ÖZYÜREK'e teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL ve ONAY .....	ii
ÖNSÖZ .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER.....	viii
TABLolar .....	x
1.GİRİŞ .....	1
1.1. Prostat Kanseri (CaP) .....	1
1.1.1. Prostat Bezi .....	1
1.1.2. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi .....	1
1.1.3. Prostat Kanserinin Tanısı.....	2
1.1.4. Prostat Kanseri için Risk Faktörleri.....	3
1.2. Prostat Kanseri Tedavisi.....	4
1.3. Prostat Kanseri ve Apoptoz .....	4
1.3.1.Kaspazlar (Sistein Bağımlı Aspartat Spesifik Proteazlar) .....	5
1.3.2. Apoptozun Oluşum Yolakları .....	6
1.3.3. Apoptozun Regülasyonu.....	7
1.4. Gemsitabin (2-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride (beta)-isomer) .....	8
1.5. Sisplatin (CDDP).....	10
1.6. Oxaliplatin (Eloksantin) .....	11
1.7. Amaç .....	13
2.GEREÇ VE YÖNTEM .....	14
2.1. Cihazlar .....	14
2.2. Sarf Malzemeler .....	14
2.3. Kimyasallar .....	15
2.4. Kitler.....	15
2.5. Hücre Hatları .....	15
2.6. Besiyerinin Hazırlanışı .....	16
2.7. Yöntemler.....	16
2.7.1. Hücre Kültürü .....	16
2.7.2. WST-1 Sitotoksosite Deneyi .....	16
2.7.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu .....	17

2.7.4.cDNA Sentezi .....	18
2.7.5. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü .....	18
2.8 İstatistiksel Analiz Yöntemleri .....	20
3. BULGULAR .....	21
3.1. Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	21
3.1.1.Etkin Gemsitabin Dozunun Belirlenmesi .....	21
3.1.2.Etkin Sisplatin Dozunun Belirlenmesi.....	22
3.1.3. Etkin Sisplatin+Gemsitabin Dozunun Belirlenmesi .....	23
3.1.4.Etkin Oxaliplatin Dozunun Belirlenmesi.....	25
3.1.5. Etkin Oxaliplatin+Gemsitabin Dozunun Belirlenmesi .....	26
3.2.Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Belirlenmesi.....	27
3.2.1.Kantitatif <i>CASP3</i> Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	28
3.2.2.Kantitatif <i>CASP8</i> Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	31
3.2.3. Kantitatif <i>CASP9</i> Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	34
4. TARTIŞMA .....	38
5. SONUÇ .....	43
ÖZET.....	44
SUMMARY .....	45
KAYNAKLAR .....	46
ÖZGEÇMİŞ .....	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	Apoptozis-indükleyici faktör
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
AR	Androjen Reseptörleri
ASAP	Atipik küçük asiner proliferasyon
ATP	Adenozin Trifosfat
BER	Base excision repair
BPH	Benign prostat hiperplazisinin
CAD	Caspase active deoksiribonukleotid
CaP	Prostat Kanseri
<i>CARD</i>	Caspase Recruitment Domain
<i>CASP3</i>	Kaspaz 3
<i>CASP8</i>	Kaspaz 8
<i>CASP9</i>	Kaspaz 9
<i>DED</i>	Death Effector Domain
dFdCDP	Gemcitabin difosfat
dFdCTP	Deosisitidin trifosfat
DHT	Dihidrotestesterona
ER	Endoplazmik Retikulum
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
Gem	Gemcitabin
Hiperplazi	Anormal artışı
Hipertrofisi	Hücrelerin büyümesi
HMG	High mobility group
IAP	Inhibitors of apoptosis
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
NADPH oksidaz	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
NER	Nucleotid Excision repair

Oxa	Oxaliplatin
PIA	Proliferatif inflamatuvar atrofi
PSA	Prostat spesifik antijen
ROS	Reaktif oksijen seviyesi
ROT	Reaktif oksijen türleri
Sis	Sisplatin
TNF	Tümör nekroz edici faktörler
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptör
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
TRADD .	Tumor necrosis factor receptor type-1-associated Death Domain
TRIAL	TNF- ilişkili apoptozisi indükleyen reseptör ligandı



## ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. Gemsitabin molekül yapısı .....	8
Şekil 1.2. Sisplatin molekül yapısı .....	10
Şekil 1.3. Oxaliplatin molekül yapısı .....	12
Şekil 2.1. Referans değere göre hedef değeri hesaplayan Pfaffl eşitliği .....	20
Şekil 3.1. DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Gemsitabine ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları .....	21
Şekil 3.2. PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Gemsitabine ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları .....	22
Şekil 3.3. DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Sisplatin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları .....	23
Şekil 3.4. PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Sisplatin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları .....	23
Şekil 3.5. DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 0,250 – 5 µM Gemsitabin ve 2,5-10 µM Sisplatin ile farklı kombinasyonlarının 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı .....	24
Şekil 3.6. PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 15 - 27,5 µM Gemsitabin ve 10-17,5 µM Sisplatin ile farklı kombinasyonlarının 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı .....	24
Şekil 3.7. DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Oxaliplatin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları .....	25
Şekil 3.8. PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Oxaliplatin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları .....	26
Şekil 3.9. DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 15 - 60 µM Oxaliplatin ve 0,250 – 2,5 µM Gemsitabin ile farklı kombinasyonlarının 72 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı .....	26
Şekil 3.10. PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 15 - 60 µM Oxaliplatin ve 0,250 – 2,5 µM Gemsitabin ile farklı kombinasyonlarının 72 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı .....	27
Şekil 3. 11. DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerine ait <i>CASP3</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri .....	28

Şekil 3.12. DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin <i>CASP3</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait erime eğrileri.....	29
Şekil 3.13. DU145 hücrelerinde <i>CASP3</i> geninin mRNA düzeyinde değişimleri ...	30
Şekil 3.14. PC3 hücrelerinin <i>CASP3</i> geninin mRNA düzeyinde değişimler.....	31
Şekil 3.15. DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerine ait <i>CASP8</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.....	31
Şekil 3.16. DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin <i>CASP8</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait erime eğrileri.....	32
Şekil 3.17. DU145 hücrelerinin <i>CASP8</i> geninin mRNA düzeyinde değişimler .....	33
Şekil 3.18. PC3 hücrelerinin <i>CASP8</i> geninin mRNA düzeyinde değişimler.....	34
Şekil 3.19. DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerine ait <i>CASP9</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.....	35
Şekil 3.20. DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin <i>CASP9</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait erime eğrileri.....	35
Şekil 3.21. DU145 hücrelerinin <i>CASP9</i> geninin mRNA düzeyinde değişimler ....	36
Şekil 3.22. PC3 hücrelerinin <i>CASP9</i> geninin mRNA düzeyinde değişimleri.....	37

**TABLULAR**

Sayfa No

Tablo 2.1. Hedef genlere ait RefSeq ve RT <sup>2</sup> qPCR primer assay katalog numaraları.....	19
Tablo 2.2. <i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>CASP9</i> ve <i>GAPDH</i> Real-Time PCR tepkime karışımı.....	19
Tablo 2.3. <i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>CASP9</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.....	20
Tablo 3.1. DU145 hücrelerinin <i>CASP3</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi.....	29
Tablo 3.2. PC3 hücrelerinin <i>CASP3</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi.....	30
Tablo 3.3. DU145 hücrelerinin <i>CASP8</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi.....	33
Tablo 3.4. PC3 hücrelerinin <i>CASP8</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi.....	34
Tablo 3.5. DU145 hücrelerinin <i>CASP9</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi.....	36
Tablo 3.6. PC3 hücrelerinin <i>CASP9</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi.....	37

# 1.GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması (proliferasyon) ve diğer dokulara yayılımı (metastaz) ile karakterize edilen genetik ve epigenetik mekanizmaların önemli rol oynadığı bir hastalıktır. Kanser hücrelerinde bölünmesini kontrol eden genlerde değişiklikler sonucunda ya tamamen fonksiyonlarını kaybeder ya da normal olmayan bir şekilde gelişim gösterirler. Sonuç olarak, hücre döngüsü kontrol noktalarının denetiminin kaybı ve metastatik yayılmanın kombinasyonu kanser hücrelerinin oluşmasına sebep olur. Normal hücrelerdeki tek bir mutasyon, kanserli malignant hücre oluşumunu ve tümörögenез sürecini aktifleştirmeye yetmez. Kanser oluşumu, çoklu mutasyonların birikimi ile karakterize edilen bir süreçtir (Klug ve Cummings, 2006).

## 1.1. Prostat Kanseri (CaP)

### 1.1.1. Prostat Bezi

Prostat erkeklerde, üriner sistemin sonlarında bulunan mesane ve üretra arasında yerleşmiş bir salgı bezidir. Periüretal, transisyonel, santral ve periferal bölge olmak üzere dört adet yapısal bez grubundan meydana gelir. Periüretal, transisyonel ve santral bölge genellikle benign prostat hiperplazisinin (BPH) görüldüğü alanlardır. Üretral sinüse açılan kanalları içeren periferal zon ise prostatik karsinoma için karakteristik alandır (Schneider ve Szanto, 2004).

### 1.1.2. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi

Batılı ülkelerde Prostat kanseri sıklıkla teşhis edilen ve kanser ilişkili olarak erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada görülen kanser türleri arasındadır. Günümüzde prostat kanserinde klinik başarılarla rağmen her yıl ortalama 30.000 erkek hayatını kaybetmektedir. Görülme sıklığının ileri yaşla arttığı bilinen prostat kanseri vakalarında hastaların %65'i 70 yaşın üzerindedir. Yaklaşık tahminlere göre yaşamı boyunca her 5 erkekten birine prostat kanseri tanısı konacak ve 35 erkekten

biri bu hastalıktan hayatını kaybedeceği düşünülmektedir. Nüfus yaşlandıkça bu sayıların artacağı düşünülmektedir. Prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi ABD ve batı Avrupa'da Asya ülkelerine göre oldukça yüksektir (Pienta ve Bradley, 2006; Koochekpour, 2011).

### 1.1.3. Prostat Kanserinin Tanısı

Prostat kanseri konvansiyonel olarak digital rektal muayene, histopatolojik analiz ve prostat spesifik antijen (PSA) tanısı yöntemleri ile saptanmaktadır. Bununla birlikte bu tekniklerin sınırlamaları vardır. Hastalık riskinin değerlendirilmesinde, hasta tedavi takibi ve sağkalımında yardımcı yeni moleküler biyobelirteçler geliştirilmeye çalışılmaktadır (Verma ve ark., 2011).

**Benign Prostat Hastalıkları:** Prostat tümörler arasında en sık rastlanılan durumdur. Genellikle 40 yaş üzerindeki erkeklerde gözlenirken, 50 yaşın üzerindeki erkeklerde %50'sinde, 60-70 yaş arasındaki erkeklerde %65'inde ve 80 yaş üzerindeki erkeklerde ise %90'ında BPH gözlenmektedir. Benign prostat büyümesi, prostattaki hücrelerin büyümesi nedeniyle değil hücre sayısının anormal artışı nedeniyle olduğu tesbit edilmiştir (Youlanda ve ark., 2005; Mark, 2008). Prostat enfeksiyon veya prostatı etkileyen diğer faktörlerden iltihaplanabilir. BPH ve prostat kanseri özellikle 50 yaş üzerindeki erkeklerde görülmesine rağmen, 50 yaş altındaki erkeklerde ise prostatit daha sık gözlenmektedir (Metz, 2005).

**Malign prostat hastalıkları:** Prostat karsinomu erkeklerde en sık görülen internal malignite olup kansere bağlı ölümlerde ise ikinci sırada yer almaktadır. Gelişimde hormonal faktörler de etki etmektedir. Genellikle 50 yaş üzeri erkeklerin hastalığıdır( Akdaş ve Çevik, 1996). Hastanın pedigrisine bakıldığında, özellikle birinci derece akrabalarında prostat kanseri riski daha yüksektir (Canatan ve ark., 2004).

### 1.1.4. Prostat Kanseri için Risk Faktörleri

Prostat kanserinin gelişim süreci için kesin bir sebep olmamasına rağmen bazı risk faktörleri bulunmaktadır. Bunlar;

**Etnik Farklılık:** Prostat kanserinin görülme sıklığı etnik gruplar arasında çeşitlilik göstermektedir. Farklı etnik gruplar içeren bir toplulukla Amerikada yapılan çalışmada Afrika kökenli erkeklerin, beyaz ırktaki erkeklere oranla prostat kanserine yakalanma risklerinin iki kat üzeri olduğu tesbit edilmiştir. Bu farklılığın, androjen reseptör geni mikrosatellitleri ile prostat kanseri arasındaki ilişkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir başka çalışma da ise, Amerika'ya göç etmiş Japon kökenli erkeklerin Japonya'da yaşayanlara nazaran prostat kanseri görülme sıklığının daha yüksek olduğu görülmüştür. En düşük riske sahip etnik grup ise Asya'da yaşayan erkeklerdir (Verma, 2011; Jemal, 2010).

**Yaş:** Prostat kanseri için önemli bir risk faktörüdür. 40 yaş altı erkeklerde görülme oranı 1/10000 olmasına rağmen bu oran 40 yaş ve üstü erkeklerde görülme oranı 1/38'e, 60 yaş ve üstü erkeklerde görülme oranı 1/15'e kadar yükselmektedir (Pienta ve Bradley, 2006; Rentsch, 2009).

**Beslenme:** Prostat kanseri için belirleyici bir faktördür. Yapılan çalışmalarda prostat kanseri riskinin kırmızı et ve doymuş yağ tüketimi ile ilişkisi tespit edilmiş ve aynı zamanda yüksek yağ oranı in vitro ve in vivo olarak prostat kanser hücrelerinin proliferasyonuna etki ettiği gözlenmiştir. Yağlı diyetle beslenenlerde prostat kanserine yakalanma oranının vejeteryanlara göre 1.5 – 2 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte diyetle yüksek miktarda likopen ve selenyum alımının ve özellikle güneydoğu Asya'da yoğun olarak tüketilen soya ürünlerinin prostat kanseri riskini azalttığı bilinmektedir (Kolonel, 2001; Chan ve Giovannucci, 2001).

**Genetik Faktörler:** Erken yaşlarda ortaya çıkan prostat kanserinde genetik etkinin fazla olduğu, ileri yaşlarda ise sporadik olarak geliştiği saptanmıştır. Prostat kanserindeki teşhis yaşı düştükçe, hastanın ve ailesindeki diğer erkek bireylerin

prostat kanserine yakalanma olasılığının yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu rölatif riskin 70 yaşında prostat kanseri olan bir aile bireyinin akrabası olan erkek bireyde 4 kat olmasına rağmen, aynı ailedeki 60 yaş için 5 kat ve 50 yaş için ise riskin 7 kat olduğu gözlenmiştir. Rölatif risk ayrıca etkilenmiş aile üyelerinin sayısına göre, akrabalık derecelerine ve yaşa göre artış göstermektedir (Aktan, 2013).

## **1.2. Prostat Kanseri Tedavisi**

Prostat kanseri başlangıç evrelerinde prostatik kapsüle sınırlı olduğu zaman esas olarak cerrahi müdahale ve radyoterapi ile tedavi edilmektedir. Prostat kanseri vakalarının genellikle yavaş seyir ile kendilerini göstermektedir. Prostat kanseri tanısı alan erkek hastaların büyük çoğunluğu bu hastalık yerine diğer sebeplerden dolayı hayatlarını kaybetmektedirler. Bununla birlikte yavaş seyirli bir hastalık olduğu bilinen prostat kanserinde tümörlerin %30'a kadar varan bir kısmı hızlı bir şekilde ilerleme göstermektedir. Erken teşhis edilemeyen veya daha negatif formda ilerleyen vakalar ileri evrede seminal veziküllere lokal invazyon ve genelde ölüm ile sonuçlanan kemik dokularına metastaz ile karakterizedirler (Shand ve Gelmann, 2006; Karantanos, 2014).

## **1.3. Prostat Kanseri ve Apoptoz**

Hücre ölümleri nekroz ve apoptoz ile gerçekleşmektedir. Hücrede ölüm gerçekleşirken, hücre morfolojik ve biyokimyasal birtakım reaksiyonların içine girer. Nekroz hücre plazmasının yarılması ve hücre membranının bütünlüğünün bozulması ile bu etki sonucunda akut yangısal durumların oluşmasıdır. Aksine etkiye sahip olan apoptoz (programlı hücre ölümü), hücre ölümlerinin fizyolojik şeklidir. Hücreler, yaşlandıklarında veya hasar aldıklarında başlatılan sinyallere bağlı olarak kendi kendilerini yok ederler (Warner, 1972).

Malign hastalıklar, kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinmektedir. Halbuki aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine sebep olduğu görülmüştür. Vakti geldiğinde

normal olarak apoptozise gidemeyen hücrelerin, genomlarında mutasyonların sona ermesiyle malign hücrelere dönüşme olasılığı artar (Ulukaya, 2003).

Apoptozis, özelliğini kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması için gerçekleşen programlanmış hücre ölümleridir. Apoptozis, proapoptotik ve antiapoptotik moleküllerin anti-etkileşimleriyle düzenlenen hücresel bir süreçtir. Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu ile şekillenmektedir. Kanser hücrelerinde apoptotik sinyal yolları genellikle bozulmuştur. Bu da malign hücrelere avantaj sağlarken kemoterapötik ajanlarda dirence neden olur (Crawford ve ark., 2011).

