

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

**PROSTAT KANSERİ PC3 ve DU 145 HÜCRE
HATLARINDA, DOSETAKSEL ve KURKUMİNİN
ANJİYOGENEZ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ceren KAYĞUSUZ

Referans no: 10190458

EDİRNE-2018

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

**PROSTAT KANSERİ PC3 ve DU 145 HÜCRE
HATLARINDA, DOSETAKSEL ve KURKUMİNİN
ANJİYOGENEZ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Ceren KAYĞUSUZ

Destekleyen Kurum : TÜBAP-2016/211

Tez No:

EDİRNE-2018

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Ceren KAYĞUSUZ tarafından tez başlığı “Prostat Kanseri PC3 ve DU 145 Hücre Hatlarında, Dosetaksiel ve Kurkuminin Anjiyogenez Üzerindeki Etkisi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 14/05/2018 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR
JÜRI BAŞKANI

İmza

Doç. Dr. Hilmi TOZKIR
ÜYE

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Avni EROĞLU
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, laboratuvar çalışmalarım süresince bilgisi ve yardımlarıyla destek olan hocam Doç.Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a, bu süreçte yanımda olan bölüm arkadaşlarım Ayten DOĞAN ve Melis KELEŐ'e, tez çalışmamı proje olarak destekleyen TÜBAP'a, eğitim hayatım boyunca maddi manevi yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Ayrıca tezimi, kanserden kaybettiğim babam Musa KAYĞUSUZ'a ve kanserle mücadele eden annem Yıldızhan KAYĞUSUZ'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
PROSTAT BEZİNİN YAPISI	3
PROSTAT KANSERİ	5
TÜMÖR METASTAZI	12
ANJİYOGENEZ	13
DOSETAKSEL	26
KURKUMİN	28
GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
BULGULAR	52
TARTIŞMA	133
SONUÇLAR	140
ÖZET	143
SUMMARY	145
KAYNAKLAR	147
ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ	162
ÖZGEÇMİŞ	172
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AKT	: Protein Kinaz B
ANG	: Anjiyopoetin
ATCC	: American Type Culture Collection
bFGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BHP	: Bening Prostat Hiperplazisi
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
COX-2	: Siklooksigenaz-2
DMEM	: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DU-145	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Serisi
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetikasit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMEM	: Minimum Essential Medium Eagle's
EMT	: Epitelyal Mezenşimal Geçiş
FAK	: Fokal Adhezyon Kinaz
FBS	: Fetal Bovin Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	: Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz

HIF-1α	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1-Alfa
HIF-1β	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör 1-Beta
IC₅₀	: İnhibisyon konsantrasyon 50
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü
IL-6	: İnterlökin-6
INOS	: İnduklenebilir Nitrik Oksid Sentaz
ISUP	: International Society of Urological Pathology
LNCaP	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Serisi
MAPK	: Mitojen-Active Protein Kinaz
MMP	: Matriksmetallopeptidaz
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MT-MMP	: Membran Tipi MMP
mTOR	: Mechanistic Target of Rapamycin
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nM	: Nanomolar
PAI-1	: Plasminogen Activator İnhibitor-1
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PC-3	: İnsan Prostat Kanseri Hücre Serisi
PCa	: Prostat Kanseri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet-Bağımlı Büyüme Faktörü
PGF	: Plasental Büyüme faktörü
PHD 1	: Prolil Hidroksilaz Domain 1
PI	: Fosfatidil inositol
PI3K	: Fosfatidil inositol 3-kinaz
PIP	: Fosfatidil inositol-4-fosfat
PIP2	: Fosfatidil inositol-4,5-bisfosfat
pRB	: Retinoblastoma proteini
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz

RT-qRT	: Reverse Transkriptaz-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAMs	: Tumor-Associated Macrophages
TGF-β	: Transforming Büyüme Faktör-Beta
TNFR	: Tumor Nekroz Faktör Reseptör
TNF-α	: Tumor Nekroz Faktör-alpha
TRUS	: Transrektal Ultrason
VBM	: Vasküler Bazal Membran
VEGF	: Vascular Endothelial Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vascular Endothelial Büyüme Faktörü Reseptörü
VPF	: Vasküler Permeabilite Faktörü



GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin genetik ve çevresel koşulların etkisi altında kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesi sonucunda ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Bilinen 200'den fazla kanser türü bulunmaktadır (1, 2). Prostat kanseri, gelişmiş ülkelerde en sık görülen kanser türlerinden biridir. Endüstrileşmiş ülkelerde yaygın olarak görülmekte olup, akciğer kanserinden sonra ölümlerle sonuçlanan kanser vakalarında ikinci sırada yer almaktadır (3). Prostat kanserinin tedavisi için radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır (4). Ancak bu yöntemlerin avantajlı yönleri olmasına rağmen, dezavantajlı yönleri de bulunmaktadır. Bu nedenle belirtilen tedavilere ek olarak immünolojik ve biyolojik tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (5).

Anjiyogenez, tümörlerin yeni kılcal damarları geliştirebileceği bir süreçtir (6). Anti-tümör ilaç geliştirmede anjiyogenezin inhibisyonu potansiyel bir hedefdir (7).

Taksan sınıfına ait bir molekül olan Dosetaksel, *Taxus baccata*' dan elde edilen antineoplastik bir ajandır (8). Mikrotübülleri stabilize ederek hücre döngüsünün G2/M fazındaki hücreleri bloke ettiği ve sonunda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (9). Ayrıca birçok kemoterapötik ajanın migrasyon ve anjiyogenez üzerinde önleyici etkisi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda Dosetaksel'in de hem in vitro hem de in vivo koşullar altında anjiyogenezi inhibe ettiği bildirilmiştir (10).

Pleotropik bir molekül olan Kurkumin, Zerdeçal (*Curcuma Longa*) bitkisinin rizomundan (*Rhizoma Curcumae*) elde edilmektedir. Güçlü bir anti-inflamatuardır. Prostat kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde, hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve apoptozu arttırarak aynı anda birden fazla sinyal yolunu etkilediği bildirilmektedir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda pro-anjiyogenik proteinleri baskılayarak, anjiyogenez inhibitörü olduğu gösterilmiştir (11).