### **1.3.1.Kaspazlar (Sistein Bağımlı Aspartat Spesifik Proteazlar)**

Kaspaz, enzimin katalitik aktivitesinden ismini almaktadır. Ayrıca bir grup enzim aktif merkezlerinde sistein bulunduğundan dolayı sistein proteazlar olarak da bilinmektedir (Tunalı, 2002). Hücre sitoplazmasında inaktif zimojen olarak yer alırlar, fakat farklı süreçlerle aktif hale getirilip çoğu kez zimojenlerin ön bölgelerinin belirli bölgelerden kesilmesini sağlar. Kaspazlar işlevlerine göre 3 gruba ayrılırlar:

**1) Başlatıcı Kaspazlar:** Bu grupta *CASP-2*, 8, 9 ve 10 bulunmaktadır. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyı efektör kaspazlara aktarmakla görevlidir. Başlatıcı kaspazların N-terminal kısmı kaspazların aktivasyonunda yer alırken aynı zamanda sitokin aktivasyonuna yol açarak kaspaz dışı apoptotik yolları aktivasyonunu gerçekleştirirler.

**2) Etkili (Efektör) Kaspazlar:** Bu grupta *CASP-3*, 6 ve 7 bulunmaktadır. Başlatıcı kaspazlardan gelen apoptotik uyarı, N-terminal kısmı spesifik bir efektör kaspazının aktivasyonunu gerçekleştirir.



**3) İnflamatuvar Kaspazlar:** Bu grupta CASP-1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 bulunmaktadır. Patojenlere karşı bağışıklık sağlayıp, lenfokin üretiminden görevlidir.

Apoptozda *CASP3*'ün en önemli rolü üstlendiği ve *CASP9*'un da *CASP3*'e benzer özellikler gösterdiği son çalışmalarda belirtilmiştir (Keane ve ark., 2001; Li ve ark., 2000). *CASP14*'ün dışında tüm inflamatuvar ve başlangıç kaspazları uzun bir N- terminal bölgeye sahip olan kaspazlardan 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12 ve 13'ün uzun N- terminal bölgesi "Caspase Recruitment Domain (CARD) – Kaspaz iyileştirme bölgesi" olarak bilinir ve *CASP8* ve *CASP10*'un N- terminal bölgesi "Death Effector Domain (DED)" olarak adlandırılır. Apoptozu indükleyen sinyaller spesifik olarak bu bölgelere bağlanıp prokaspazlar arasında protein-protein aracılı etkileşime sebep olur ve prokaspazların aktivasyonunda aktif rol alırlar. Efektör kaspazlar ise; kısa N- terminal bölgesine sahip olduğu için bu bölgeler arasında etkileşim beklenemez. Fakat bu bölgeler; hücrenin apoptotik çöküşünü teşvik eden hücreler arası substratları aktivasyondan sorumludur (İşler, 2012).

Başlatıcı kaspazlar ise apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara aktarırlar. Efektör kaspazlar da ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine etkilidirler. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP (inhibitors of apoptosis) kaspazları selektif olarak inhibe ederek apoptotik mekanizmayı durdururlar. IAP'ler ayrıca hücre döngüsünü de etkileyerek apoptozisi durdurabilmektedir. Kaspazdaki defektler kanser, otoimmün hastalıklara ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna neden olabilirler (Kidd ve ark., 2000; Norberg ve ark., 2010). Kaspazlar apoptozisi aktive eden sinyaller tarafından uyarılmasıyla birlikte apoptozisin her üç yolunda da aktif rol alırlar (Ozawa, 2002; Zhang, 1997).

### 1.3.2. Apoptozun Oluşum Yolakları

**İçsel Yolak:** Mitokondride bulunan sitokrom-c'nin görevi ATP sentezlemektir. Mitokondrial stres durumunda serbest hale gelen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde *CASP3* aktive eder (Gleason, 1992). Sitokrom-c mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincir proteinlerinden biridir. Son

zamanlarda önem kazanmasıyla birlikte apoptoz önemli bir konuma gelmiştir. Bu nedenle de sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmaması apoptoz yoluna girmiş bir hücrede düzensiz bir yola girildiğinin sinyallerini vermektedir.. Sitokrom-c, mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır (Norberg, 2010). Sitokrom-c sitoplazmik protein olan apoptotic protease activating factor-1'e (APAF-1) bağlanıp aktive olması ile ATP'nin de katılımıyla "apoptozom" adı verilen bir kompleks oluşturur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif *CASP9* haline dönüşmesini sağlar. Aktif *CASP9* ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive etmesi ile aktif *CASP3* de ICAD'ı (inhibitör of caspase deoksiribonukleotid) CAD (caspase active deoksiribonukleotid) formuna dönüştürür. Böylece kaspaza bağlı apoptozis mekanizmasını başlatır (Ricci, 2003).

**Dışsal Yolak:** Apoptoz, TNFR (tümör nekroz faktör reseptör) gen ailesinin üyelerinden hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ( APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1'in (TNFR-1) ilgili ligandlarının uyarılmasıyla indüklenirler. Bunlar uyarılma ile apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspazları aktive ederler. Fas FASR reseptörlerine ve TNF de TNFR-1'e bağlanıp FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) ve TRADD (Tumor necrosis factor receptor type-1-associated Death Domain) uyarırlar. Bu reseptörler ise prokaspaz-8'e direkt olarak bağlanarak *CASP8*'in aktivasyonu ile efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive edip apoptozu başlatırlar (Ricci, 2003). İntrinsik (içsel) yolak ise mitokondriden salınan sitokrom c ve Smac/DIABLO proteinleri ile indüklenir. Bu proteinler apoptozisi başlatan *CASP9* ve efektör kaspazlar olan *CASP3* ve *CASP7*'nin aktivasyonu ile birlikte çalışır. *CASP9*'un aktivasyonu sitokrom c'nin Apaf-1 proteinine bağlanması sonucu oluşturulan apoptozom kompleksi ile devamlılığı sağlanır (Konac, 2015).

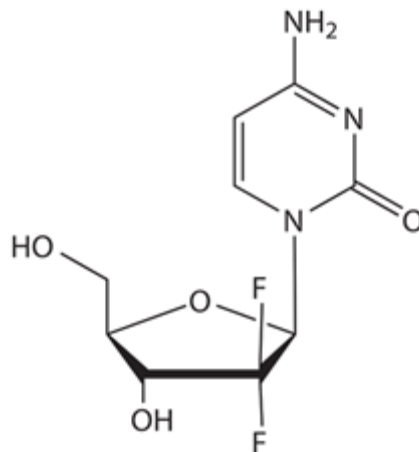
### 1.3.3. Apoptozun Regülasyonu

*Bcl-2* ve *Bax* gen ailesi ile gerçekleşir. Bu genlerin 20 üyesi tanımlanmış olup; bunlardan bazıları antiapoptotik, bazıları ise apoptozu uyarır (Nagata S.1997). Apoptotik sinyali alan *Bax* proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltma etkisine sahiptir. Zardaki bu geçişler sebebiyle sitokrom-c ve AIF

(Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarında yer alan faktörler sitoplazmaya geçiş yapmaktadır (Kaneda K. Ve ark. 1999). AIF doğrudan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom-c apoptozun en son basamağında yer alır. Sitokrom-c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanıp prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptozom' olarak isimlendirilip, prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatmış olur (Nagata, 1997; Tomatır, 2003).

#### 1.4. Gemsitabin (2-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride (beta)-isomer)

Gemsitabin kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olmalarıyla bilinen solid tümörlere karşı önemli etki gösterir. Baz analogu primidin antimetabolittir. Genellikle bölünen hücrelerde sitotoksik aktivite gösterdiği için hücre döngüsünde belirteçtir. Hücre döngüsü sırasında S-fazı ve G1 fazı aralığındaki hücrelerin programlarını inhibe eder (Hertel ve ark., 1990).



Şekil 1.1. Gemsitabin molekül yapısı (Wikimedia, 2016)

Kimyasal yapısı deoksiriboz şekerinin 2. Pozisyonundaki iki hidrojen atomu yerine iki flor atomunun bağlanmasından oluşmuştur. “Gemsitabin” adı kısmen 2’ pozisyonundaki (“geminal pozisyon”) 2 flor atomundan gelmektedir (Şekil1.1).

Gemcitabin öncül bir ilaç olup aktifleşebilmesi için hücre içi metabolik dönüşüme ihtiyaç duyar (Hertel, 1990). Membran geçirgenliği oldukça yüksek olan gemcitabin hücreye transfer edildikten sonra doğal nükleotidlerine benzer bir şekilde deoksisitidinkinaz enzimi tarafından fosforilasyon yoluyla monofosfat (dFdCMP), difosfat (dFdCDP) ve trifosfat (dFdCTP) formlarına dönüştürülerek aktivasyonu gerçekleşir. Oluşan dFdCDP ve dFdCTP formlar doğal nükleotid yapısına benzemektedirler (Peters ve ark., 1996; Xu ve Plunkett, 1992; Mosconi ve ark., 1997).

Gemcitabin ile yapılan klinik öncesi çalışmalar, ilacın hücre metabolizmasını değiştirerek hücre ölümüne yol açan bir çok etki mekanizmasına sahip olduğunu bilinmektedir. Gemcitabin, nükleotidin replikasyonu sırasında büyüyen DNA zincirine doğal olmayan bir nükleotid ilavesi ile DNA sentezini durdurmaktadır. Gemcitabin sadece DNA sentezinde değil aynı zamanda RNA sentezinde de etkili olmasına karşın RNA üzerindeki spesifik etki mekanizmaları hala açıklanamamıştır. (Ruiz Van Haperen ve ark., 1993; Peters ve ark., 1996). İlk olarak gemcitabin aktif hale dönüştürüldükten sonra, difosfat (dFdCDP) DNA sentezi için gerekli deoksinükleotid trifosfatların oluşumunu katalizleyen ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe eder. Bu enzimin inhibisyonu hücre içi deoksinükleotidlerin özellikle deoksisitidin trifosfatın (dCTP) konsantrasyonunda bir azalmaya yol açar (Gandhi ve Plunkett, 1990; Peters ve ark., 1996). İkinci olarak ise, gemcitabin trifosfatlar (dFdCTP) replikasyon sırasında DNA polimeraz tarafından uzayan zincire katılmak için dCTP ile yarışır. Hücre içerisindeki yüksek gemcitabin konsantrasyonu ise dCTP'nin oluşumunu katalizleyen CTP sentetaz'ı doğrudan inhibe ederek CTP oluşumunu durdurur (Heinemann ve Plunkett, 1992; Xu ve Plunkett, 1992; Peters ve ark., 1996)

Moleküler çalışmalar, replikasyon sırasında uzayan zincire gemcitabin nükleotidin katılımından sonra DNA polimerazın ilerleyemediğini ve replikasyonun durduğunu göstermiştir (Ruiz Van Haperen ve ark.,1993). Gemcitabinin DNA yapısına girmesinden sonra bu yapıya bir nükleotid daha eklendiği için gemcitabin bu nükleotid tarafından maskelenir. Bu olay maskelenmiş zincir terminasyonu olarak isimlendirilir. Maskelenmiş zincir terminasyonu gemcitabinin, DNA onarım

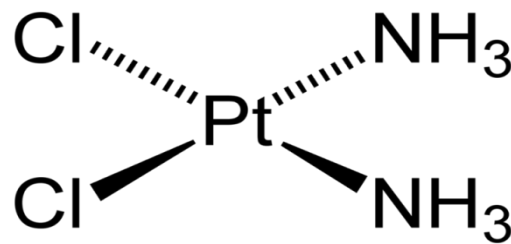
mekanizmaları ve bu arada ekzonükleazlar tarafından DNA yapısından çıkarılmasına karşı korunmasını sağlar. (Heinemann ve Plunkett, 1992; Xu ve Plunkett, 1992).

Gemcitabin hücre metabolizması üzerindeki diğer etkileri, DNA sentezi karşısındaki aktivitesini artırır. Bu mekanizmalar gemcitabinin ribonükleotid redüktaz, deoksitidin kinaz, dCMP deaminaz, CTP sentetaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisinden kaynaklanmaktadır (Xu ve Plunkett, 1992). Hücrelerin gemcitabini DNA'dan uzaklaştırılmasıyla onarımın inhibisyonu ve replikasyonun durması ile morfolojik ve biyokimyasal olarak apoptoz gerçekleşir (Haung ve Plunkett, 1996).

### 1.5. Sisplatin (CDDP)

Sisplatin, 1970'li yıllardan başlayarak kanser tedavisinde kullanılan önemli antineoplastik ilaçlar arasında yer almaktadır. Yetişkin dönemde görülen pek çok tümörün yanı sıra, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün tedavisinde yer alan sisplatin, kemoterapik ilaçlar arasında bulunmaktadır (Kelland, 2007).

Sisplatin (cis-diaminodikloroplatınium (II), cis-platinum (II), cis-DDP, CDDP) yatay düzlemde cis pozisyonda ortada platin atomu etrafında klor ve amonyum atomları ile çevrili inorganik bir platin kompleksidir (Şekil 1.2.) (Tüfekçi, 2009; Coşkun, 2011).



Şekil 1.2. Sisplatin molekül yapısı (Chemistry Physics, 2001)

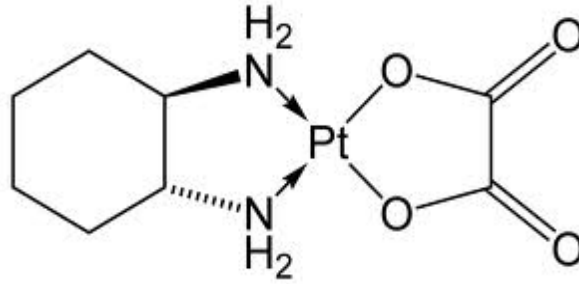
Sisplatin uzun yıllardır kanser tedavisinde kullanılmasına rağmen biyokimyasal etki mekanizması bilinmemektedir. İlacın sitotoksik özelliklerini nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bozarak ve çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ettiği düşünülmektedir (Kelland, 2007; Wang ve Lippart, 2005).

Yapılan ilk çalışmalarda, sisplatinin büyük oranda pasif difüzyon ile hücre içine alındığı ortaya konulmuştur (Wang ve Lippard, 2005). Ancak yapılan başka bir çalışmada ise, bakır transportunda yer alan membran proteinlerinin de hücre içindeki sisplatin konsantrasyonunu etkiledikleri gözlenmiştir (Kuo ve ark., 2007). Hücreye giren platinleyici ajanlar, klor ya da oksalat iyonlarını kaybederek iki su molekülü kazanmakta ve bu şekilde hücre içindeki DNA, RNA, proteinler ile etkileşebilir duruma gelmektedir (Zorbas ve Keppler, 2005).

## **1.6. Oxaliplatin (Eloksantin)**

Platin temelli kemoterapötik ajanların sitotoksik özelliklerinden dolayı DNA hasarına neden olmaktadır. İlgili bölgeye sitotoksik ajanlar uygulandığında oluşan DNA hasarı nedeniyle, siklin bağımlı kinaz (CDK) aktivitesini inhibe eden kontrol noktası proteinlerinin aktivasyonu ve özellikle de G1/S ve/veya G2/M geçişinde hücre döngüsünü durdurduğu gözlenmiştir (Hayward ve ark., 2004; Fujie ve ark., 2005).

Klinikte kullanılan platin kompleksi bir bileşik olan oxaliplatin, sisplatin yapısından ayrılan ligand olan klor atomlarının yerine oksalat ligandının geçmesi ile oluşan platin temelli yapılardır (Desoize ve Modoulet, 2002) (Şekil 1.3). Oxaliplatin, sispatine karşı direnç gösteren kanser türlerinde etkilidir (Desoize ve Modoulet, 2002). Melanoma hücre hatlarında oxaliplatinin antiproliferatif etkisi gösterilmiştir (Mohammed ve Retsas, 2000).



Şekil 1.3. Oxaliplatin molekül yapısı (Sigma Aldrich, 2016 )

Oxaliplatin, yüksek su çözünürlüğü, düşük toksisite ve sisplatinle çapraz direnç olmayan sisplatinin bir diaminosikloheksan türevidir (Di Francesco ve ark.2002). Oxaliplatin, DNA'ya kovalent bağlarla bağlanarak, DNA adduct'ı meydana getirmektedir (Kweekel ve ark., 2005). Oxaliplatin, primer olarak guaninle birleşerek DNA-platinum mono-adduct oluşturur. Primer DNA-pt lezyonları apoptozisi indükleyerek DNA replikasyon ve transkripsiyonunu inhibe eder (Raymond ve ark. 1998). Oxaliplatinin, 5-FU ve / veya İrinotekan ile kombinasyon tedavisinin kolorektal kanserli hastalarda birlikte klinik etkinliği kanıtlanmıştır (Falcone ve ark., 2007). Sisplatinden farklı olarak, oxaliplatin tarafından indüklenen adductlar, mismatch repair system (MMR) tarafından tanınmazlar ve baskın olarak, nucleotid excision repair (NER) ve base excision repair (BER) yolları tarafından tanınırlar (Chaney ve ark., 2005; Zaanen ve ark., 2011). DNA tamir etkinliğinin artması veya sitotoksik ajanın kemoterapötik akümüülasyonunda azalmanın etkisi olarak platin grubu ilaçlara direnç geliştirmesine katkıda bulunabilir ( Polat, 2015).

## 1.7. Amaç

Sisplatin ve Oxaliplatin, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan ve birbirinin türevi olan kemoterapötikler olmasına karşın özellikle sisplatinin istenmeyen yan etkileri gözönüne alındığında, ilaçların birbiri ile kombine edilerek sinerjistik etki gösterip göstermediklerinin belirlenmesi tedavide bunların daha düşük dozda kullanımı yolunu açması bakımından önemli hale gelmektedir. Böylece kemoterapide kullanılan bu ilaçların kombinasyonu ile apoptozise giden yolda aynı veya farklı yollar üzerinden sinerjistik etki göstermeleri ilacın tedavide istenmeyen yan etkilerinin hafifletilmesine neden olacaktır.

Bu amaçla çalışmamızda, DU-145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatları kullanılarak platin temelli kemoterapötik ilaçlar olan Sisplatin ve Oxaliplatinin hem tek başına hem de Gempitabin ile kombinasyonu yapılarak uygulanmasının hücre proliferasyonu ve apoptozise giden yoldaki *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* mRNA düzeylerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu bağlamda elde edilen verilere göre belirtilen ilaçların tek başına yada kombinasyonlarının tedavide kullanımına ilişkin gelecek diğer araştırmalara temel oluşturacaktır.



## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Biyoteknoloji Ünitesinde gerçekleştirilmiş bulunmaktadır.

### 2.1. Cihazlar

- Karbondioksitli etüv (Thermo Scientific)
- Laminar flow (Metisafe)
- Hassas terazi (Ohaus Pioneer)
- PCR-Sprint otomatik ısı döngü cihazı (SensQuest Labcycler)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (Thermo Multiskin Go)
- Inverted mikroskop (Leica)
- Rotor-Gen Q PCR cihazı (Qiagen)
- Nanodrop (Thermo Multiskin Go)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific)
- Spin vorteks (Biosan)
- Vorteks (Biosan)
- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl, 5000µl (Thermo)
- Derin dondurucu -20°C (Arçelik)
- Derin dondurucu -80°C (Thermo)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Hücre sayım cihazı (Biorad)

### 2.2. Sarf Malzemeler

- Hücre üreme flaskları, 25cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup> (Thermo)
- 15ml ve 50ml santrifüj tüpü (Thermo-Nunc)
- Hücre kültür plakları (96 ve 6 kuyucuklu plate) (Thermo)
- Hücre dondurma tüpleri (Corning)
- 0.2ml, 0.5ml ve 1.5ml Mikrosantrifüj tüpleri (Eppendorf)

- 1ml, 5ml, 10ml ve 25 ml serolojik pipet

### 2.3. Kimyasallar

- Besiyeri RPMI 1640 (Biological Industries)
- Fetal Bovine Serum (Biological Industries)
- Penisilin/Streptomisin antibiyotik (Multicell)
- L-Glutamin (Biological Industries)
- Tripsin (Multicell)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- PBS (Sigma)
- Primerler (*GAPDH*, *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9*) (Qiagen)
- Tripure Isolation Reagent (Roche)

### 2.4. Kitler

- Hücre Proliferasyon Kiti, WST-1 (Roche)
- cDNA Sentez Kiti (Qiagen)
- RT<sup>2</sup> SYBR Green Master Mix (Qiagen)

### 2.5. Hücre Hatları

Bu çalışmadaki DU145 insan prostat kanser hücre hattı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM'den ve PC3 insan prostat hücre hattı ise İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL'dan temin edilmiştir.

## 2.6. Besiyerinin Hazırlanışı

450 ml RPMI 1640 besiyerinin içerisine, inaktive edilmiş 50 ml FBS, 5 ml 200 mM L-Glutamin, 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklenerek hazırlandı.

## 2.7. Yöntemler

### 2.7.1. Hücre Kültürü

DU145 ve PC3 hücreleri, %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde % 95 nem ve % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C ayarlı etüv içerisinde kültüre edildi.

DU145 ve PC3 hücreleri, (0,1 – 50µM) Gemsitabine ve Sisplatin, (0,1 – 180µM) Oxaliplatin ile ayrı ayrı ve Gemsitabin+Sisplatin ve Gemsitabin+Oxaliplatin kombinasyonları halinde 0-72 saat süreyle inkübe edildi. Gemsitabin, Sisplatin ve Oxaliplatin kemoterapötikleri için çözücü olarak dH<sub>2</sub>O kullanıldı. İnkübasyon sonrasında her bir doz ve süre için sitotoksik etkileri araştırıldı. Her bir konsantrasyon için 3 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

### 2.7.2. WST-1 Sitotoksisite Deneyi

DU145 ve PC3 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10<sup>5</sup> hücre/ kuyu olacak şekilde ekildi, bir gece besiyerinde inkübe edilerek hücrelerin yapışmasını takiben besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra Gemsitabin, Sisplatin ve Oxaliplatin birlikte ve ayrı ayrı çeşitli konsantrasyonları ile hazırlanmış %10'luk RPMI 1640 besiyerinde 0-72 saat süreyle 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu (Roche, Almanya; Kat. No: 001 644 807 001) eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi DU145 ve PC3 hücreleri için 2 saat sonunda spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda belirlendi. Negatif kontroller kör olarak kullanıldı. Hücre canlılığı % hesaplamaları excel programı ile gerçekleştirildi.

### 2.7.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

6 kuyulu kültür kaplarında bulunan DU145 ve PC3 hücrelerinden inkübasyon sürelerinin ardından aşağıdaki basamaklara göre Tripure Isolation Reagent ile total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İşlemler laminar akım kabini içerisinde yapıldı.

1. Hücrelerden ilaçlı besiyerleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 1'er ml Tripure solüsyonu eklendi.
2. Hücre lizatları steril ependorf tüplere alındı ve nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrımı için 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
3. Her bir tüpe 200'er µl kloroform eklendi ve 15 saniye boyunca kuvvetlice vorteks yapıldı.
4. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyondan sonra 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
5. Süpernatantların her biri yeni ependorf tüplere alındı.
6. Her bir tüpe 500'er µl izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve pelletlerin üzerine 1'er ml %75 lik etanol yıkama amacıyla kondu.
8. Tüpler 7500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
9. Pelletler belirli süre kurumaya bırakıldı ve 35µl DEPC muamele edilmiş H<sub>2</sub>O eklendi.
10. Peletlerin çözülmesi için kuru ısıtıcıda 60°C'de 15 dk inkübe edildi
11. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılmaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

### 2.7.4.cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  değerleri belirlendi. RT<sup>2</sup> HT First Strand cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya; Kat. No: 330411) kullanılarak total RNA'dan üretici firmanın önerdiği ve aşağıdaki açıklanan protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. RNA konsantrasyonu total hacim 8  $\mu\text{l}$ 'de 5 $\mu\text{g}$  olacak şekilde 0,2'lik mikrosantrifüj tüplerine hazırlandı.
2. RNA örnekleri üzerine 6  $\mu\text{l}$  GE2 buffer (gDNA eliminasyon buffer) eklendi.
3. 37<sup>0</sup>C'de 5 dakika inkübasyon edildikten sonra örnekler buz üzerine alındı.
4. 6  $\mu\text{l}$  BC4 Reverse Transkriptaz mix, buz üzerinde bekletilen örneklere eklendi.
5. Thermal Cycler cihazına yerleştirilen örnekler sırasıyla;
  - 42<sup>0</sup>C'de 15 dakika
  - 95<sup>0</sup>C'de 5 dakika inkübe edildi.
6. Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri üzerine 91 $\mu\text{l}$  steril H<sub>2</sub>O-PCR grade (Qiagen, Almanya Kat No:1039498) eklendi ve Real-Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20<sup>0</sup>C'lik derin dondurucuda saklandı.

### 2.7.5. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü

*CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile RotorGeneQ cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 25  $\mu\text{L}$  toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler (Tablo 2.1) ve RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix karışımı (Qiagen, Almanya; Kat. No:330500) ve steril H<sub>2</sub>O-PCR grade kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 2.2) *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* genlerinin ifadenmesini normalize etmek için *GAPDH* mRNA düzeyi referans olarak alındı.

**Tablo 2.1.** Hedef genlere ait RefSeq ve RT<sup>2</sup> qPCR primer assay katalog numaraları

Gen Adı	RefSeq(mRNA)	RT <sup>2</sup> qPCR primer		Referans Pozisyonu*
		assay Kat. No.	Band Uzunluğu	
<i>CASP3</i>	NM_004346.3	PPH00107C	132	901
<i>CASP8</i>	NM_001228.4	PPH00359F	65	873
<i>CASP9</i>	NM_001229.4	PPH00353B	114	1956
<i>GAPDH</i>	NM_002046.5	PPH00150F	130	842

\* RefSeq sekansındaki amplicon pozisyonu

**Tablo 2.2.** *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* ve *GAPDH* Real-Time PCR tepkime karışımı:

	Hacim
RT <sup>2</sup> SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA	5 µl
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay (10µM stok)	1 µl
H <sub>2</sub> O	6,5 µl
<b>Total Hacim</b>	<b>25 µl</b>

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 0.2 ml'lık çoklu PCR tüplerine dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 2.3'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* ve *GAPDH* genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* ve *GAPDH* genlerin mRNA düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* ifade düzeyleri *GAPDH* ifade düzeyine göre normalize edildi.

**Tablo 2.3.** *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Döngü	Zaman	Sıcaklık
1	10 dakika	95 <sup>0</sup>
40	15 saniye	95 <sup>0</sup>
	1 dakika	60 <sup>0</sup>
	1 dakika	72 <sup>0</sup>
+ Melting Curve		

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir (Şekil 2.1).

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}$$

**Şekil 2.1.** Referans değere göre hedef değeri hesaplayan Pfaffl eşitliği.

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır.  $\Delta Ct$  değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir. İfade oranı (R) istatistiksel karşılaştırmada kullanıldı.

## 2.8 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Doza bağlı olarak değişen, *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* ve *GAPDH* mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “Qiagen Data Analysis Center” istatistik programı ile karşılaştırıldı. 0,05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

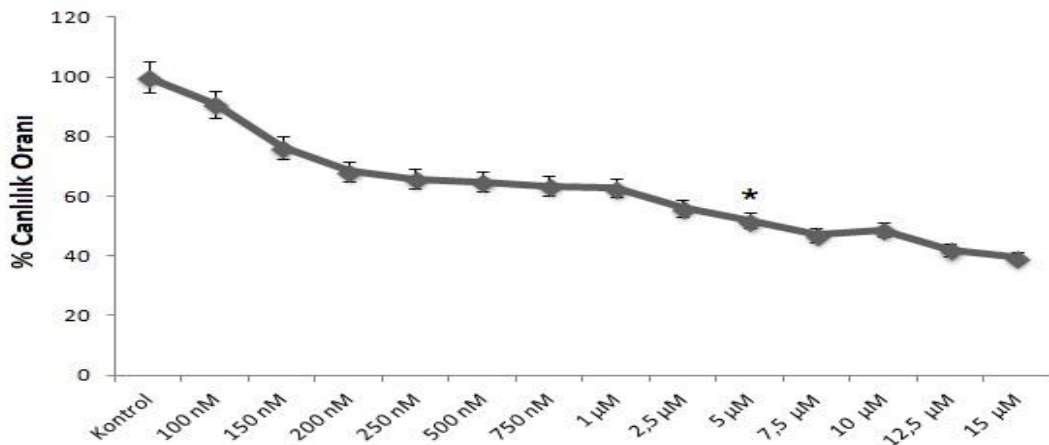
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hücre Canlılığı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

DU145 ve PC3 hücreleri, gemsitabin, sisplatin ve oxaliplatin'in ayrı ayrı ve birlikte kullanımlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesinde Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) kiti kullanılarak belirlendi. Öncelikle DU145 ve PC3 hücreleri 0–50  $\mu\text{M}$  gemsitabin ve sisplatin ve 0-180  $\mu\text{M}$  oxaliplatin ile ayrı ayrı olarak inkübe edilerek gemsitabin ve sisplatin için 48. saatteki ve oxaliplatin için 72. saatteki etkin dozları belirlendi. Çalışmanın devamında gemsitabin ve sisplatinin birlikte 48. saatteki, gemsitabin ve oxaliplatin birlikte 72. saatteki etkin dozları belirlendi.

##### 3.1.1.Etkin Gemsitabin Dozunun Belirlenmesi

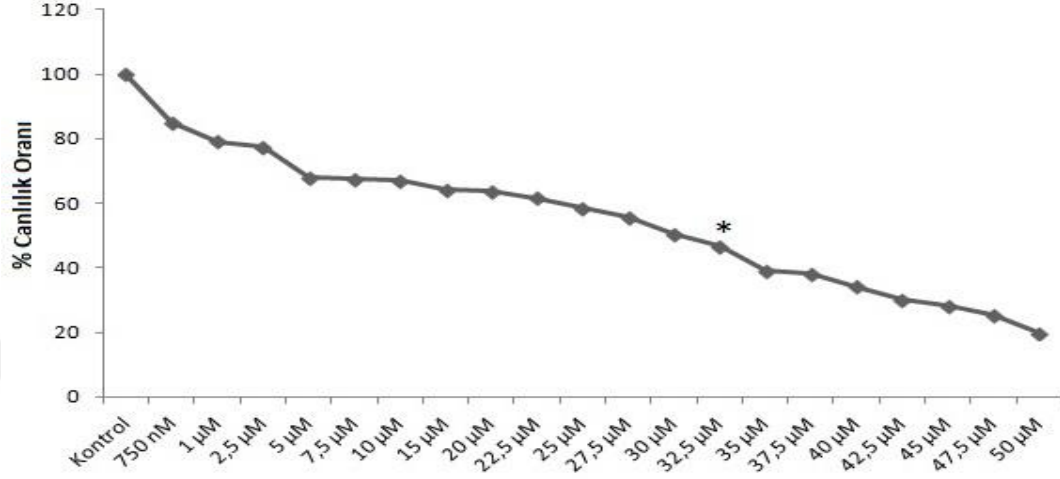
96 kuyulu hücre kültür kaplarına  $10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde DU145 ve PC3 hücreleri ekilerek, DU145 hücreleri 0 – 15  $\mu\text{M}$  doz aralığında ve PC3 hücreleri ise 0 -50  $\mu\text{M}$  doz aralığında farklı gemsitabin konsantrasyonları 48 saat süre ile inkübe edildi. 48 saat inkübasyon sonucunda DU145 hücrelerin gemsitabin'e cevabı en düşük konsantrasyondaki (0,1  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı %90,9 en yüksek konsantrasyondaki (5  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı ise % 51,9 bulundu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) gemsitabine ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları, \* IC50 değeri.



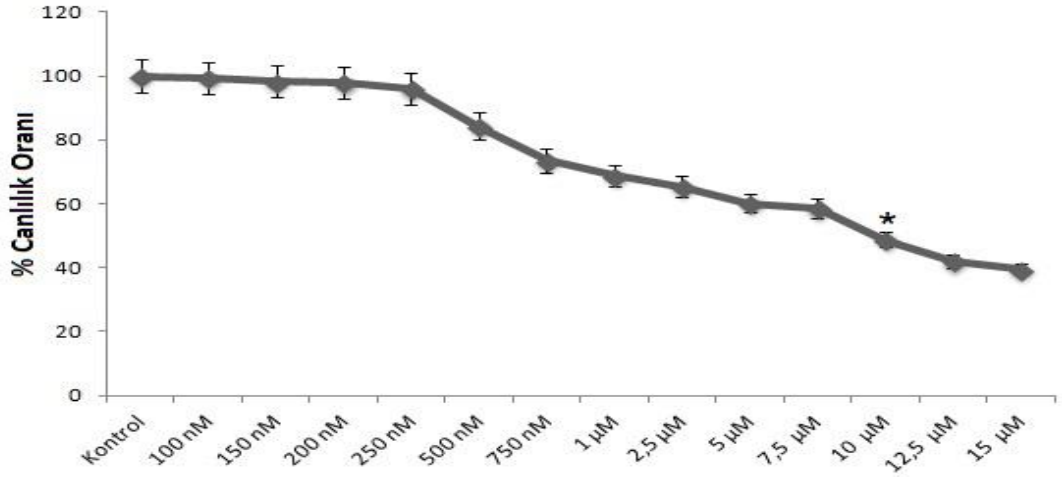
PC3 hücrelerinin gemsitabin'e cevabı en düşük konsantrasyondaki (0,75  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı %85,5 en yüksek konsantrasyondaki (30  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı ise % 50,5 bulundu (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) gemsitabine ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları, \*  $\text{IC}_{50}$  değeri.