Bu bilgiler ışığında; çalışma ile insan prostat kanseri hücre serisi olan DU-145 ve PC-3' de Kurkuminin ve kemoterapötik bir ajan olan Dosetaksel'in anjiyogenez üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

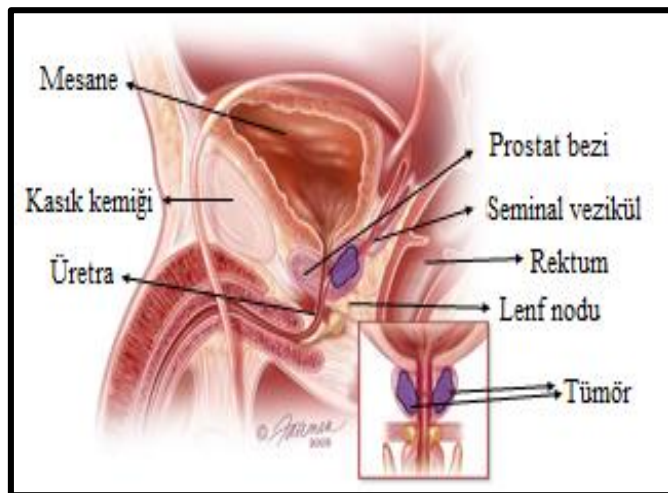


GENEL BİLGİLER

PROSTAT BEZİNİN YAPISI

Prostat Bezinin Anatomisi ve Histolojisi

Prostat, erkek üreme sisteminde bulunan 18 gram ağırlığında, 3 cm uzunluğunda, 4 cm genişliğinde, 2 cm kalınlığında, içerisinden prostatik üretra geçen ters koni biçiminde, fibromuskuler ve glandular bir organdır (12). Kısmen tubuloalveoler bezlerden kısmen de bu bezlerin arasını dolduran ara dokudan yapılmış olup, üstte mesane boynu ile altta ürogenital diafragma arasında uzanır (13). Prostat yoğun düz kas yapısından oluşan fibröz bir kapsülle çevrilidir (12) (Şekil 1).



Şekil 1. Prostat bezinin anatomisi (14)

Fibromusküler stroma ve glandular epitelyal hücrelerden oluşan normal yetişkin prostatında bu iki bölge, dengede olan hücre çoğalmasını ve hücre ölüm düzeyini korumaktadır. 1980 yılında neoplastik sürecin durumunu tanımlamak için McNeal bölgesel anatomi modelini geliştirmiştir. McNeal'e göre normal prostat içinde 4 önemli zon bulunmaktadır (15)(Şekil 2).

Bunlar;

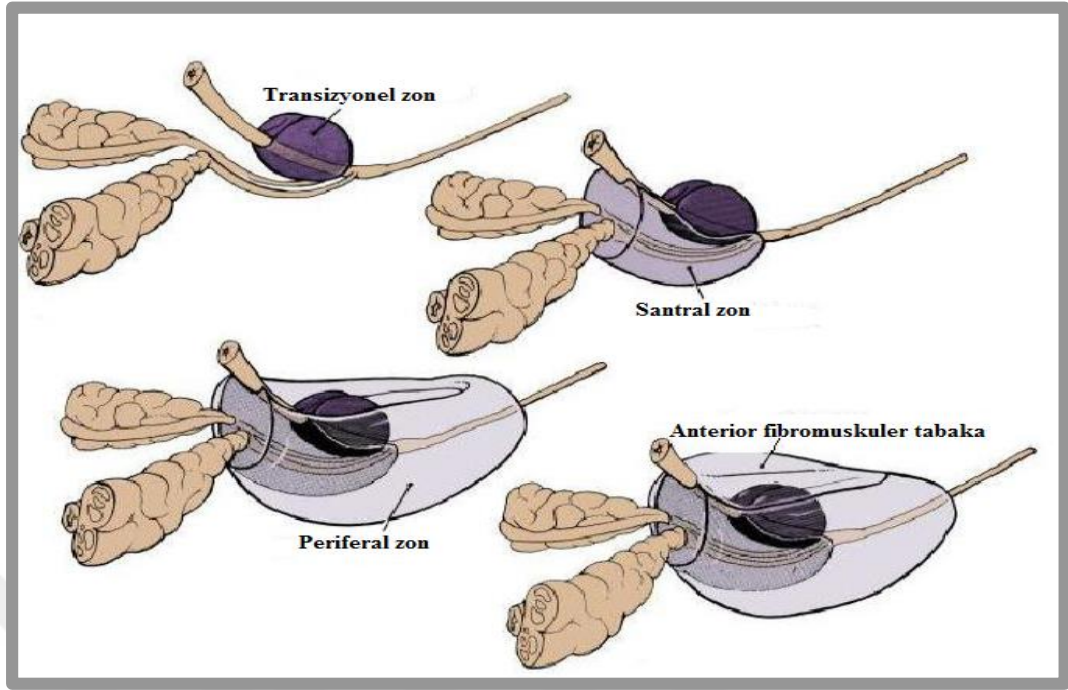
- 1) Periferal zon
- 2) Santral zon
- 3) Transizyonel zon
- 4) Fibromusküler stroma

1) Periferal Zon: Periferal zon, glandular dokunun %70'ini içermektedir. Distal üretra etrafındaki prostat bezinin posterior yönünün alt kapsüler kısmıdır. Prostat karsinomlarının %75'i bu zondan kaynaklanmaktadır.

2) Santral Zon: Santral zon, glandular dokunun %25'ini oluşturmaktadır. Ejakülasyon kanalları bu zon ile çevrilidir. Santral zon tümörleri, prostat karsinomlarının % 5-10'unu oluşturur. Ancak bu bölgedeki kanserler, agresif olma eğilimindedir.

3) Transizyonel Zon: Transizyonel zon, üretranın çevresinde, distal ve proksimal üretranın birleşim yerinde yer alır. Glandular dokunun sadece % 5 'ini oluşturur ancak fonksiyonel önemi çok fazladır. Prostat karsinomlarının %10-20'si transizyonel zonda gerçekleşir. Selim prostat büyümesi olan BPH (Bening Prostat Hiperplazisi) de transizyonel zon kaynaklıdır.

4) Fibromusküler Stroma: Glandular yapı içermeyen sadece kas ve fibröz dokudan oluşan fibromusküler stroma, bezin yaklaşık % 5' ini oluşturmaktadır. Prostatın tüm ön yüzeyini, koruyucu bir kılıf gibi sarar (16, 17).

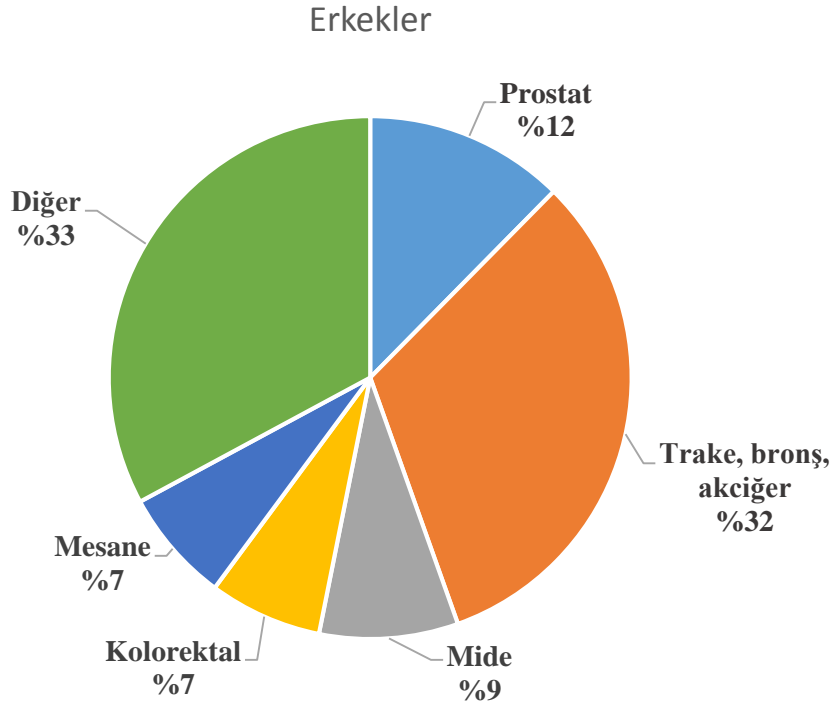


Şekil 2. Prostat bezinin zonal anatomisi (18)

PROSTAT KANSERİ

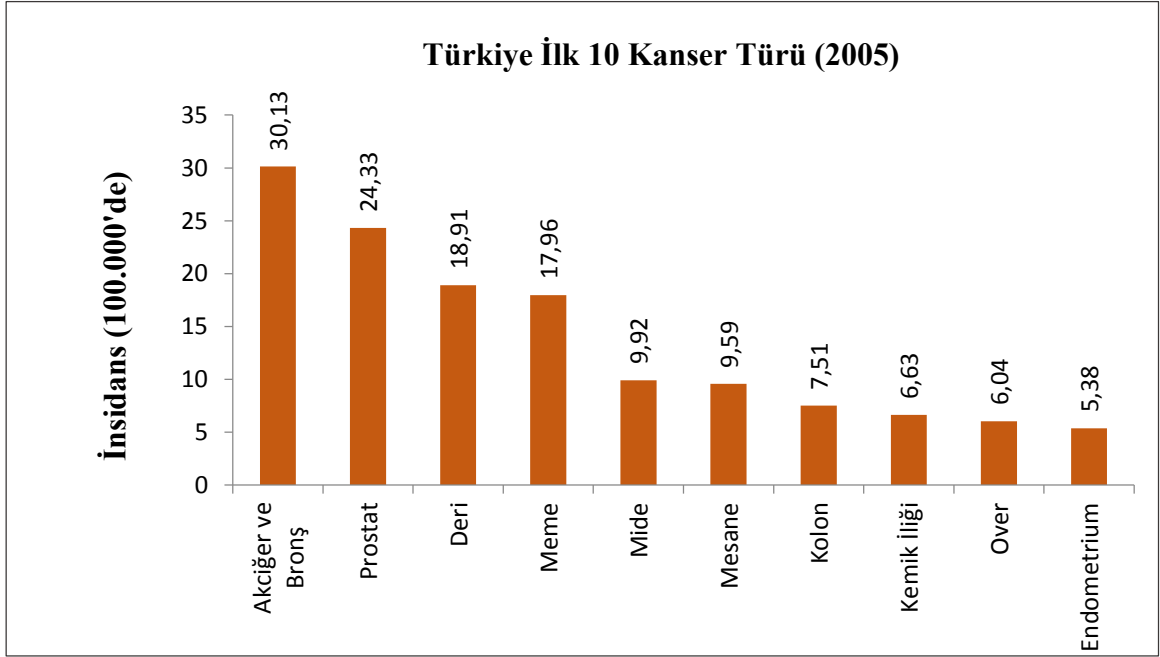
Epidemiyoloji

Kanser, hücrelerin anormal bir şekilde kontrolsüz olarak bölünmesinden kaynaklanan bir grup hastalık için kullanılan genel bir terimdir (19) ve prostat kanseri, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulmasıyla, prostat bezinin malign büyümesi sonucunda meydana gelmektedir (3). Amerikalı erkeklerde cilt kanserinden sonra, prostat kanseri en sık görülen kanser türüdür. Amerikan Kanser Topluluğu'nun 2017 yılındaki verilerine göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde 161,360 yeni prostat kanseri tespit edilmiş ve 26.730 kişi prostat kanserinden hayatını kaybetmiştir (20). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2014 yılındaki Türkiye verilerine göre erkeklerde, kanser vakası sebebiyle 58,400 kişi hayatını kaybetmiştir. Bu kanser vakalarının %12,4'ü ise prostat kanserine aittir (21) (Şekil 3).



Şekil 3. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2014 yılındaki Türkiye verileri.

Ülkemizde, Sağlık Bakanlığı'nın 2005 yılında yaptığı istatistik verilerinde ise 100,000 hastanın % 24,3'ünde prostat kanseri görülmektedir (Şekil 4) (22).



Şekil 4. 2005 yılına ait T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan istatistik verileri

Risk Faktörleri

1-Yaş: Prostat kanseri, ileri yaştaki erkeklerde görülen bir hastalıktır. 40 yaşından önce nadir görülmektedir. 50 yaşından sonra, prostat kanserine yakalanma şansı hızla yükselir. Neredeyse 10 prostat kanseri vakasının 6'sı, 65 yaş veya daha ileriki yaşlarda teşhis edilmektedir. Tanı anındaki yaş ortalaması ise 66'dır.

2-Irk: Afrika kökenli Amerika'lılar da ve Karayip erkeklerinde diğer ırklara göre prostat kanseri daha sık görülmektedir. Afrika kökenli Amerikalı erkeklerde prostat kanserinden ölenlerin oranı, beyaz erkeklere göre iki kat daha fazladır. Asya kökenli Amerika'lılarda ve Latin erkeklerde ise, Latin olmayan beyaz erkeklere göre prostat kanseri daha az görülmektedir. Ancak bu irksal ve etnik farklılıkların nedenleri net olarak bilinmemektedir (23).