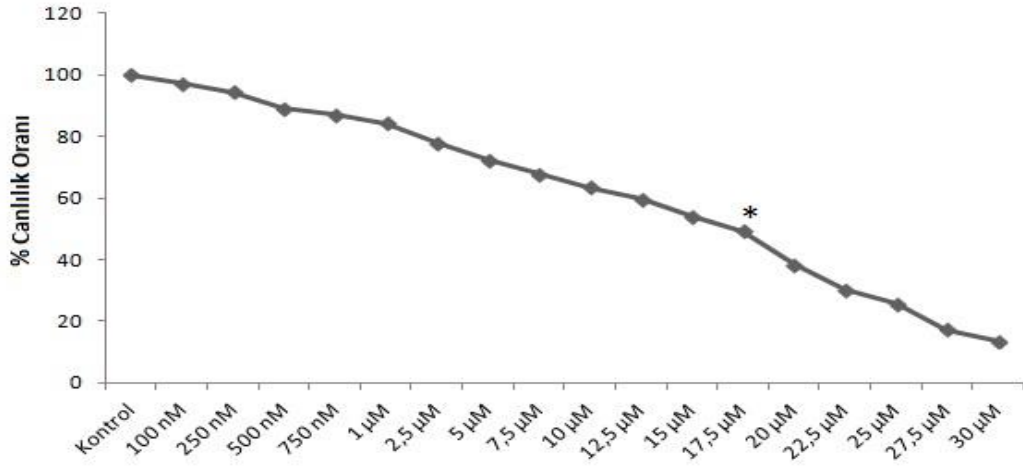
### 3.1.2.Etkin Sisplatin Dozunun Belirlenmesi

96 kuyulu hücre kültür kaplarına  $10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde DU145 ve PC3 hücreleri ekilerek, DU145 hücreleri 0 – 15  $\mu\text{M}$  doz aralığında ve PC3 hücreleri ise 0 -30  $\mu\text{M}$  doz aralığında farklı sisplatin konsantrasyonları 48 saat süre ile inkübe edildi. 48 saat inkübasyon sonucunda DU145 hücrelerin gemsitabin'e cevabı en düşük konsantrasyondaki (0,1  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı %95,9 en yüksek konsantrasyondaki (10  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı ise % 48,8 bulundu (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) sisplatin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. \* IC50 değeri.

PC3 hücrelerinin sisplatin'e cevabı en düşük konsantrasyondaki (0,1 µM) hücre canlılığı %97,3 en yüksek konsantrasyondaki (17,5 µM) hücre canlılığı ise % 49,3 bulundu (Şekil 3.4).

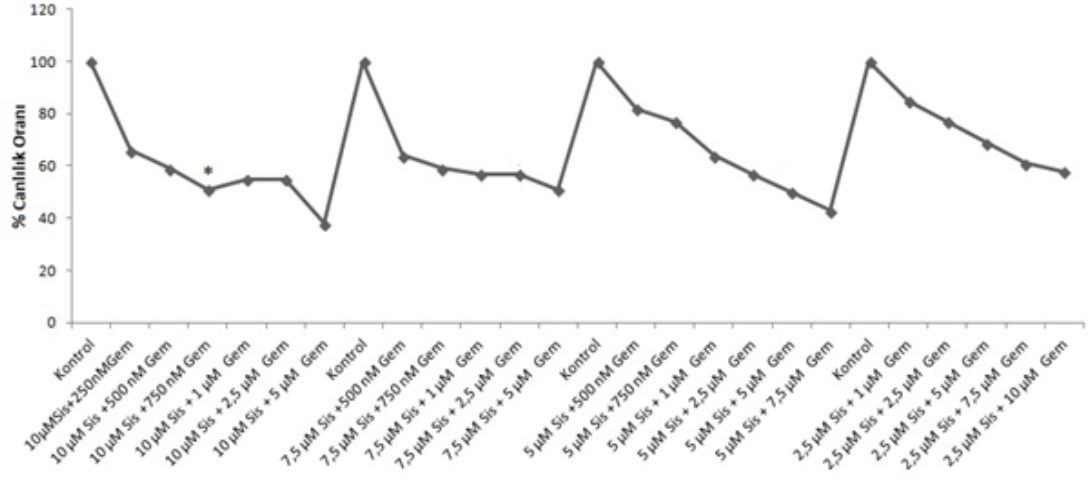


**Şekil 3.4.** PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) sisplatin ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları,\* IC50 değeri.

### 3.1.3. Etkin Sisplatin+Gemsitabin Dozunun Belirlenmesi

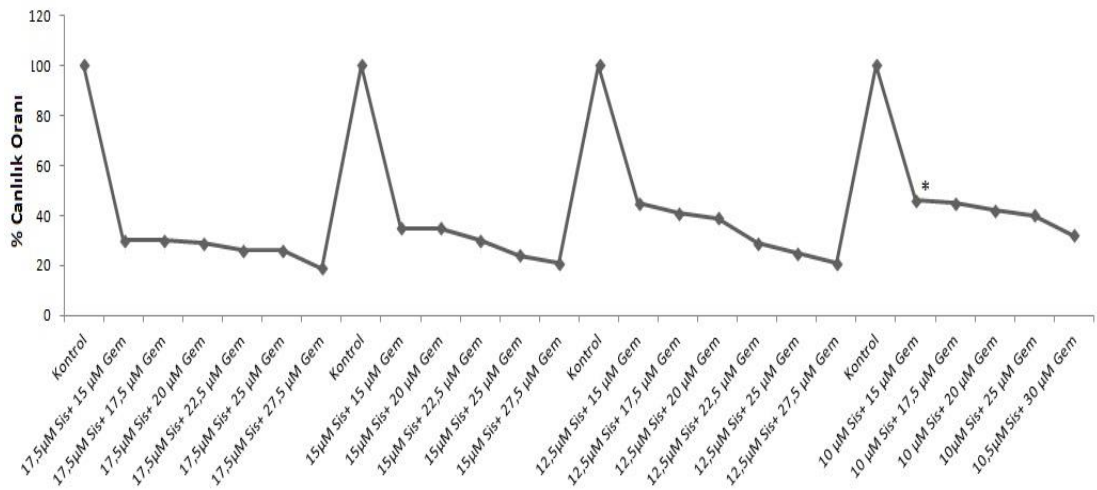
DU145 hücrelerinde gemsitabin ve sisplatin'in birlikte hücre canlılığına etkisi araştırmak amacıyla 0,250 – 5 µM gemsitabin ve 2,5-10 µM sisplatin'nin farklı

dozları ile birlikte 48 saat uygulandığında IC<sub>50</sub> değeri 10 µM Sisplatin + 0,750 µM gemsitabin konsantrasyonu ve canlılık oranları %50 olarak belirlendi (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 0,250 – 5 µM gemsitabin ve 2,5-10 µM sisplatin ile farklı kombinasyonlarının 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı. \* IC<sub>50</sub> değeri.

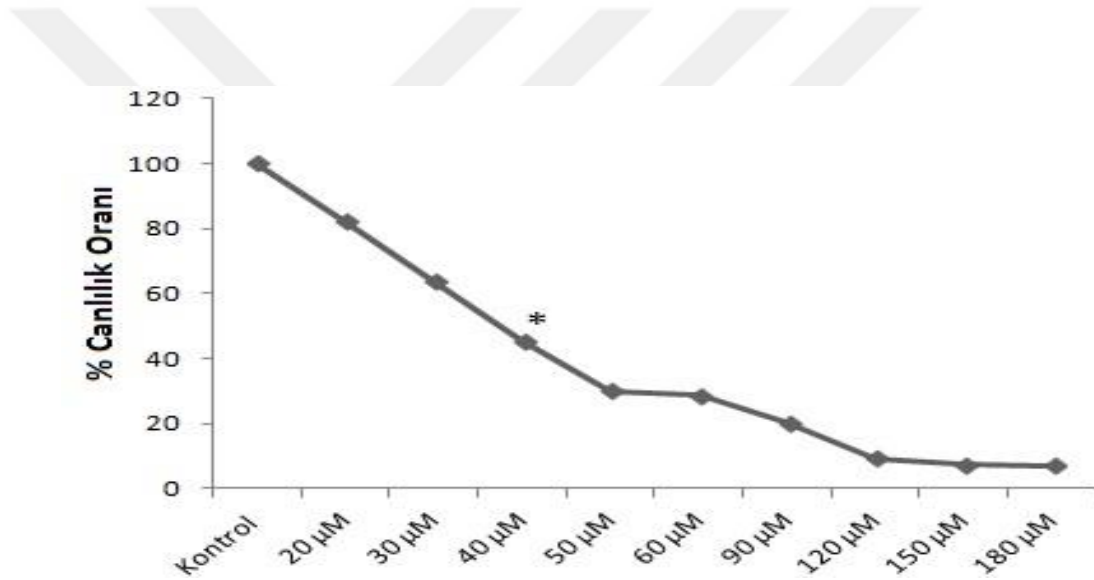
PC3 hücrelerinde gemsitabin ve sisplatin'in birlikte hücre canlılığına etkisinin araştırmak amacıyla 15 – 27,5 µM gemsitabin ve 10 - 17,5 µM sisplatin ile farklı dozları birlikte 48 saat uygulandığında IC<sub>50</sub> değeri 10 µM sisplatin + 15 µM gemsitabin konsantrasyonu ve canlılık oranları %49 olarak belirlendi (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 15 - 27,5 µM gemsitabin ve 10-17,5 µM sisplatin ile farklı kombinasyonlarının 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı, \* IC<sub>50</sub> değeri.

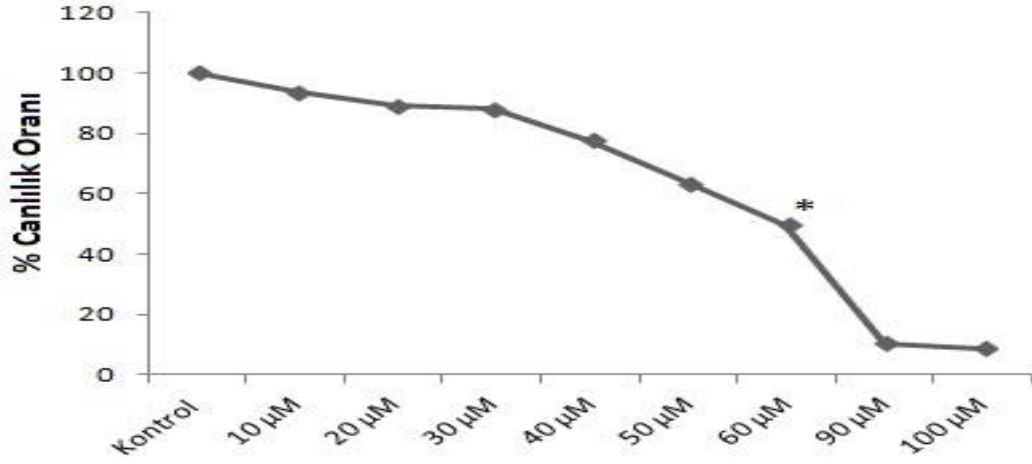
### 3.1.4.Etkin Oxaliplatin Dozunun Belirlenmesi

96 kuyulu hücre kültür kaplarına  $10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde DU145 ve PC3 hücreleri ekilerek, DU145 hücreleri 0 – 180  $\mu\text{M}$  doz aralığında ve PC3 hücreleri ise 0 - 100  $\mu\text{M}$  doz aralığında farklı oxaliplatin konsantrasyonları 72 saat süre ile inkübe edildi. 72 saat inkübasyon sonucunda DU145 hücrelerin oxaliplatin'e cevabı en düşük konsantrasyondaki (20  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı %82,1 en yüksek konsantrasyondaki (180  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı ise % 7,14 bulundu. Oxaliplatin 72 saat uygulandığında  $\text{IC}_{50}$  değeri 40  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ve canlılık oranları %45,52 olarak belirlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) oxaliplatin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları, \*  $\text{IC}_{50}$  değeri.

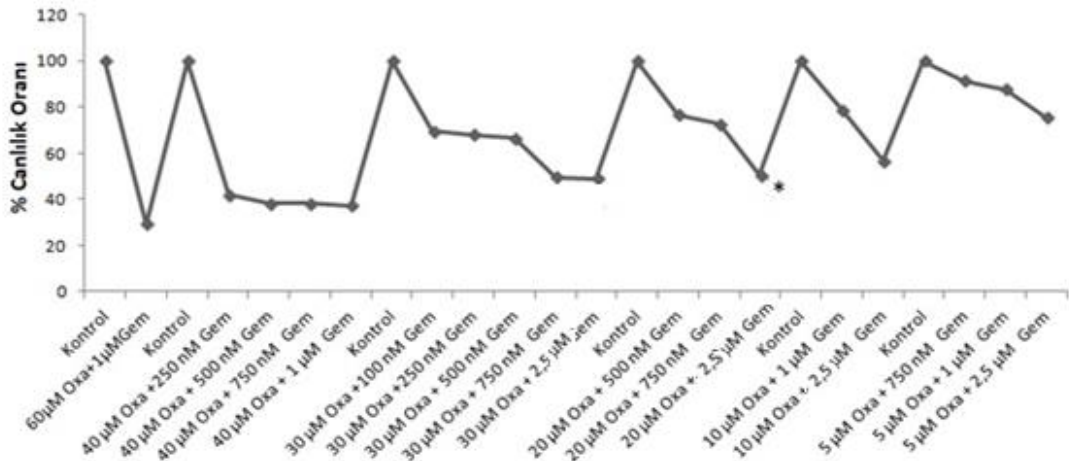
PC3 hücrelerinin oxaliplatin'e cevabı en düşük konsantrasyondaki (10  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı %93,7 en yüksek konsantrasyondaki (100  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığı ise % 8,8 bulundu. oxaliplatin 72 saat uygulandığında  $\text{IC}_{50}$  değeri 60  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ve canlılık oranları %49,75 olarak belirlendi (Şekil 3.8).



**Şekil 3.8.** PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) oxaliplatin ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları, \* IC<sub>50</sub> değeri.

### 3.1.5. Etkin Oxaliplatin+Gemsitabin Dozunun Belirlenmesi

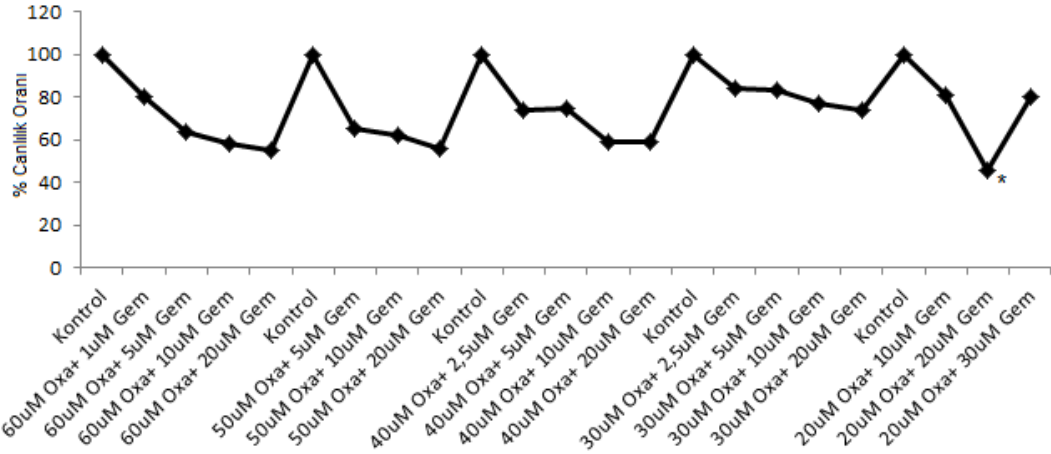
DU145 hücrelerinde gemsitabin ve oxaliplatin'in birlikte hücre canlılığına etkisinin araştırmak amacıyla 5 -60 µM oxaliplatin ve 0,250 – 2,5 µM gemsitabinin farklı dozları birlikte 72 saat uygulandığında IC<sub>50</sub> değeri 30 µM oxaliplatin + 1 µM gemsitabin konsantrasyonu ve canlılık oranları %49,7 olarak belirlendi (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** DU145 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 15 - 60 µM oxaliplatin ve 0,250 – 2,5 µM gemsitabin ile farklı kombinasyonlarının 72 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı, \* IC<sub>50</sub> değeri.

PC3 hücrelerinde gemsitabin ve oxaliplatin'in birlikte hücre canlılığına etkisinin araştırmak amacıyla 1 - 30 µM gemsitabin ve 20 - 60 µM oxaliplatin ile

farklı dozları birlikte 72 saat uygulandığında IC<sub>50</sub> değeri 20 µM oxaliplatin + 20 µM gemsitabin konsantrasyonu ve canlılık oranları %46 olarak belirlendi (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** PC3 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 15 - 60 µM oxaliplatin ve 0,250 - 2,5 µM gemsitabin ile farklı kombinasyonlarının 72 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen hücre canlılığı oranı, \* IC<sub>50</sub> değeri.