3-Aile öyküsü: Aile öyküsü, prostat kanserinde en önemli risk faktörlerindedir. Kalıtsal ve sporadik olmak üzere 2 grup altında toplanan prostat kanserinin, %10-15'i genetik %85'i ise sporadik olarak belirlenmiştir. Aile öyküsü, sporadik prostat kanserlerinde görülmemektedir. Prostat kanserinden etkilenen aile bireylerinin sayısı, akrabalık derecesi ve tanı anındaki yaşları, prostat kanserinin gelişmesi için bir risk faktörüdür. Prostat kanserinden etkilenen birinci dereceden bir akrabası olan erkek için, prostat kanseri riski iki katına çıkmaktadır. Birden fazla etkilenen akrabası olan erkekler için risk daha da artmaktadır (24). Yapılan çalışmalarda, tüm kanserlerin % 5 ila % 10 'unda aile öyküsünün görüldüğü, özellikle 50 'li yaşlardaki kanser vakalarının %45 'inde otomazal dominant geçişin etkili olduğu bildirilmektedir (25). Prostat kanserlerinin de %10'nun da genetik faktörün risk oluşturduğu düşünülmektedir (26).

4-Diyetsel faktörler: Prostat kanserini etkileyen bir diğer risk faktörü ise diyetdir. Yüksek miktarda yağ tüketimi ile prostat kanseri arasında bir ilişki bulunmaktadır. Yağ tüketimi ile artan yağ asidi plazma konsantrasyonlarının, gonadal steroidlerin globünlere bağlanmasını inhibe edebileceği düşünülmektedir. Diyetle alınan yüksek miktarda yağ, androjenik stimülasyonu artırması nedeniyle prostat kanseri oluşumunu tetikleyebilir ve bu da kanser riskini arttırabilir (27).

Yüksek sıcaklık koşullarında pişirilen etlerde bol miktarda üretilen heterosiklik aminler, prostat kolon ve göğüs kanserleriyle ilişkili bulunmuştur. Tüm çalışmalar pozitif olmasa da, bir çok epidemiyolojik çalışma, et tüketimini ve çok iyi pişmiş eti genel prostat kanseri ve / veya agresif prostat kanseri riski ile ilişkilendirmiştir (28).

Alfa metil koenzim-m-redüktaz, sığır eti ve süt ürünlerinde fazla miktarda bulunan dallanmış zincirli yağ asitlerinin peroksidasyonunda, önemli rol oynayan bir enzimdir. Üretilen hidrojen peroksit prostatta bulunan genetik bileşenlere zarar verebilmektedir ve kanser riskini arttırmaktadır (29).

İzoflavonları içeren soya fasulyesi ürünlerinin tüketimi, Japonya'da prostat kanseri riskinin azalmasına neden olmuştur. Bileşenleri genistin ve daidzin'dir. Yapılan bazı çalışmalarda, bu izoflavonların etki mekanizmasının, hücre proliferasyonunda ve anjiyogenezde rol oynayan tirozin kinaz enzimlerini inhibe ettiği bilinmektedir (30).

Domates sosu, likopen denilen bir antioksidan içerir. Domates tüketen insanlarda prostat kanseri riskinin azaldığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Diyetlerinde domates sosu almayanlar insanlarla karşılaştırıldığında prostat kanseri riski %16 oranında azalmıştır (31).

Prostat kanseri riskini arttırmada rol oynayan diğer önemli bir faktör ise insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)'dür. Yağ ve kalori açısından zengin diyetler, büyüme hormonu ve insülinin salınmasına neden olmaktadır. Bu da hücre apoptozunu azaltabilen ve hücre proliferasyonunu arttıran IGF'yi serbest bırakır. Yapılan çalışmalar, IGF-1 düzeyleri yüksek olan kişilerde prostat kanseri riskinde 1.7-4.3 oranında bir artış olduğunu göstermektedir (32).

Selenyum ve E vitamini, prostat kanseri riskini azalttığı düşünülen diğer mikro besin öğeleridir. Hastaların selenyum aldığı bir çalışmada, plaseboyla karşılaştırıldığında prostat kanseri insidansı % 66 oranında azalmıştır. Benzer şekilde, bir İskandinav kemoprezervasyon çalışmasında, E vitamini ve beta karoten alan hastalarda prostat kanseri insidansında ve mortalitesinde % 40 oranında bir azalma sağlanmıştır (33).

5-Obezite: Obezite, vücut kitle indeksi ile ölçülmektedir. Vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun metre cinsinden karesine bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Bir kişinin kendi vücut kitle indeksi 25'den daha büyük ya da eşitse obez olarak kabul edilmektedir (34). Obezitenin prostat kanseri ile ilişkisi net olarak açıklanamamaktadır. Ancak son çalışmalar, obezitenin agresif prostat kanseri ile ilişkili olduğunu göstermektedir (35).

6-Sigara ve alkol kullanımı: Sigara kullanımının tüm kanserlerle % 80 oranında bir ilişkisinin olduğu bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda, sigara kullanımının prostat kanseriyle olan ilişkisi net olarak açıklanamamıştır. Bazı çalışmalarda da, küçük bir miktarda olsa sigara kullanımının prostat kanserinin ölüm riskini arttırdığı bilinmektedir ancak bu bulgu başka çalışmalar tarafından doğrulanmalıdır (36).

Sigara da bulunan kadmiyumun, dolaşımdaki androjen seviyelerinde ve oksidatif strese artışa sebep olduğu ve bunun da prostat kanseri için risk faktörü oluşturduğu düşünülmektedir (37).

Birçok çalışmada, alkol tüketiminin prostat kanserinin insidansına veya mortalitesine etkisi olmadığını bildirmektedir (38). Alkolün fazla tüketilmesi, östrojen düzeyini artırırken testosteron düzeyini azaltmaktadır. Bu sebeple alkol tüketiminin de prostat kanserini azaltabileceği düşünülmektedir (39).

Belirti ve Semptomlar

Prostat kanseri, nadir olarak genç erişkinlerde görülmekte olup, genellikle ileri yaştaki hastalarda rastlanmaktadır. Kanser, hastalığın erken evrelerinde prostat dokusunda sınırlı olduğundan hastalarda asemptomatiktir. Prostat kanseri asemptomatik olabileceği gibi, idrar yapma güçlüğü, ereksiyon zorluğu, semende ve idrarda kan görülmesi, sırt, bel, kalça ve uyluk ağrıları gibi sebeplerle semptomlar verebilmektedir (40). İleri prostat kanserine sahip, bölgesel hastalığı olanlarda mesane çıkışında tıkanıklık ve hematüri belirtileri sık görülmektedir. Metastaz yapmış olan prostat kanserlerinde, alt ekstremitelerde metastatik konglomere pelvik lenfadenopatilerin ana vasküler yapılara yaptığı bası nedeniyle ödem ile belirti verebilir. Spinal kord da bası bulguları da vertebra metastazı olan prostat kanseri vakalarında görülmektedir (41).

Tanı

Prostat kanserinde, dijital rektal muayene, prostat spesifik antijen (PSA) taraması, transrektal ultrason (TRUS) eşliğinde biyopsi olmak üzere 3 farklı tanı yöntemi kullanılmaktadır.

1-Dijital rektal muayene: Posterior ve lateral prostat dokusundaki tümörler dijital rektal muayene yöntemi ile saptanabilmektedir. Diğer bir yöntem olan PSA kan testinden daha az etkili bir yöntemdir. Ancak bazı durumlarda PSA kan seviyeleri normal olan hastalarda

dijital rektal muayene ile prostat kanseri teşhis edilebilmektedir. Bu yöntemin duyarlılığı düşük olduğundan, daha çok prostat kanseri taramalarının bir parçası olarak kullanılmaktadır (42).

2-Prostat spesifik antijen (PSA) taraması: Prostat spesifik antijen (PSA), prostatla ilgili hastalıklara spesifik bir belirteç olup, insan kallikrein ailesine ait bir serin proteazdır. 19. kromozomun kısa kolunda (19q13,4) lokalizedir (43). Androjenin düzenlenmesiyle, prostat asiner hücreleri ve duktal epitelden eksprese olmaktadır (44).

Prostatik doku bütünlüğünün bozulmasıyla prostattan kana PSA geçişi gerçekleşmektedir ve serumda PSA seviyesi artmaktadır. Bu durum, prostat kanserinde ve prostatit, benign prostat hiperplazisi gibi prostat patolojilerinde gerçekleşebileceği gibi ürolojik müdahalelerden veya fizyolojik durumlardan dolayı da olabilmektedir (45). PSA seviyesi referans aralığı 0-4 ng/mL olarak kabul edilmektedir. 40 yaş üstü sağlıklı erkeklerin %97'sinde 4.0 ng/mL'nin altında olduğu saptanmıştır (46). Benign prostat hiperplazisi ve prostat kanserinin örtüştüğü, 4-10 ng/mL aralığı ise "gri zon" olarak değerlendirilmektedir. 90'lı yıllarda ise, gri zondaki vakaları daha iyi anlayabilmek amacıyla, yaşa özgü PSA değerleri, PSA velositesi, PSA dansitesi, serbest PSA gibi birçok PSA türevlerine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (47). Eldeki veriler, farklı topluluklardan ve farklı biyopsi yöntemleri uygulanmış hastalardan olduğu için klinik uygulamalar, standardize edilememiştir. Güncel algılama, PSA'nın prostatla ilgili hastalıklarda önemli bir belirteç olduğu ancak kansere spesifik olmadığı, organa spesifik olduğu yönündedir. Günümüzde ise PSA kullanımında amaç, organa spesifik tümörlerin teşhis edilebilmesidir (48).

3-Transrektal ultrason (TRUS) eşliğinde biyopsi yöntemi: Erken evredeki kanserlerin belirlenmesinde, transrektal ultrason tek başına tarama testi olarak kullanılmamaktadır. Daha çok transrektal ultrason eşliğinde yapılacak olan prostat biyopsileri sırasında, biyopsi iğnelere yönlendiricilik yapmaktadır.

Biyopsilere eşlik eden TRUS, aynı zamanda dijital rektal muayene ile tanımlanamayan birçok kanseri tanımlayabilmekte ve PSA seviyesindeki artışa yardımcı olabilecek şekilde prostat bezinin büyüklüğünü ölçebilmektedir. Bunlara ek olarak, kriyo cerrahi gibi tedavilerde yönlendirici olarak kullanılmaktadır (49).

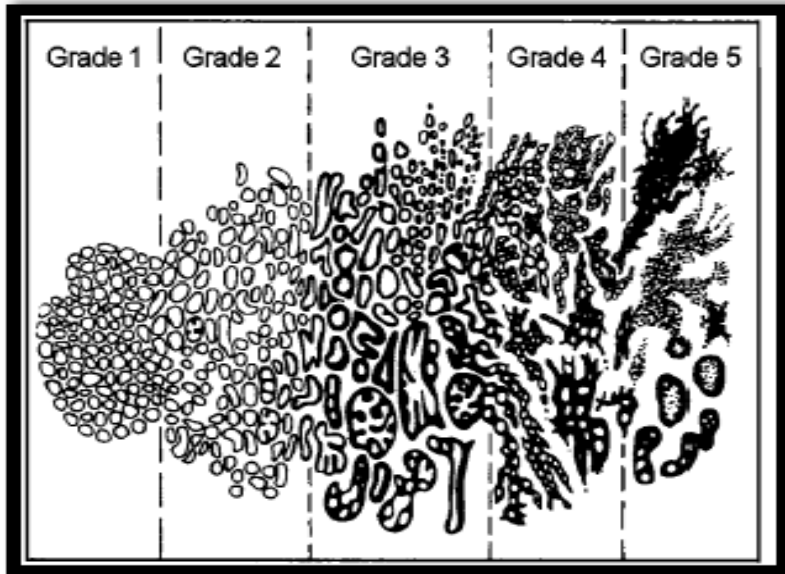
Prostat Kanserinde Derecelendirme ve Evreleme

Kanserli dokunun histolojik olarak incelenmesiyle gözlenen heterojeniteye bağlı olarak, Gleason, prognostik belirteç olarak kabul edilen bir derecelendirme sistemi geliştirmiştir. Gleason sistemi, prostat kanserinde prognozun değerlendirilmesinde, hastalığın derecelendirilmesinde ve uygun tedavinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (50).

Mevcut prostat kanseri (PKa) derecelendirme sistemi 1966 ve 1974 yılları arasında Donald Gleason ve Ürolojik Araştırma grubu tarafından geliştirilmiş 2005 ve 2014 yılında revize edilmiştir. 2005 yılındaki revizyonda, Gleason dereceleri 1 ile 5 arasında değişmektedir. Gleason skoru ise, en sık görülen derece ile ikinci sıklıkta görülen derecenin toplamından oluşmaktadır ve 2 ile 10 arasında değişmektedir. Gleason derecelendirme sisteminde, skor gruplandırılması aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (51) (Tablo 1 ve Şekil 5).