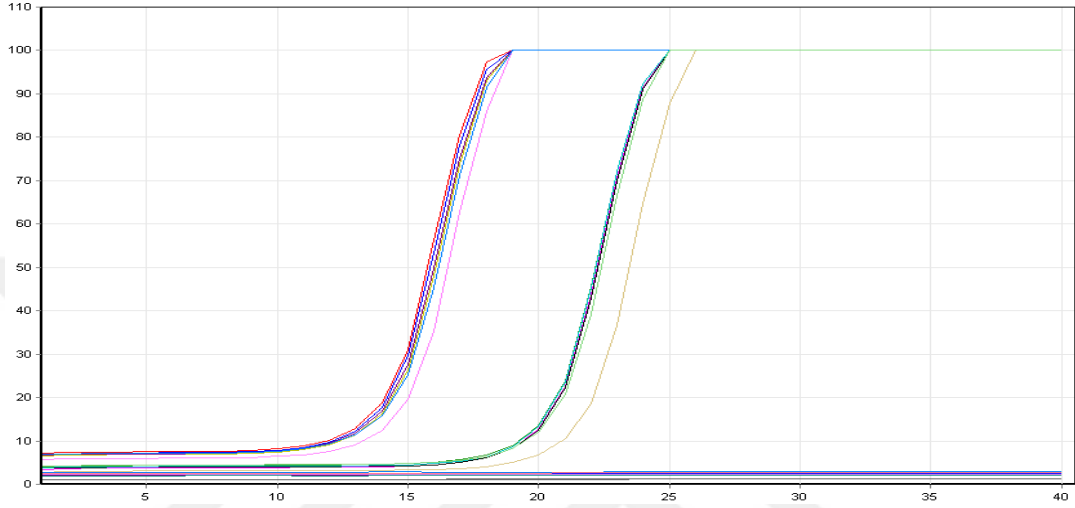
### 3.2.Gen İfade Düzeyinin Kantitatif Belirlenmesi

*CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için RotorGeneQ cihazı kullanılmıştır. DU145 ve PC3 hücrelerinden elde edilen cDNA'larda *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* genlerinin normalizasyonu için seçilen *GAPDH* (Gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz) (housekeeping) genine özgü primerler ve SYBR Green floresan boya kullanılarak çalışıldı.

Yapılan analiz sonucu prostat kanser hücrelerinde *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* ve *GAPDH* proteinini kodlayan genlerin ifade edildiği görülmüştür. Tüm örneklerde *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* Ct değerinin elde edilmesi çalışmada doğru mRNA dizisine bakıldığını ve çalıştığımız örneklerde *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* mRNA'sının varlığını doğruladı.

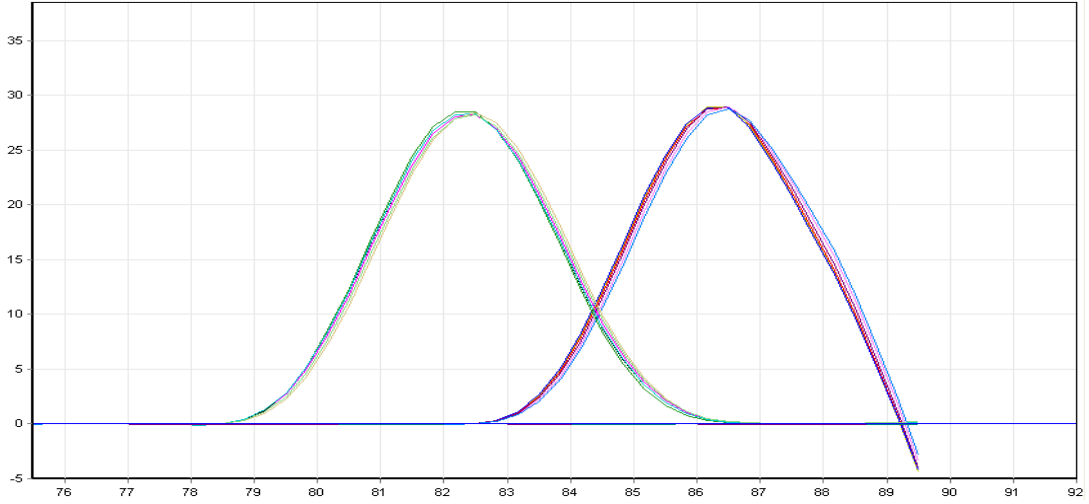
### 3.2.1.Kantitatif CASP3 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi

*CASP3* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 3.11’te gösterildi.



**Şekil 3. 11.** DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerine ait *CASP3* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. *CASP3* ve *GAPDH* geninin Real Time PCR tepkimesine ait Ct değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

*CASP3* ve *GAPDH* genlerinin mRNA ifade düzeyinin belirlenmesinde elde edilen floresans ışımının hedef bölgenin amplifikasyonu sonucunda gerçekleştiğini gösteren erime eğrisi (melting curve) Şekil 3.12’de gösterildi.



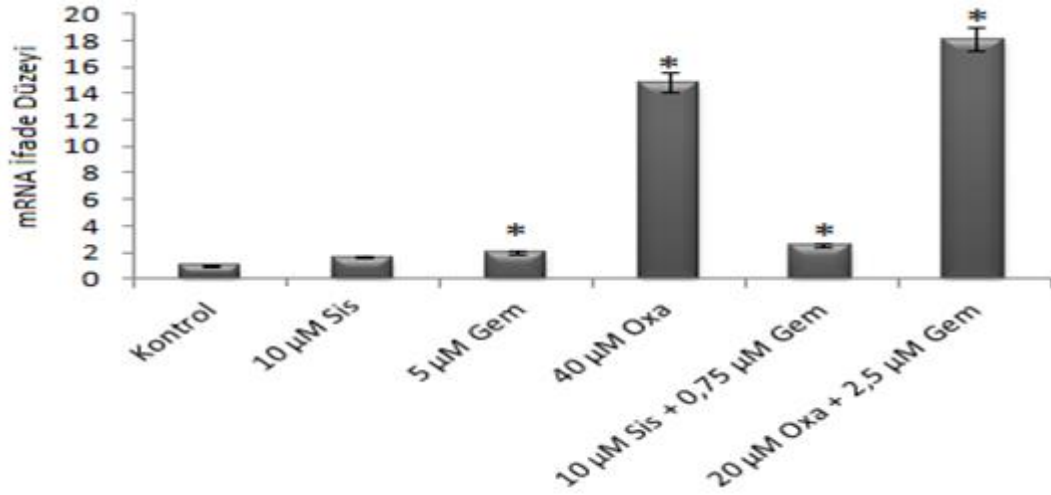
**Şekil 3.12.** DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin CASP3 ve GAPDH genlerine ait erime eğrileri. CASP3 ve GAPDH geninin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

DU145 prostat kanser hücrelerinin gemsitabin, sisplatin ve oxaliplatin'in ayrı ayrı ve birlikte kombinasyonlarının uygulaması sonrasında *CASP3* geninin mRNA düzeyindeki değişimler Tablo 3.1 ve Şekil 3.13'de gösterildi. *CASP3* geninin mRNA düzeyi kontrole göre 10  $\mu\text{M}$  sisplatin uygulaması sonrasında 1.65 kat artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi. Diğer gruplarda ise; 5 $\mu\text{M}$  gemsitabin ile muamele edilmesi sonrasında 2,04 kat, oxaliplatin uygulaması sonrasında 14.82 kat, 10  $\mu\text{M}$  sisplatin + 0,75  $\mu\text{M}$  gemsitabin uygulaması sonrasında 2.51 kat, arttığı belirlenmiş ve 20  $\mu\text{M}$  oxaliplatin + 2.5  $\mu\text{M}$  gemsitabin uygulanması sonrasında ise 18.12 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 3.1.** DU145 hücrelerinin *CASP3* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi. Koyu punto, Up regülasyonu göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

	Gen Adı	Kat Regülasyon Grup/Kontrol	Kat Değişimi Grup/Kontrol
<b>10 <math>\mu\text{M}</math> Sisplatin</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP3</i>	1.65	1.65
<b>5 <math>\mu\text{M}</math> Gemsitabin</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP3</i>	<b>2.04</b>	<b>2.04</b>
<b>40 <math>\mu\text{M}</math> Oxaliplatin</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP3</i>	<b>14.82</b>	<b>14.82</b>
<b>10 <math>\mu\text{M}</math> Sis + 0,75 <math>\mu\text{M}</math> Gem</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP3</i>	<b>2.51</b>	<b>2.51</b>
<b>20 <math>\mu\text{M}</math> Oxa + 2,5 <math>\mu\text{M}</math> Gem</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP3</i>	<b>18.12</b>	<b>18.12</b>



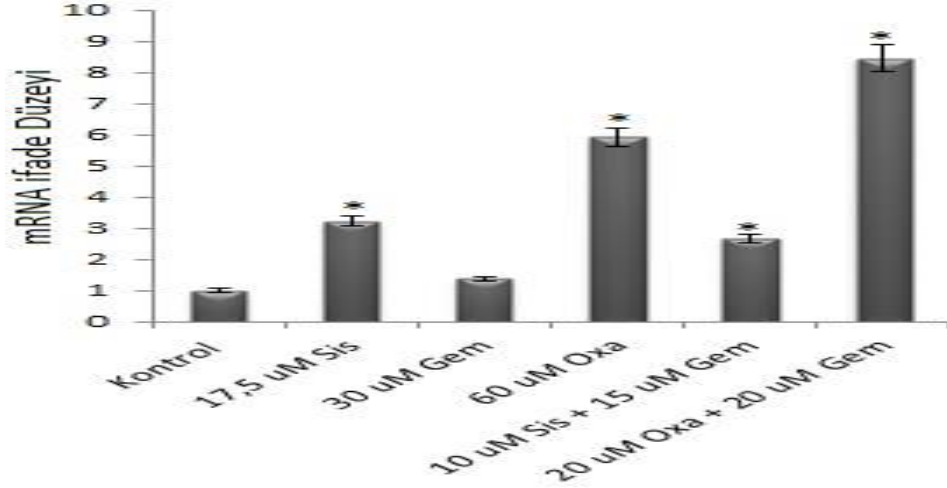


**Şekil 3.13.** DU145 hücrelerinde CASP3 geninin mRNA düzeyinde değişimleri . Hedef genin ifade düzeyi GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi, \*; ( $p < 0.05$ ).

PC3 prostat kanser hücrelerinin gemsitabin, sisplatin ve oxaliplatin'in ayrı ayrı ve birlikte kombinasyonlarının uygulaması sonrasında CASP3 geninin mRNA düzeyindeki değişimler **Tablo 3.2** ve **Şekil 3.14'**de gösterildi. CASP3 geninin mRNA düzeyi kontrole göre 30µM gemsitabin ile muamele edilmesi sonrasında 1.37 kat artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi. Diğer gruplarda ise; 17,5 µM sisplatin uygulaması sonrasında 3.22 kat, 60 µM oxaliplatin uygulaması sonrasında 5.93 kat, 10 µM sisplatin + 15 µM gemsitabin uygulaması sonrasında 2.65 kat, arttığı belirlenmiş ve 20 µM sisplatin + 20 µM gemsitabin uygulaması sonrasında 8.45 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 3.2.** PC3 hücrelerinin CASP3 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi. Koyu punto, Up regülasyonu göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

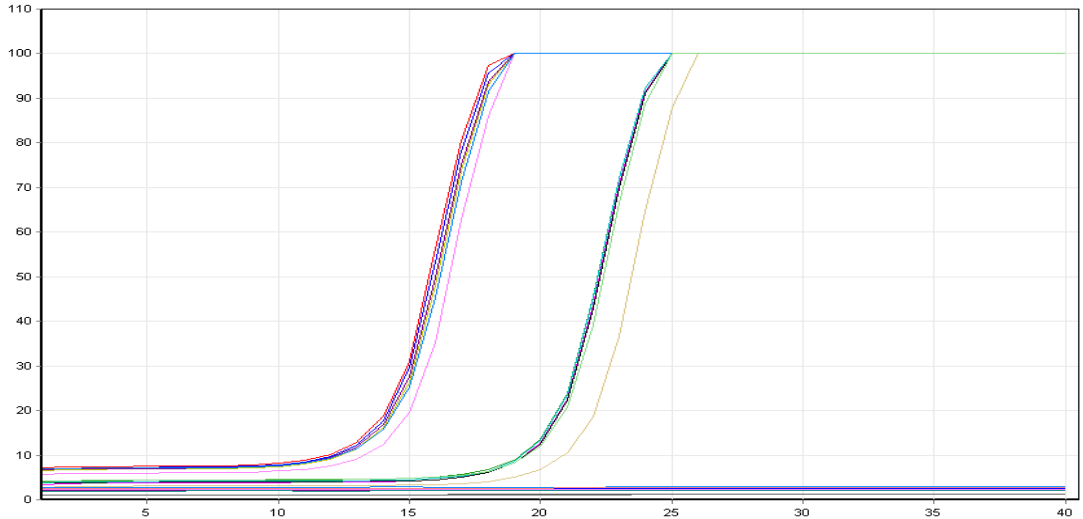
	Gen Adı	Kat Regülasyon Grup/Kontrol	Kat Değişimi Grup/Kontrol
<b>17,5 µM Sisplatin</b>	GAPDH	1.00	1.00
	CASP3	<b>3.22</b>	<b>3.22</b>
<b>30 µM Gemsitabin</b>	GAPDH	1.00	1.00
	CASP3	1.37	1.37
<b>60 µM Oxaliplatin</b>	GAPDH	1.00	1.00
	CASP3	<b>5.93</b>	<b>5.93</b>
<b>10 µM Sis + 15 µM Gem</b>	GAPDH	1.00	1.00
	CASP3	<b>2.65</b>	<b>2.65</b>
<b>20 µM Oxa + 20 µM Gem</b>	GAPDH	1.00	1.00
	CASP3	<b>8.45</b>	<b>8.45</b>



**Şekil 3.14.** PC3 hücrelerinin CASP3 geninin mRNA düzeyinde değişimler . Hedef genin ifade düzeyi GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi, \*; ( $p < 0.05$ ).

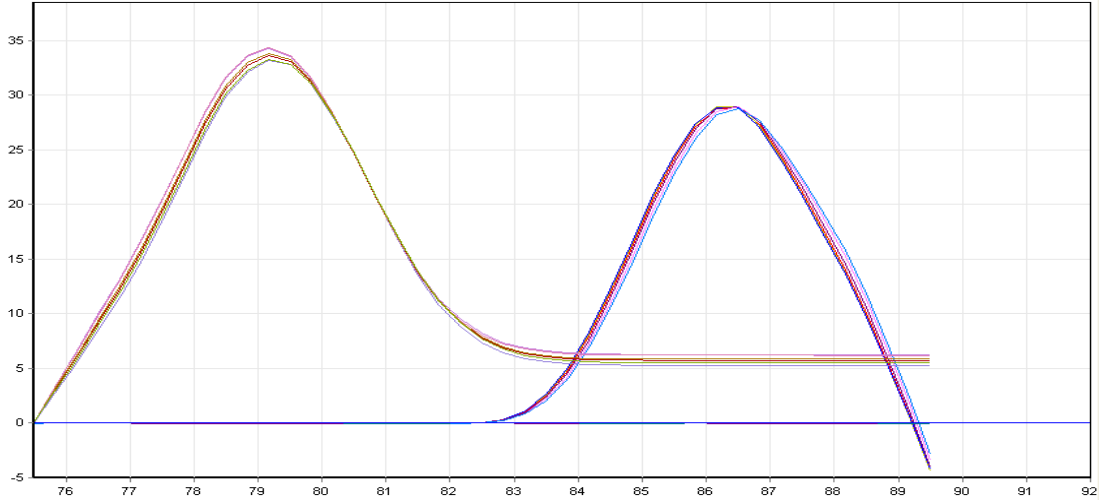
### 3.2.2. Kantitatif CASP8 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi

*CASP8* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi **Şekil 3.15** 'te gösterildi.



**Şekil 3.15.** DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerine ait CASP8 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. CASP8 ve GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Ct değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

*CASP8* ve *GAPDH* genlerinin mRNA ifade düzeyinin belirlenmesinde elde edilen floresans ışımanın hedef bölgenin amplifikasyonu sonucunda gerçekleştiğini gösteren erime eğrisi (melting curve) **Şekil 3.16** 'de gösterildi.

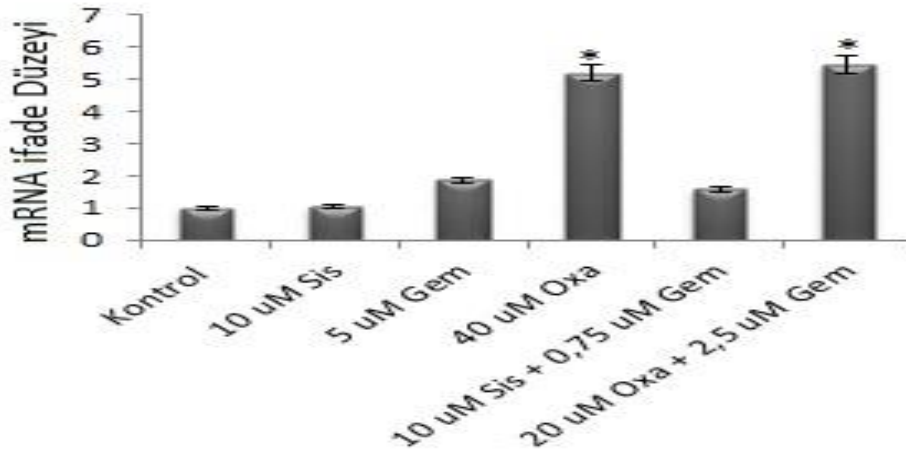


**Şekil 3.16.** DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin CASP8 ve GAPDH genlerine ait erime eğrileri. CASP8 ve GAPDH geninin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

DU145 prostat kanser hücrelerinin gemsitabin, sisplatin ve oxaliplatin'in ayrı ayrı ve birlikte kombinasyonlarının uygulaması sonrasında *CASP8* geninin mRNA düzeyindeki değişimler **Tablo 3.3** ve **Şekil 3.17'**de gösterildi. *CASP8* geninin mRNA düzeyi kontrole göre; 10  $\mu$ M sisplatin uygulaması sonrasında 1.06 kat, 5 $\mu$ M gemsitabin ile muamele edilmesi sonrasında 1.86 kat, 10  $\mu$ M sisplatin + 0,75  $\mu$ M gemsitabin uygulaması sonrasında 1.59 kat artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Diğer gruplarda ise; 40  $\mu$ M oxaliplatin uygulaması sonrasında 5.2 kat arttığı belirlenmiş ve 20  $\mu$ M oxaliplatin + 2,5  $\mu$ M gemsitabin uygulaması sonrasında 5.46 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.3.** DU145 hücrelerinin CASP8 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi. Koyu punto, Up regülasyonu göstermektedir ( $p<0.05$ ).