Tablo 1. Gleason derecelendirme sisteminde, skor gruplandırılması

Gleason skoru	Derecelendirilmesi
2 – 4	İyi dereceli diferansiye tümör
5 – 7	Orta dereceli diferansiye tümör
8 - 10	Kötü dereceli diferansiye tümör



Şekil 5. Gleason derecelendirme sistemi (52)

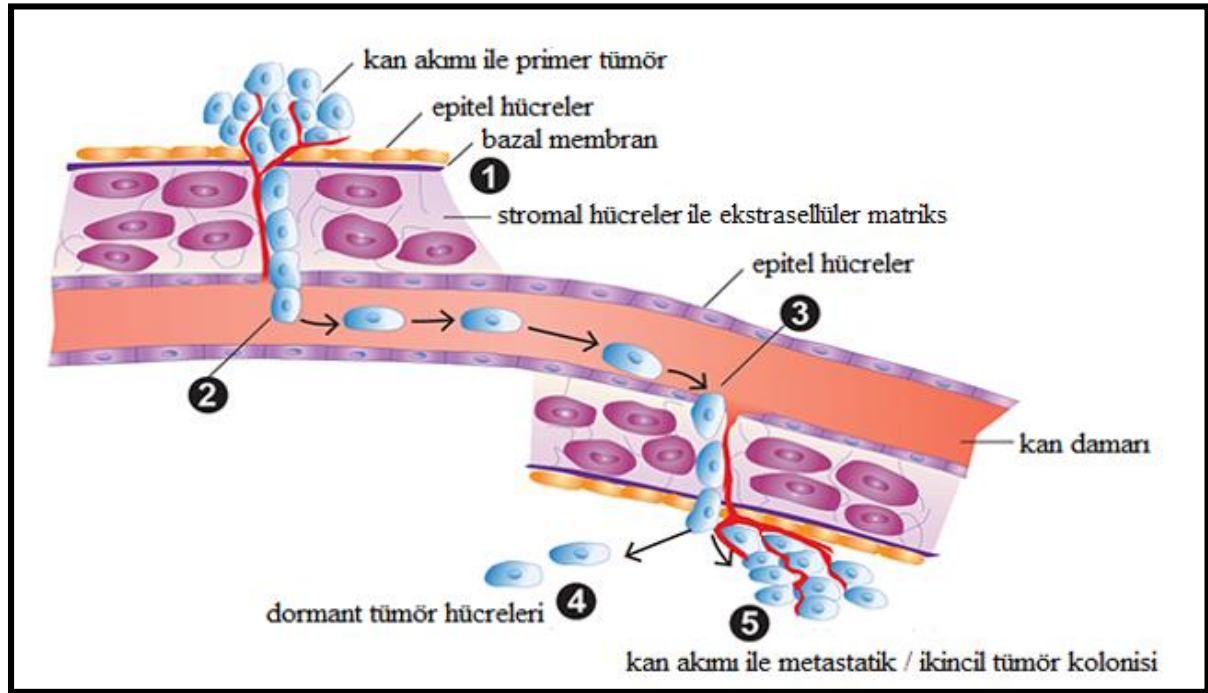
2014 yılında ise Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP) tarafından yapılan konsensus konferansında, Gleason derecelendirilmesi ile ilgili olarak yeni düzenlemeler yapılmıştır. Yeni derecelendirme sistemi aşağıdaki tabloda gösterilmektedir (Tablo 2) (51).

Tablo 2.Yeni Gleason derecelendirme sistemi

Gleason skoru	Derecelendirilmesi
6'dan küçük	1.grup (% 96 iyi)
3+4=7	2.grup (% 88 orta)
4+3=7	3.grup (% 63 kötü)
8	4.grup (% 48 kötü)
9-10	5.grup (% 26 çok kötü)

TÜMÖR METASTAZI

Metastaz; primer tümörün ilk bulunduğu ortamdan uzak bölgelere göç ettiği, neoplastik hücrelerin hızla çoğaldığı karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir (Şekil 6) (53, 54). Metastaz terimi ilk olarak Joseph-Claude-Anhelme Récamier tarafından tanımlanmıştır (54).



Şekil 6. Metastatik süreç

Metastatik süreç şu şekilde gerçekleşir:

- 1) Primer katı tümörden kaçan hücreler, bazal membran ve ekstrasellüler matriksten (ECM) geçerek çevresindeki normal dokuyu istila eder.
- 2) Kaçan hücreler, aktif olarak endotel hücrelerinden geçerek doğrudan kana ulaşır veya tümör hücrelerini kan dolaşımına taşıyan lenfatik sistem üzerinden pasif olarak taşınır.
- 3) Tümör hücreleri kana geldiğinde ikincil bölgedeki endotel hücrelerinden geçerek ekstrasellüler matriksin bazal membranını işgal eder.
- 4) Sekonder bölgede, tümör hücreleri uzun bir süre bekletilebilirler. Dormant halde olan bu tümör hücreleri gelecekte çoğalabilir ve metastatik tümörü oluşturabilir.
- 5) Dormant tümör hücreleri halinde bulunmaları dışında, ikincil bölgede metastatik tümör kolonileri oluşturmak için çoğalırlar. Bu süreçte metastatik tümörün beslenmesi için anjiyogenezi uyarırlar ve yeni kan damarlarını oluştururlar (53).