	Gen Adı	Kat Regülasyon Grup/Kontrol	Kat Değişimi Grup/Kontrol
10 $\mu$ M Sisplatin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	1.06	1.06
5 $\mu$ M Gemsitabin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	1.86	1.86
40 $\mu$ M Oxaliplatin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	<b>5.2</b>	<b>5.2</b>
10 $\mu$ M Sis + 0,75 $\mu$ M Gem	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	1.59	1.59
20 $\mu$ M Oxa + 2,5 $\mu$ M Gem	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	<b>5.46</b>	<b>5.46</b>

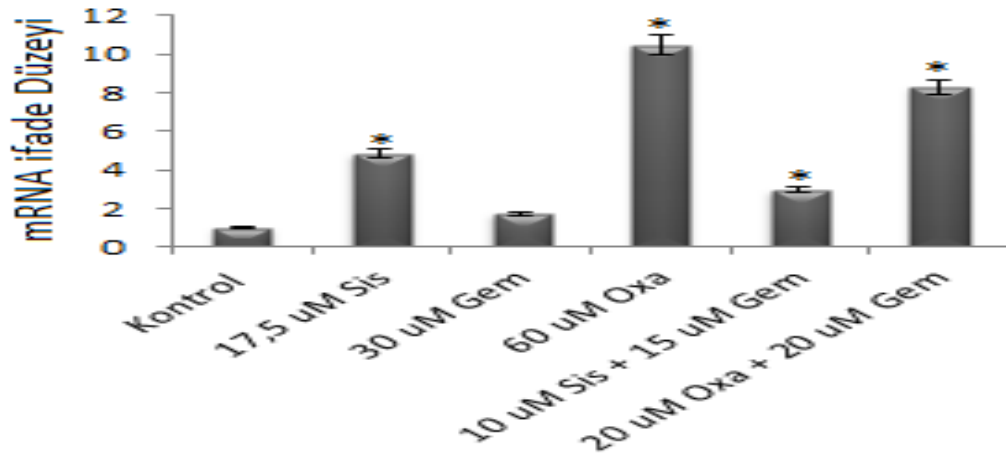


**Şekil 3.17.** DU145 hücrelerinin CASP8 geninin mRNA düzeyinde değişimler . Hedef genin ifade düzeyi GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi, \*; ( $p<0.05$ ).

PC3 prostat kanser hücrelerinin gemsitabin, sisplatin ve oxaliplatin'in ayrı ayrı ve birlikte kombinasyonlarının uygulaması sonrasında CASP8 geninin mRNA düzeyindeki değişimler **Tablo 3.4** ve **Şekil 3.18'**de gösterildi. CASP8 geninin mRNA düzeyi kontrole göre; 30 $\mu$ M gemsitabin ile muamele edilmesi sonrasında 1.72 kat artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi. 17,5  $\mu$ M Sisplatin uygulaması sonrasında 4.85 kat, 60  $\mu$ M oxaliplatin uygulaması sonrasında 10.48 kat, 10  $\mu$ M sisplatin + 15  $\mu$ M gemsitabin uygulaması sonrasında 2.94 kat ve 20  $\mu$ M oxaliplatin + 20  $\mu$ M gemsitabin uygulaması sonrasında 8.28 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.4.** PC3 hücrelerinin CASP8 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi. Koyu punto, Up regülasyonu göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

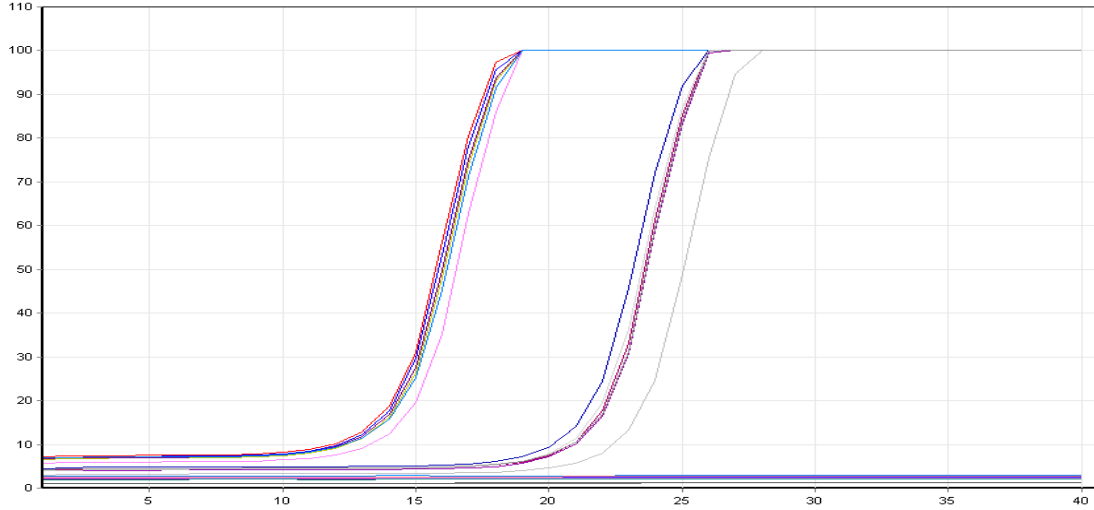
	Gen Adı	Kat Regülasyon Grup/Kontrol	Kat Değişimi Grup/Kontrol
17,5 $\mu$ M Sisplatin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	<b>4.85</b>	<b>4.85</b>
30 $\mu$ M Gemsitabin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	1.72	1.72
60 $\mu$ M Oxaliplatin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	<b>10.48</b>	<b>10.48</b>
10 $\mu$ M Sis + 15 $\mu$ M Gem	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	<b>2.94</b>	<b>2.94</b>
20 $\mu$ M Oxa + 20 $\mu$ M Gem	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP8</i>	<b>8.28</b>	<b>8.28</b>



**Şekil 3.18.** PC3 hücrelerinin CASP8 geninin mRNA düzeyinde değişimler. Hedef genin ifade düzeyi GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi, \*; ( $p < 0.05$ ).

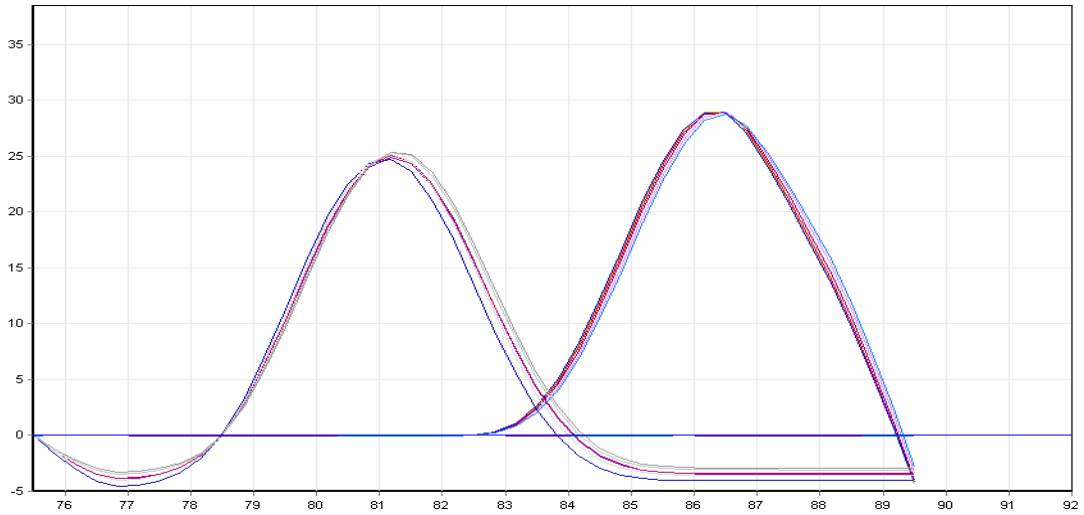
### 3.2.3. Kantitatif CASP9 Geninin İfade Düzeyinin Değerlendirilmesi

*CASP9* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi **Şekil 3.19'** da gösterildi.



**Şekil 3.19.** DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerine ait CASP9 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. CASP9 ve GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Ct değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

*CASP9* ve *GAPDH* genlerinin mRNA ifade düzeyinin belirlenmesinde elde edilen floresans ışımının hedef bölgenin amplifikasyonu sonucunda gerçekleştiğini gösteren erime eğrisi (melting curve) **Şekil 3.20**'de gösterildi.



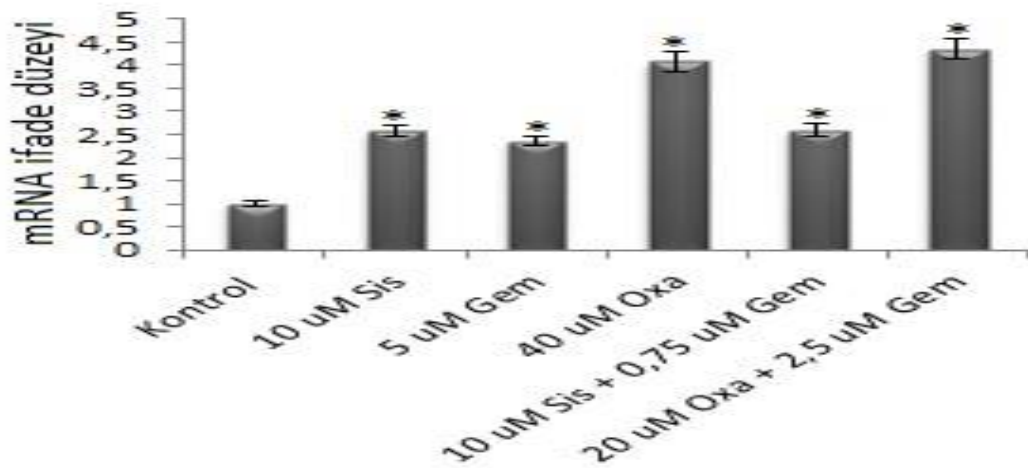
**Şekil 3.20.** DU145 ve PC3 prostat kanser hücrelerinin CASP9 ve GAPDH genlerine ait erime eğrileri. CASP8 ve GAPDH geninin Melting Curve analizine ait sıcaklık dereceleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

DU145 prostat kanser hücrelerinin gemsitabin, sisplatin ve oxaliplatin'in ayrı ayrı ve birlikte kombinasyonlarının uygulaması sonrasında *CASP9* geninin mRNA düzeyindeki değişimler **Tablo 3.5** ve **Şekil 3.21**'de gösterildi. *CASP9* geninin mRNA

düzei kontrole göre; 10  $\mu$ M sisplatin uygulaması sonrasında 2.58 kat, 5 $\mu$ M gemsitabin ile muamele edilmesi sonrasında 2.36 kat, 40  $\mu$ M oxaliplatin uygulaması sonrasında 4.08 kat, 10  $\mu$ M sisplatin + 0,75  $\mu$ M gemsitabin uygulaması sonrasında 2.6 kat arttığı belirlenmiş ve 20  $\mu$ M oxaliplatin + 2,5  $\mu$ M gemsitabin uygulaması sonrasında 4.34 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.5.** DU145 hücrelerinin CASP9 ve GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi. Koyu punto, Up regülasyonu göstermektedir ( $p<0.05$ ).

	Gen Adı	Kat Regülasyon Grup/Kontrol	Kat Değişimi Grup/Kontrol
<b>10 <math>\mu</math>M Sisplatin</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>2.58</b>	<b>2.58</b>
<b>5 <math>\mu</math>M Gemsitabin</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>2.36</b>	<b>2.36</b>
<b>40 <math>\mu</math>M Oxaliplatin</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>4.08</b>	<b>4.08</b>
<b>10 <math>\mu</math>M Sis + 0,75 <math>\mu</math>M Gem</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>2.6</b>	<b>2.6</b>
<b>20 <math>\mu</math>M Oxa + 2,5 <math>\mu</math>M Gem</b>	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>4.34</b>	<b>4.34</b>

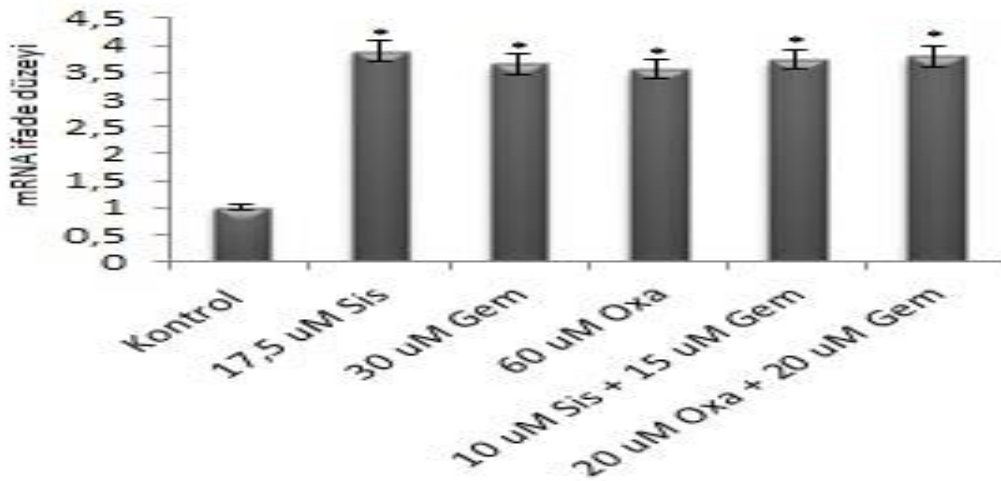


**Şekil 3.21.** DU145 hücrelerinin CASP9 geninin mRNA düzeyinde değişimler. Hedef genin ifade düzeyi GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi, \*; ( $p<0.05$ ).

PC3 prostat kanser hücrelerinin gemsitabin, sisplatin ve oxaliplatin'in ayrı ayrı ve birlikte kombinasyonlarının uygulaması sonrasında *CASP8* geninin mRNA düzeyinde meydana gelen değişimler **Tablo 3.6** ve **Şekil 3.22**'de gösterildi. *CASP8* geninin mRNA düzeyi kontrole göre; 17,5µM sisplatin uygulanması sonrasında 4.85 kat, 30µM gemsitabin ile muamele edilmesi sonrasında 3.65 kat, 60 µM oxaliplatin uygulanması sonrasında 3.55 kat, 10 µM sisplatin + 15 µM gemsitabin uygulaması sonrasında 3.73 kat ve 20 µM oxaliplatin + 20 µM gemsitabin uygulaması sonrasında 3.8 kat artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.6.** PC3 hücrelerinin *CASP9* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini Kat regülasyon ve Kat Değişim (Grup/Kontrol) kantitatif olarak gösterimi. Koyu punto, Up regülasyonu göstermektedir ( $p<0.05$ ).

	Gen Adı	Kat Regülasyon Grup/Kontrol	Kat Değişimi Grup/Kontrol
17,5 µM Sisplatin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>3.89</b>	<b>3.89</b>
30 µM Gemsitabin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>3.65</b>	<b>3.65</b>
60 µM Oxaliplatin	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>3.55</b>	<b>3.55</b>
10 µM Sis + 15 µM Gem	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>3.73</b>	<b>3.73</b>
20 µM Oxa + 20 µM Gem	<i>GAPDH</i>	1.00	1.00
	<i>CASP9</i>	<b>3.8</b>	<b>3.8</b>



**Şekil 3.22.** PC3 hücrelerinin *CASP9*geninin mRNA düzeyinde değişimleri. Hedef genin ifade düzeyi *GAPDH* mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi, \*; ( $p<0.05$ ).



#### 4. TARTIŞMA

Prostat kanseri, dünyada erkeklerde sıklıkla görülen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Prostat kanseri de dahil çeşitli kanser türleri tedavisinde sisplatin, oxaliplatin ve gemsitabin kullanılmaktadır (Curran, 2002, Zou ve ark. 2002). Buna karşın prostat kanserinin tedavisinde karşılaşılan zorluklar nedeniyle konu ile ilgili oldukça etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Zou ve ark. 2002). Özellikle kullanılan ilaçların tek başına ya da kombinasyonlarının yan etkileri dikkate alındığında bu ihtiyaç artmaktadır. Bu nedenle bu araştırmada prostat kanseri DU-145 ve PC3 hücre hatlarında, platin temelli kemoterapötik ilaçlar olan sisplatin ve oxaliplatinin tek başına yada gemsitabin ile kombinasyonu yapılarak bunların hücre proliferasyonu ve bazı kaspazlar üzerinden apoptoza olan etkileri ortaya konmaya çalışıldı.

Sisplatin, geniş spektrumlu anti-kanser ilaçlarından olup akciğer, baş, boyun ve ürogenital sistem ile ilişkili çok çeşitli tümörlerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Curran, 2002). Sisplatin DNA'nın yapısına kovalent bağlanmak suretiyle DNA replikasyonu ve translasyonunun bozulmasına yol açmakta ve hücrede sitotoksik etkiye neden olmaktadır (Liu ve ark. 2007). Ancak ilacın böbrek, ürogenital ve sinir sistemi ile kemik iliği üzerine olan ciddi toksisitesi ve yan etkileri sisplatinin klinik kullanımını sınırlamaktadır (Xiaodong ve ark., 2011). Bu sebeple Sisplatin dozunun azaltılması da klinik kullanımı için yeterli olmadığından ilacın farklı platin-temelli ilaçlarla kombinasyonu söz konusu olmaktadır.

Oxaliplatin ise Sisplatinin bir diaminosikloheksan türevi olup suda çözünürlüğü daha fazla ve toksik etkileri daha az oluşu ile karakterize bir ilaçtır (Di Francesco, 2002). Oxaliplatin, DNA'ya kovalent olarak bağlanarak, "DNA adduct'ı" meydana getirmektedir (Kweekel D.M. ve ark. 2005). Oxaliplatin, etkisini, primer olarak guanine DNA-platinum mono-adduct oluşturarak gösterir. Oluşan primer DNA-pt lezyonları apoptozisi indükler, DNA replikasyon ve transkripsiyonunu inhibe eder (Raymond ve ark. 1998).

Gemsitabin bir deoksitidin analogudur ve sitotoksik etkisini DNA sentezini inhibe etmek suretiyle göstermektedir. Bu etkiye göre Gemsitabin'in trifosforile edilmiş metaboliti olan dFdC trifosfat DNA zincirine eklenmekte, sonrasında ikinci bir nükleotidin eklenmesi ile Gemsitabin maskelenerek DNA eksisizyon onarım sisteminden kaçmaktadır (Gahr, 2007; Tharakan, 2010). İnvitro modelde, prostat kanseri hücre hatlarında, Gemsitabin'in kuvvetli anti-proliferatif etkisi gösterilmektedir (Cronauer ve ark., 1996). Pankreas, mesane, akciğer ve over kanseri gibi çok çeşitli solid kanserlerin de tedavisinde kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2014). Buna karşın ilacın etkin dozunun ateş, infeksiyon, anemi ve kemik iliğini baskılaması gibi yan etkileri de bildirilmektedir (Tharakan, 2010).

Kemoterapötiklerin, farklı kemoterapötiklerle veya spesifik inhibitörlerle birlikte kullanımının tedavi etkinliğini arttırdığı belirtilmektedir. Bu bağlamda gemsitabin ile oxaliplatin ve sisplatin kombinasyonlarının da pankreas ve mesane gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (Kollmannsberger ve ark., 2004; Louvet ve ark., 2005; Santisteban ve ark., 2008; Lee, 2014).

Genel olarak kemoterapötiklerin amacı kanserli hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edip onları programlanmış hücre ölümü olan apoptoza yönlendirmektir. Apoptoz genel olarak hücre sitoplazmasında iç ya da dış yollar üzerinden aktive olan ve sistein proteazlar olarak bilinen kaspazlar tarafından indüklenmektedir. Genellikle apoptoz iç sinyaller ile mitokondri aracılığı ile ya da ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile başlatıcı kaspazları harekete geçirmek şeklinde iki yoldan olmaktadır (Yoon ve Gores, 2002). İç yolda apoptozis uyarısı alınması halinde mitokondrideki apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1) ve sitokrom c sitoplazmaya geçmekte ve apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Bu kompleks prokaspaz 9'u aktif *CASP9*'a ve o da prokaspaz 3'ü aktif *CASP3*'e dönüştürmekte ve dışsal yolda görev alan *CASP8* de yine *CASP3*'ü aktifleştirmektedir. Aktifleşen *CASP3*, deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirdiğinde bu durum kromatin fragmentasyonuna neden olmaktadır (Scaffidi ve ark., 1998; Mignotte ve Vayssière, 1998; Hengartner, 2000; Sun ve ark., 2004).

*CASP3* mRNA düzeyleri açısından karşılaştırıldığında DU145 (10µM) hücre hattında 48 saatlik uygulamada sisplatin tek başına anlamlı artış göstermezken, tek

başına gemitabin ve sisplatin + gemitabin kombinasyonu daha etkin görülmektedir ( $p<0.05$ ). PC3 hücre hattında ise tek başına sisplatin ve sisplatin + gemitabin kombinasyonu daha etkin görülmektedir ( $p<0.05$ ). Elde edilen bu verilere göre gemitabin ve sisplatinin tek başına kullanımından ziyade kombinasyonlarının hem daha düşük dozlarda ve hem de yüksek oranda *CASP3* üzerinden apoptozise etkili olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada metastatik prostat kanserinde gemitabinin tek başına kullanılması ile PSA (Prostat spesifik antijen)'ya cevap oranı %9 iken, diğer kemoterapötikler ile kombine edildiğinde bu oranın %23'e çıktığı bildirilmektedir (Morant ve ark., 2000; Di Lorenzo ve ark., 2007). Benzer bir çalışmada ise ileri evre prostat duktal adenokarsinomlu hastaların bir ilaç olan dosetaksele karşı cevap vermezken gemitabin/sisplatin kombinasyonuna cevap vermesinin diğer bir tedavi seçeneği olduğu belirtilmektedir (Kamiyama ve ark., 2015).

Çalışmada DU145 (10 $\mu$ M) hücre hattında inkubasyon sonrası *CASP3* mRNA düzeyi kontrolle karşılaştırıldığında sisplatin hariç tüm uygulamalarda istatistik olarak artış gösterirken en yüksek artışın (18.22 kat) 72 saatlik uygulama ile oxaliplatin + gemitabin kombinasyonunda olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). PC3 (17,5  $\mu$ M) hücre hattında inkubasyon sonrası *CASP3* mRNA ekspresyon düzeyi kontrolle karşılaştırıldığında gemitabin hariç tüm gruptaki artış istatistik olarak anlamlı bulunurken, 72 saatlik uygulama ile oxaliplatin+ gemitabin kombinasyonunda (8.45 kat) artış en yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Bu sonuçlara göre prostat kanser hücrelerinde gemitabin + oxaliplatin kombinasyonunun sisplatin ile kombinasyonuna göre daha *CASP3* mRNA ekspresyonunu yüksek düzeyde indüklediği görülmektedir. Oxaliplatin açısından karşılaştırıldığında ise her iki hücre hattında da tek başına ve gemitabin + oxaliplatin kombinasyonunun istatistiki olarak *CASP3* mRNA düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar gemitabin'in bir diğer platin temelli kemoterapötik olan oxaliplatin ile kombinasyonunun güvenilirliği ve tolere edilebilirliğinin daha fazla olduğu bildirimleri ile uyumlu bulunmaktadır (Santisteban ve ark., 2008, Li ve ark., 2011, Lee ve ark., 2014).

Platin temelli kemoterapötikler olan sisplatin ve oxaliplatinin birbirlerinin türevi olmasına karşın etkilerinin aynı olmadığı ayrıca çeşitli kanser tiplerinde de etkinliklerinin farklı olduğu ortaya konmuştur (Marasco ve ark.2015). Genital

kanserlerde sispaltine göre oxaliplatinin daha etkin, güvenilir ve düşük nörotoksik profile sahip olduğu belirtilirken (Kolomeyevskaya Nonna ve ark., 2014), skuamöz hücre karsinomlarında ise etkinliğinin düşük olduğu ve rutinde sispaltinin yerini alamayacağı ifade edilmektedir (Fakhrian ve ark., 2014). Benzer bir çalışmada ise ileri evre mide kanserlerinde her iki ilacın da eşit aktivite ve toleransa sahip olduğu belirtilmektedir (Kim ve ark., 2013).

Çalışmada DU145 hücre hattında inkubasyon sonrası *CASP8* mRNA düzeyi kontrolle karşılaştırıldığında sadece oxaliplatin ile oxaliplatin + gemitabin kombinasyonunda anlamlı artış bulundu ( $p<0.05$ ). PC3 hücre hattında inkubasyon sonrası *CASP8* mRNA ekspresyon düzeyi kontrolle karşılaştırıldığında gemitabin hariç tüm gruplardaki artış istatistik olarak önemli bulunurken, oxaliplatindeki artış oranı ise (10.48 kat) en yüksek değer bulundu ( $p<0.05$ ). DU145 ve PC3 prostat kanser hücreleri her ne kadar androjen bağımsız olsalar da farklı sinyal molekülleri aktiftir. Bu nedenle özellikle *CASP8* mRNA düzeyini Sispaltin'in DU145 hattında etkilemezken PC3 hücre hattında istatistik olarak artırdığı görölmektedir. Bu sonuçlar göstermektedir ki, yalnızca oxaliplatin her iki hücre hattında da *CASP8* mRNA üzerinden dışsal yolağı uyarabilmektedir.

Çalışmada DU145 hücre hattında inkubasyon sonrası kontrolle karşılaştırıldığında *CASP9* mRNA düzeyi tüm uygulamalarda istatistik olarak artış gösterirken en yüksek artışın (4.34 kat) 72 saatlik uygulama ile oxaliplatin + gemitabin kombinasyonunda olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). PC3 hücre hattında ise kontrolle karşılaştırıldığında tüm gruplardaki artış istatistik olarak anlamlı bulunurken, sispaltin (3.89 kat) ve oxaliplatin + gemitabin kombinasyonundaki (3.8 kat) artış en yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Bu verilere göre gemitabin ve oksaliplatin kombinasyonunun *CASP9* üzerinden etkili olarak daha düşük dozda sinerjistik etki gösterdikleri sonucuna varılmaktadır. Ayrıca her 3 ilaç ve kombinasyonlarının her iki hücre hattında da *CASP9* üzerinden iç yolağı uyarabildiği görölmektedir.

*CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* mRNA düzeylerine bakıldığında sispaltin içsel yolak aracılığıyla *CASP3*'ü aktive ettiği ve oxaliplatin ise etkisini *CASP8* üzerinden yani dışsal yolak üzerinden apoptozu indüklediği görölmektedir. Bu bulgular

sisplatin ve oxaliplatinin hedef protein üzerinde farklı bölgelere bağlanmak suretiyle aktivitelerini gösterdikleri ifadesi ile desteklenmektedir (Marasco ve ark. 2015).



## 5. SONUÇ

Platin temelli kemoterapötik olan sisplatin özellikle ürogenital kanserin de içerisinde yer aldığı çeşitli solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak sisplatinin ciddi yan etkileri bulunduğundan bunun farklı türevlerinin kullanımı söz konusu olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda insan prostat kanser hücre hatları olan DU145 ve PC3 hücrelerinde gemitabinin tek başına ve platin temelli kemoterapötikler olan sisplatin ve oxaliplatin ile kombinasyonlarının hücre proliferasyonu ve apoptozis üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bu amaçla prostat kanserli hücre hatlarında gemitabin, sisplatin ve oxaliplatinin tek başlarına ve gemstabin ile kombine edilmiş dozları zamana bağlı olarak belirlendi. Uygun doz ve zaman belirlendikten sonra apoptotik yolda görevli olan kaspazlar; *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* genlerinin mRNA düzeyleri kontrol hücrelere göre kıyaslandı.

*CASP3*, *CASP8* ve *CASP9* genlerinin mRNA düzeylerinde ifadenmesinde sisplatinin içsel yolak (*CASP9*) aracılığıyla *CASP3*'ü aktive ettiği ve apoptozu indüklediği, oxaliplatinin ise etkisini dışsal yolak (*CASP8*) üzerinden gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlara göre her ne kadar oxaliplatin sisplatinin türevi olsa da hedef yolda farklı proteinler üzerinden apoptozisi etkiledikleri görülmektedir.

Sonuç olarak ilk kez prostat kanseri hücrelerinde sisplatin ve oksaliplatinin tek başlarına ve gemitabin ile kombinasyonunun apoptoz üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, sisplatinin içsel yolak ile oxaliplatinin ise dışsal yolak aracılığıyla apoptozu indüklediği ve oksaliplatinin sisplatinine nazaran hem tek başına hem de gemitabin ile kombinasyonunun apoptozu daha yüksek seviyede indüklediği belirlendi. Bunlara ilave olarak ciddi yan etkilerinden dolayı prostat kanseri tedavisinde kullanımı sınırlı olan sisplatinin yerine alternatif bir kemoterapötik ilaç olan oxaliplatinin ve bunun gemstabin ile kombinasyonlarının tedavi amaçlı uygulanmasına ilişkin daha ileri düzey araştırmalara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

## ÖZET

### GEMSİTABİN UYGULANAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA OXALİPLATİN VE SİSPLATİNİN KEMOTERAPÖTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ürogenital kanserler içerisinde erkeklerde görülme sıklığı açısından ilk sırada yer alan prostat kanseri, kanser ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Mevcut araştırmalar, spesifik hasta popülasyonlarında ilave avantajlar sağlamak için platin-temelli kemoterapötikler ile hedeflenmiş tedavi kombinasyonlarına odaklanmıştır. Cerrahi veya radyasyonu takiben platin bazlı kombinasyon kemoterapisi kullanımı en fazla yararı sağlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, platin temelli kemoterapötikler sisplatin ve oksaliplatin ile Gemsitabinin tek başına ve kombine dozlarının insan prostat kanserli hücre hatları olan DU-145 ve PC3 üzerindeki hücre proliferasyonu ve apoptotik yollar üzerine etkilerini belirlenmektedir. Prostat kanserli hücre hatlarında bu ilaçların tek başlarına veya kombine dozlarının, hücrelerin canlılığı üzerine olan etkileri WST-1 yöntemiyle ve CASP3, CASP8 ve CASP9 genlerinin mRNA düzeylerinde ifadenme değişiklikleri RT-PCR ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak, içsel ve dışsal yolda görev alan *CASP8* ve *CASP9* genlerinin mRNA düzeyleri değerlendirildiğinde Sisplatinin içsel yoldan (*CASP9*) ve oksaliplatinin ise dışsal yoldan (*CASP8*) apoptozu indüklediği tespit edildi. Bu göstermektedir ki; platin temelli kemoterapötik olan oksaliplatin ve sisplatinin hedef yolda farklı proteinler üzerinden etki etmektedir. Oksaliplatin tek başına veya gemsitabin ile kombinasyonlarının apoptotik yolda sisplatinden daha etkin olduğunu belirlendi.

**Anahtar sözcük:** Oksaliplatin, Sisplatin, Gemsitabin, Prostat kanseri, Kaspazlar

## SUMMARY

### THE DETERMINATION OF CHEMOTHERAPEUTIC EFFECTS OF OXALIPLATIN AND CISPLATIN IN THE PROSTATE CANCER CELL LINES ADMINISTERED GEMCITABINE

While prostate cancer takes first place in terms of prevalence among genitourinary cancers in men, it is second among cancer related deaths. Current researches are focused on combining targeted therapy with platinum-based chemotherapy for achieve additional advantages for specific patient populations. Use of platin-based combination chemotherapy followed by surgical resection and/or radiation ensures the most benefit therapy.

The aim of this study was to compare the effectiveness of platinum-based chemotherapeutics Cisplatin and Oxaliplatin used single or combination doses with Gemcitabine on apoptosis and cell proliferation of DU145 and PC3 human prostate cancer cell lines. The effects of drugs alone or combinations on cell viability were determined by WST-1 method. The mRNA expression levels of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 genes were analyzed by real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

As a result, when evaluated the mRNA levels of Caspase-8 and Caspase-9 genes that play role intrinsic and extrinsic pathway, it was found that Sisplatin induced apoptosis by intrinsic pathway, and Cisplatin induced apoptosis by extrinsic pathway. It is determined that, only Oxaliplatin or along with Gemcitabin combinations are more effective on apoptotic pathway than Sisplatin.

**Key Words:** Oxaliplatin, Cisplatin, Gemcitabine, Prostate cancer, Caspases



## KAYNAKLAR

- AKDAŞ, A., ÇEVİK, D. (1996). BPH-Benign Prostat Hiperplazisi. Hekimler Yayın Birliği, Ankara.
- AKŞİT, H., BİLDİK, A. (2008). Apoptozis, YYÜ Vet. Fak. Dergisi, **19(1)**: 55-63 s.
- AKTAN, Ç. (2013). Androjen Duyarlı ve Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri Hücre Serilerinde Androjen Reseptörünü Hedef Alan mRNA' nın Belirlenmesi ile Hedef Aldığı Diğer Genlerle Gelişen Direnç Mekanizmasının İncelenmesi. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi. İzmir
- CANATAN, H., HALİFEOĞLU, D., GÜRSU, M.F., ARDIÇOĞLU, A. (2004). Serum leptin düzeylerinin prostat kanserli ve benign prostat hiperplazili hastalarda ve sağlıklı kontrollerde (genç ve yaşlı) saptanması. Fırat Tıp Dergisi, **9**: 112- 115.
- CHAN, J.M., GIOVANNUCCI, E.L. (2001). Vegetables, fruits, associated micronutrients, and risk of prostate cancer. Epidemiologic Reviews, **23(1)**: 87-92.
- CHANEY, S.G., CAMPBELL, S.L., BASSETT, E., WU, Y. (2005). Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. Crit Rev Oncol Hematol, **53**: 3-11.
- CHEMISTRY PHYSICS. (2001). Sisplatin molekül yapısı [[http://chemistry-reference.com/q\\_compounds.asp?CAS=15663-27-1](http://chemistry-reference.com/q_compounds.asp?CAS=15663-27-1)] Erişim Tarihi: 06.05.2016
- COŞKUN, N. (2011). Gonadotoksisite de Asetil L- Carnitin'in testisteki koruyucu etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Histoloji Embriyoloji A.B.D., Gazi Üniversitesi, Ankara.
- CRAWFORD, L.J., WALKER, B., IRVINE, A.E. (2011). Proteasome inhibitors in cancer therapy. Journal of Cell Communication and Signaling, **5**: 101-110.
- CRONAUER, M.V., KLOCKER, H., TALASZ, H., GEISEN, F.H., HOBISCH, A., RADMAYR, C., BÖCK, G., CULIG, Z., SCHIRMER, M., REISSIGL, A., BARTSCH, G., KONWALINKA, G., (1996). Inhibitory effects of the nucleoside analogue gemcitabine on prostatic carcinoma cells. Prostate **28(3)**: 172–181.
- CURRAN, W.J. (2002). New chemotherapeutic agents: update of major chemoradiation trials in solid tumors. Oncology, **63(2)**: 29-38.