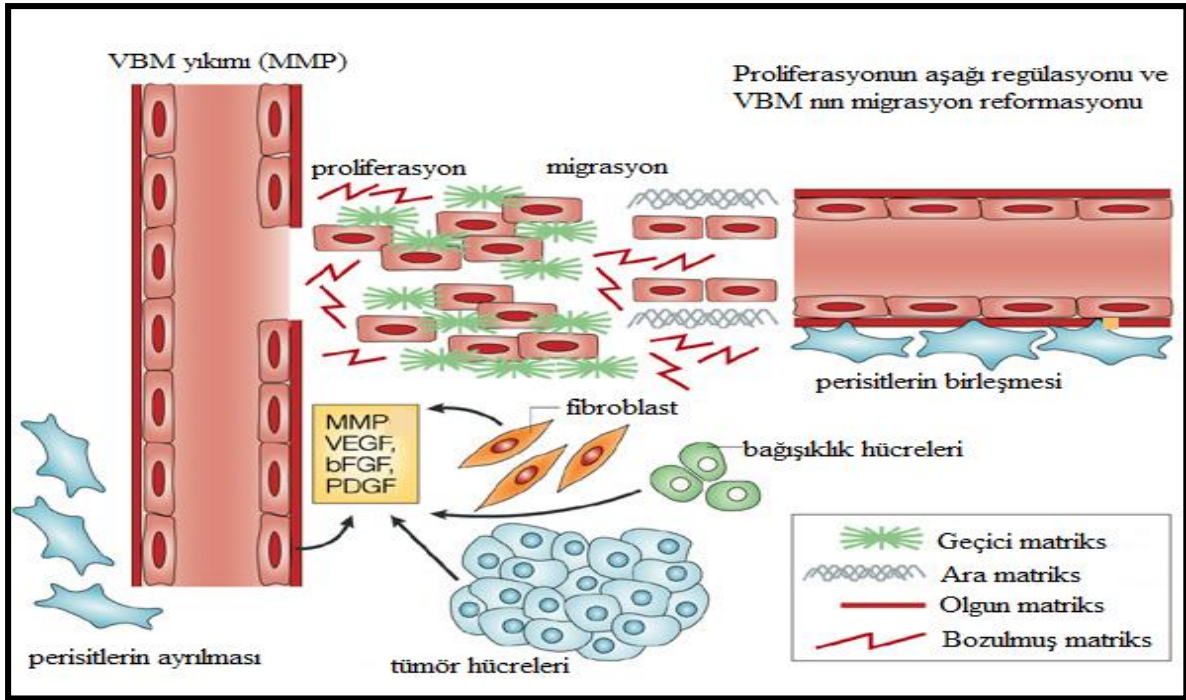
ANJİYOGENEZ

Kan damarları vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki mekanizma ile şekillenir. Vaskülogenez; endotel progenitör hücrelerden şekillenen, primitif damar oluşumudur. Endotel progenitör hücrelerden olan anjiyoblastlar, primer kapiller pleksusu oluştururlar. Bu oluşumla ise yeni damar yapıları filizlenip dallanmaktadır (55).

Anjiyogenez; endotel hücrelerinin bölünmesini ve taşınmasını içeren mevcut kan damarından yeni kan damarının oluşumuyla sonuçlanan biyolojik bir süreçtir. Tümör ile ilişkili yeni damarların mevcut kan damarlarından filizlenme süreci ilk olarak 1971'de Dr. Judah Folkman tarafından "tümör anjiyogenezi" olarak adlandırılmıştır (56).

Embriyogenez veya gelişme sırasında normal epitel hücreleri çoğalır ancak yetişkinlerde epitel hücreleri daha az bölünürler. Karsinoma hücreleri, normal epitel hücrelerinin transformasyonundan veya mutasyonundan kaynaklanır. Tümörler, epitel tabakanın bazal membranının altında bulunan kılcal damarlara yakın bulunurlar. Kılcal damarlara mesafeleri, oksijenin diffüzyon mesafesi olan 200-300 μm 'dir. Bir tümör hücresi ancak 2-3 mm'ye kadar büyüyebilir (57). Kılcal kan damarı gelişmediği sürece tümör büyüyemez bunun için anjiyogeneze gereksinim vardır (54).

Mevcut damarlardan yeni kan damarı oluşumu süreci olan anjiyogenez 4 adımda gerçekleşir (Şekil 7).



Şekil 7. Anjiyogenez basamakları (58)

1) Proteazlar tarafından bazal membranın yıkılması: Anjiyogenez vasküler bazal membranın (VBM) bozulması ve yeniden düzenlenmesi ile ilişkilidir. Anjiyogenik faktörlerin matriks metalloproteinazları ve plazminogen aktivatör enzimleri aktive etmesiyle ekstrasellüler matriks ve bazal membran yıkılır (59).

2) Endotel hücrelerin migrasyonu: Büyüme faktörleri ve matris metalloproteinazlara yanıt olarak, VBM degradatif ve yapısal değişikliklere uğrar. Olgun VBM'den geçici matrikse geçiş, vasküler endotel hücrelerinin çoğalmasımı ve göçünü arttırır. Tümör hücreleri, fibroblastlar ve bağışıklık hücreleri tarafından üretilen vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri bazal membrandan salınır (58). Endotel hücrelerin reseptörlerine anjiyogenik faktörlerin bağlanmasıyla endotel hücreleri aktive edilir. Endotel hücrelerinin ekstrasellüler matriks içine migrasyonu gerçekleşir (60).

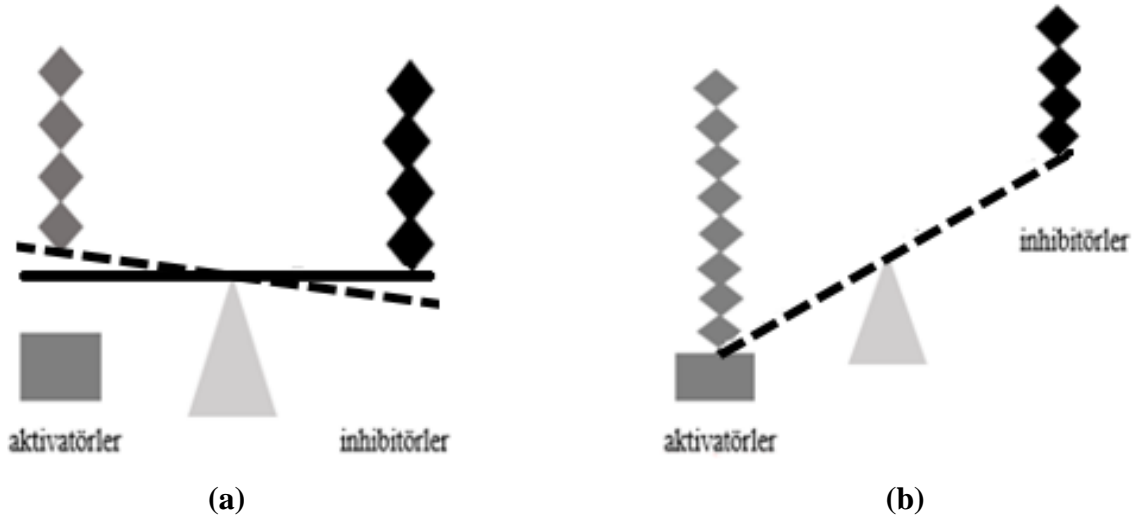
3) Endotel hücrelerin proliferasyonu: Migrasyon yapan endotel hücreleri VEGF gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Bu, ara maddenin oluşumuna neden olur ve daha sonra yeni bir olgun VBM oluşur. Vasküler endotel hücreleri ve perisitlerle birlikte VBM, yeni bir kan damarı oluşumuna aracılık eder. Bu süreç boyunca parçalanan VBM, anjiyogenezin düzenlenmesinde çok önemli bir role sahiptir (58).