- DESOIZE, B., MODOULET, C. (2002). Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*, **42(3)**: 317-25. Review.
- DHANALAKSHMI, S., AGARWAL, P., GLODE, L.M., AGARWAL, R. (2003). Silibinin Sensitizes Human Prostate Carcinoma Du145 Cells To Cisplatin- And Carboplatin-Induced Growth Inhibition And Apoptotic Death. *Int. J. Cancer*: **106**: 699–705.
- DI FRANCESCO, A.M., RUGGIERO, A., RICCARDI, R. (2002). Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell. Mol. Life Sci*, **59**: 1914– 1927.
- DI LORENZO, G., AUTORINO, R., GIULIANO, M., MORELLI, E., GIORDANO, A., NAPODANO, G., RUSSO, A., BENINCASA, G., D'ARMIENTO, M., ALTIERI, V., DE PLACIDO, S. (2007). Phase II trial of gemcitabine, prednisone, and zoledronic acid in pretreated patients with hormone refractory prostate cancer. *Urology*, **69(2)**: 347–351.
- FAKHRIAN, K., ORDU, A.D., HALLER, B., THEISEN, J., LORDICK, F., BIŠOF, V., MOLLS, M., GEINITZ, H. (2014). Cisplatin- vs. oxaliplatin-based radiosensitizing chemotherapy for squamous cell carcinoma of the esophagus: a comparison of two preoperative radiochemotherapy regimens. *Strahlenther Onkol*, **190(11)**: 987-92.
- FUJIE, Y., YAMAMOTO, H., NGAN, C.Y., TAKAGI, A., HAYASHI, T., SUZUKI, R. (2005). Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. *Jpn J Clin Oncol*, **35(8)** : 453-63.
- GANDHI, V., PLUNKETT, W., (1990). Modulatory activity of 2' 2' difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinoside nucleoside. *Cancer Research*, **50(12)**: 3675-3680.
- GLEASON, D.F., (1992). Histologic grading of prostate cancer. A perspective. *Hum Pathol*, **23**: 273-279.
- HAUNG, P., PLUNKETT, W. (1995). Induction of apoptosis by gemcitabine. *Seminars in oncology*, **22(4)**: 19-25.
- HAYWARD, R.L., MACPHERSON, J.S., CUMMINGS, J., MONIA, B.P., SMYTH, J.F., JODRELL, D.I., (2004). Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Mol Cancer Ther*, **3(2)**: 169-178.
- HEINEMANN, V., PLUNKETT, W., (1992). Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potentialiation. *Cancer Res*, **52(3)**: 533-539.

- HENGARTNER, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**: 770–776.
- HERTEL, L.W., BODER, G.B., KROIN, J.S. (1990). Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine 2' 2'-difluorodeoxycytidine. *Cancer Research*, **50(14)**: 4417-4422.
- İŞLER O., (2012). Primer Prostat Kanserine Bağlı Kaspaz -2 Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., KONYA.
- JEMAL, A., CENTER, M.M., DESANTIS, C., WARD, E.M. (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, **19**: 1893-907.
- KAMIYAMA, Y., MITSUZUKA, K., WATANABE, M., KAWAMORITA, N., YAMADA, S., KAIHO, Y., ITO, A., NAKAGAWA, H., ARAI, Y. (2015). Chemotherapy with Gemcitabine and Cisplatin for Advanced Ductal Adenocarcinoma of the Prostate: Clinical Courses of Two Patients. *Tohoku J Exp Med*, **237(4)**: 317-321.
- KANEDA, K., KASHII, S., KUROSAWA, T., KANEKO, S., AKAIKE, A., HONDA, Y., MINAMI, M., SATOH, M. (1999). Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Research*, **815**: 11-20.
- KARANTANOS, T., EVANS, C.P., TOMBAL, B. (2014). Understanding the Mechanisms of Androgen Deprivation Resistance in Prostate Cancer at the Molecular Level. *Eur Urol.*, **67(3)**: 470-479.
- KEANE, R.W., KRAYDIEH, S., LOTOCK, G. (2001). Apoptotic and anti- apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**: 422-429
- KELLAND, L., (2007). The resurgence of platinum based cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*, **7**: 573-584 .
- KIDD, V.J., LAHTI, J.M., TEITZ, T. (2000). Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*, **11**: 191-201.
- KIM, Y.S., SYM, S.J., PARK, S.H., PARK, I., HONG, J., AHN, H.K., PARK, J., CHO, E.K., LEE, W.K., CHUNG, M., LEE, J.H., SHIN, D.B. (2013). A randomized phase II study of weekly docetaxel/cisplatin versus weekly docetaxel/oxaliplatin as first-line therapy for patients with advanced gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, **73(1)** :163-169.
- KOLLMANNNSBERGER, C., BEYER, J., LIERSCH, R., SCHOEFFSKI, P., METZNER, B., HARTMANN, J.T., RICK, O., STENGELE, K., HOHLOCH,

- K., SPOTT, C., KANZ, L., BOKEMEYER, C. (2004). Combination chemotherapy with gemcitabine plus oxaliplatin in patients with intensively pretreated or refractory germ cell cancer: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *J Clin Oncol* **22(1)**: 108–114.
- KOLOMEYEVSKAYA NONNA, V., LELE SHASHIKANT, B., MILLER AUSTIN, RIEBANDT, GRAZYNA, C., BLUM BONNIE, L., ODUNSI KUNLE, O., FREDERICK, PETER J. (2014). Oxaliplatin is a safe alternative option for patients with recurrent gynecologic cancers after hypersensitivity reaction to Carboplatin. *official journal of the International Gynecological Cancer Society*, **25**: 42-48
- KOLONEL, LN. (2001). Fat, meat and prostate cancer. *Epidemiologic Reviews*, **23(1)**: 72-81.
- KONAC, E., VAROL, N., KİLİCİOĞLU, I., BİLEN, C.Y. (2015). Synergistic effects of cisplatin and proteasome inhibitor bortezomib on human bladder cancer cells. *Oncol Lett.*, **10(1)**:560-564.
- KOOCHEKPOUR, S., (2011). Genetic and epigenetic changes in human prostate cancer. *Iran Red Crescent Medical Journal*, **13(2)**: 80-98.
- KUO, M.T., CHEN, H.H., SONG, I.S., SAVARAJ, N., ISHIKAWA, T., (2007). The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.*, **26(1)**: 71-83.
- KWEEKEL, D.M., GELDERBLOM, H., GUCHELAAR, H.J., (2005). Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treatm. Rev*, **31**: 90–105.
- LEE, D., SCOTT, A.L., JERRY, A.L., (2000). Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J Biol Chem*, **275**: 16007- 16014.
- LEE, J.L., CHOI, J.H. , KIM, Y., HONG, S.W. , LEE, K.H. , JEONG, I.G. , SONG, C., HONG, B.S. , HONG, J.H., AHN, H. (2014). Gemcitabine–oxaliplatin plus prednisolone is active in patients with castration-resistant prostate cancer for whom docetaxel-based chemotherapy failed. *British Journal of Cancer*, **110**: 2472–2478.
- LI, M, ONA, VO, CHEN, M. (2000). Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase 1 and 3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, **99**: 333-342.
- LI, Z., HOU, M., WANG, H., WANG, Z., (2011). A randomized study of gemcitabine plus oxaliplatin versus gemcitabine plus cisplatin as the 1st line chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer in elderly patients. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, **14(7)**: 588-92.

- LIU, Y., CHEN, L., HE, X., FAN, L., YANG, G., CHEN, X., LIN, X., DU, L., LI, Z., YE, H., MAO, Y., ZHAO, X., WEI, Y. (2007). Enhancement of therapeutic effectiveness by combining liposomal honokiol with cisplatin in ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer* Volume, **18(4)**: 652–659
- LOUVET, C., LABIANCA, R., HAMMEL, P., LLEDO, G., ZAMPINO, M.G., ANDRE, T., ZANIBONI, A., DUCREUX, M., AITINI, E., TAÏEB, J., FAROUX, R., LEPERE, C., DE GRAMONT, A. (2005). Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: Results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol*, **23(15)**: 3509–3516.
- MARASCO, D., MESSORI, L., MARZO, T., MERLINO, A., (2015). Oxaliplatin vs. cisplatin: competition experiments on their binding to lysozyme. *Dalton Trans.* **44(22)**: 10392-10398.
- MARK, J. S. (2008). Lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia (LUTS/BPH): More than treating symptoms? *Eur Urology*, **7**: 680–689.
- METE, Ç. (2005). Kronik prostatit/Kronik pelvik ağrı sendromu, *Türk Üroloji Dergisi*, **31**: 569-573.
- MIGNOTTE, B., VAYSSIERE, J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. *European Journal of Biochemistry* **252**: 1–15.
- MOHAMMED, M.Q., RETSAS, S. (2000). Oxaliplatin is active *in vitro* against human melanoma cell lines: comparison with cisplatin and carboplatin. *Anticancer Drugs*, **11(10)** : 859-863
- MORANT, R., BERNHARD, J., MAIBACH, R., BORNER, M., FEY, M.F., THURLIMANN, B., JACKY, E., TRINKLER, F., BAUER, J., ZULIAN, G., HANSELMANN, S., HURNY, C. (2000). Response and palliation in a phase II trial of gemcitabine in hormone-refractory metastatic prostatic carcinoma. *Ann Oncol* **11(2)**: 183–188.
- MOSCONI, A.M., CRINO, A.L., KAPLAN, P.C., GOODMAN, J. (1997). Combination therapy with gemcitabine in non-small cell lung cancer. *European Journal of cancer*, **33(1)**: 14-17.
- NAGATA, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**: 355-365.
- NORBERG, E., ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. (2010). Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun*, **396**: 95-100.

- OZAWA, H., KEONE, R.W., MARCILLA, A.E. (2002). Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, **177**: 306-313.
- PETERS, G. J., RUIZ VAN HAPEREN, V. W. T., BERGMAN, A. M., VEERMAN, G. (1996). Preclinical combination therapy with gemcitabine and mechanism of resistance, *Seminars in Oncology*, **23(5)**: 16-24.
- PIENTA, K.J., BRADLEY, D. (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, **12**: 1665-1671.
- POLAT N.D. (2015). Kolorektal Kanserli Hastalarda Platin, Fluoropirimidin ve İrinotekan Dirençlerinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Denizli
- RAYMOND, E., CHANEY, S.G., TAAMMA, A., CVITKOVIC, E. (1998). Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol*, **9**: 1053-1071
- RENTSCH, C.A., CECCHINI, M.G., THALMANN, G.N. (2009). Loss of inhibition over master pathways of bone mass regulation results in osteosclerotic bone metastases in prostate cancer. *Swiss Medical Weekly*, **139(15-16)**: 220-225.
- RICCI, J.E., GOTTLIEB, R.A., GREN, D.R. (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biology*, **160**: 65-75.
- RUIZ VAN HAPEREN, V. W. T., VEERMAN, G., VERMORKEN, J.B. (1993). 2'-2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumor cell lines, *Biochemical Pharmacology*, **46 (4)**: 762-766.
- SANTISTEBAN, M., PÉREZ-GRACIA, J.L., CEBALLOS, J., VIVAS, I., GARCIA-FONCILLAS, J. (2008). Oxaliplatin plus gemcitabine as a salvage schedule for hormone-refractory prostate adenocarcinoma. *Clin Transl Oncol*, **10(6)**: 372-374.
- SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., FRIESEN, C., LI, F., TOMASELLI, K.J., DEBATIN, K.M., KRAMMER, P.H., PETER, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* **17**: 1675-1687.
- SCHNEIDER, A.S., SZANTO PA. (2004). Patoloji. (Çev. Önal, BÜ ve Kaçar, A 2.Baskı), Ankara, Ertem Matbaası.
- SHAND, R.L., GELMANN, E.P. (2006). Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol*, **16**: 123-131.

- SIDDIK, Z.H., (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, **22**: 7265-7279.
- SIGMA ALDRICH. (2016). Oxaliplatin molekül yapısı [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/oxaliplatin397296182594311?lang=en&region=TR] Erişim tarihi: 06.05.2016
- SUN, S.Y., HAIL, J.R., LOTAN, R.. (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, **96**: 662–672.
- TOMATIR, A.G. (2003). Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci.*, **23**: 499-508.
- TUNALI, M. (2002). Apoptozis, periodontal doku sağlığı ve patolojilerinde rolü, Doktora semineri, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji A.B.D., Konya.
- TÜFEKÇİ, Ö., GÜNEŞ, D., ÖZOĞUL, C., KOLATAN, E., ALTUN, Z., YILMAZ, O., AKTAŞ, S., ERBAYRAKTAR, Z., KIRKIM, G., MUTAFOĞLU, K., SOYLU, A., ŞERBETÇİOĞLU, B., GÜNERİ, E.A., OLGUN, N. (2009). Evaluation of the effect of acetyl L -Carnitine on experimental cisplatin nephrotoxicity, *Chemotherapy*, **55**: 451–459.
- UENO, H., KIYOSAWA, K., KANIWA, N.J. (2007). Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy? *Br J Cancer*. **97(2)**: 145–151.
- ULUKAYA, E. (2003). Apoptozis Ders Notları Ankara.
- VERMA, M., PATEL, P., VERMA, M. (2011). Biomarkers in prostate cancer epidemiology. *Cancers*, **3(4)**: 3773-3798.
- WANG, D., LIPPART, S.J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nat Rev Drug Discov*, **4**: 307-320 p.
- WARNER, T.F. (1972). Apoptosis. *Lancet*, **2**: 1252-258.
- WIKIMEDIA. (Ocak 2016). Gemcitabin molekül yapısı [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gemcitabine.svg] Erişim Tarihi: 06.05.2016
- XU, Y.Z., PLUNKETT, W. (1992). Modulation of deoxycytidylate deaminase in intact human leukemia cells: action of 2' 2'- difluoro deoxycytidine, *biochemical Pharmacology*, **44(9)**: 1819-1927.
- YOON, J.H., GORES, G.J. (2002). Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *Journal of Hepatology*, **37**: 400–410.

- YOULANDA, T.L., PHARM, D., MYRA, T., PHARM, D. (2005). Monotherapy versus combination drug therapy for the treatment of benign prostatic hyperplasia, *Am J Geriatr Pharmacother*, **3**: 103-114.
- ZAANAN, A., MEUNIER, K., SANGAR, F., FLEJOU, J.F., PRAZ, F. (2011). Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cell Oncol (Dordr)*, **34**: 155-176.
- ZHANG, Z., KREPS, C.J., GUTH, L. (1997). Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol*, **143**: 141-152.
- ZORBAS, H., KEPLER, B.K. (2005). Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? *Chembiochem*, **6(7)**: 1157-1166.
- ZOU, Z., ZHANG, W., YOUNG, D., GLEAVE, M.G., RENNIE, P., CONNELL, T., CONNELLY, R., MOUL, J., SRIVASTAVA, S., SESTERHENN, I. (2002). Maspin expression profile in human prostate cancer (CaP) and in vitro induction of Masp in expression by androgen ablation. *Clin Cancer Res.*, **8(5)**: 1172-1177.



## ÖZGEÇMİŞ

DOĞUM TARİHİM : 21.03.1991

DOĞUM YERİM : ÇANKAYA / ANKARA

TEL. NUMARAM : 0530 200 43 76

MAİL ADRESİM : harzu\_ozyurek@hotmail.com

EĞİTİMİM : (2009-2013) AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ  
(2014-2016) AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
VETERİNER FAKÜLTESİ BİYOKİMYA A.D.

### LABORATUVAR DENEYİMLERİM

2009-2014 AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

2011-2014 AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA  
ANABİLİMDALI MOLEKÜLER BİYOKİMYA

2012-2013 AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ  
KİMYA BÖLÜMÜ BİYOKİMYA A.D.

01.09.2014-21.11.2014 AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ VETERİNER  
FAKÜLTESİ ANALİZ TEŞHİS LABORATUVARI

22.11.2014- Halen AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ  
GENETİK A.D.

## KATILDIĐIM ALIŐMALAR

- P-036-Aspirinin Er Stres Modelli Pankreas Beta Hücre Kltrnde Dna Hasarı ve Oksidan Denge zerine Etkisi
- Resveratrol, Thyoquinone And Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibit Pseudomonas Aeruginosa Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Cell Death in Human Alveolar Epithelial A549 Cells
- Anticancer Effects Of Thymoquinone, Caffeic Acid Phenethyl Ester and Resveratrol On A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells Exposed to Benzo(A) Pyrene
- Comparison of The Anti-Inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthal on Benzo(A)Pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line.