4) Kapiler oluşumu ve endotel hücrelerin olgunlaşması: Prolifere olan endotel hücrelerinden sonra ekstrasellüler matriks bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstrasellüler proteoliz inhibe edilmelidir. Bazal membranın yıkılmasıyla, endotel hücreler migrasyon yapar ve filizleme gerçekleşir. Kılcal kan damarları, hücre dışı matriks proteolizinin aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda oluşur. Yeni bazal membran, yeni kapillerin oluşmasından sonra gerçekleşir. Bu sebeple, endotel hücrelerinin birbirlerine ve ekstrasellüler matrikse tutunmaları yeni kılcal damar oluşturabilmeleri açısından önemlidir (61).

Anjiyogenezin Moleküler Mekanizması

İnsan vücudunda fizyolojik ve patolojik olmak üzere 2 çeşit anjiyogenez vardır. Embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadınlarda menstruasyondan sonra uterus iç tabakasının rejenere olması gibi durumlarda fizyolojik anjiyogenez görülür. Patolojik anjiyogenez ise artrit, psöriazis, kronik inflamasyon gibi inflamatuvar hastalıklarda, çeşitli kanser türlerinde, proliferatif retinopati gibi göz hastalıklarında görülür (62).

Tümör hücrelerinin anjiyogenik fenotipe geçmesi, pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin dengesiyle sağlanmaktadır (Şekil 8). Bu faktörler, ekstrasellüler matriksin degradasyonu sonrasında veya tümör hücreleri, fibroblast ve monosit gibi ortamda bulunan hücrelerin etkisiyle ortaya çıkar (63).



Şekil 8. Damarsal bileşenler latent haldeyken, aktivatör (pro-anjiyogenik faktörler) ve inhibitörler (anti-anjiyogenik faktörler) arasındaki denge. (b) Anjiyogenik uyarıların artışı ve inhibitörlerin azalışıyla anjiyogenezin başlatılması (64).

Dormant haldeki tümör anjiyogenezi başlatıldığında, endotel hücrelerinin filizlenmesini ve kemotaksisini tümör kitlesine doğru indükleyen faktörler salgılanır. Bu olay ‘anjiyogenik geçiş’ olarak adlandırılır.

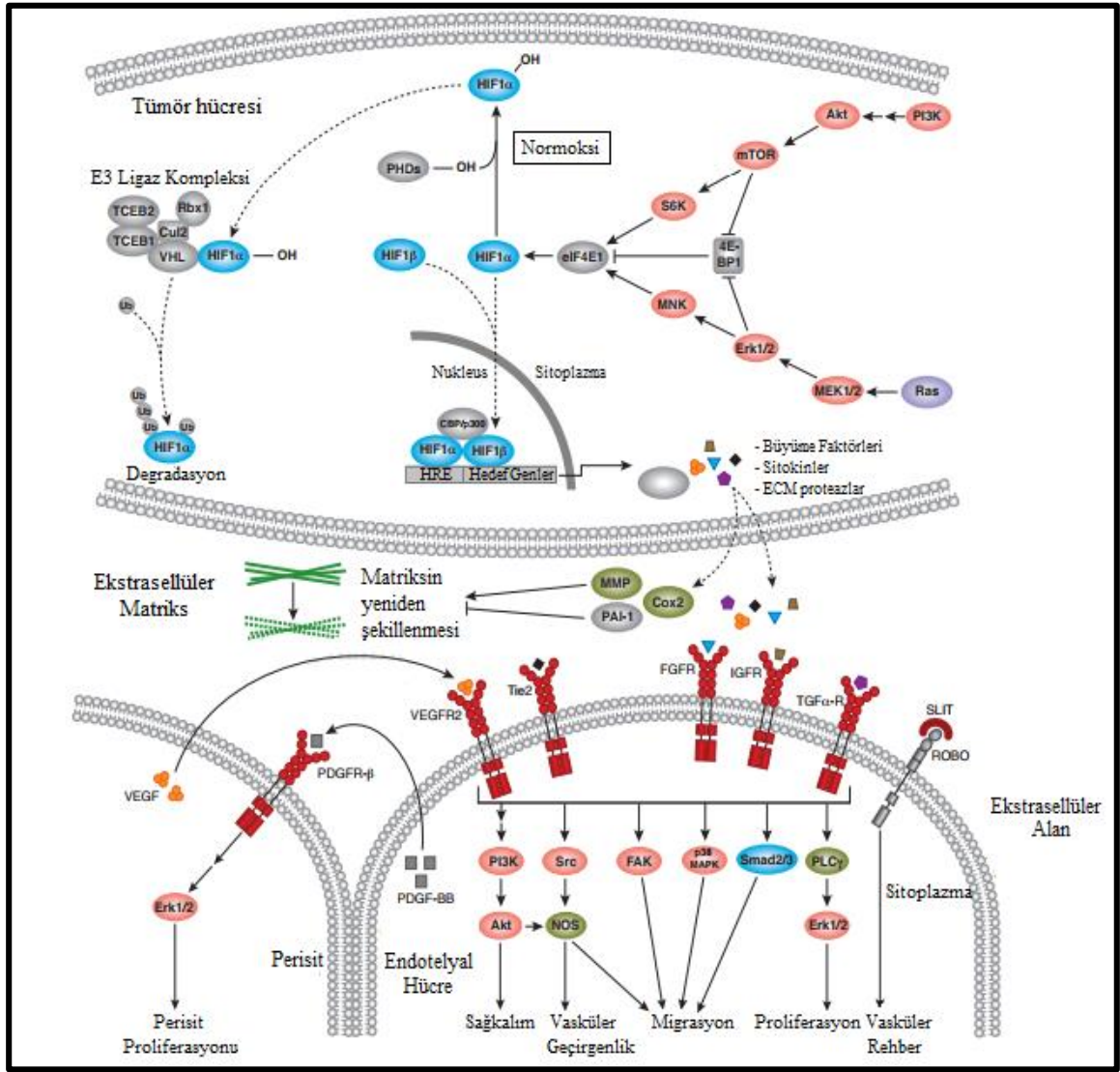
Hipoksik ortamda, transkripsiyon faktörü olan (Hipoksi ile İndüklenen Faktör- 1 alfa) HIF-1 α stabilize edilir ve anjiyojenik sürece katkıda bulunan birden çok genin sentezlenmesini aktive eder. HIF-1 α ile indüklenen VEGF ve bFGF, vasküler geçirgenliği ve endotelial hücre büyümesini destekler.

Efrinler, yeni oluşan kan damarlarını yönlendirirken PDGF, anjiyopoietin-1 ve anjiyopoietin-2 gibi diğer salgılanan faktörler kemotaksiyi kolaylaştırır. Matriksmetalloproteinazlar (MMP) ise, endotelial hücre migrasyonunu kolaylaştırmak ve ilişkili büyüme faktörlerini serbest bırakmak için hücre dışı matriksi parçalarlar.

Anjiyojenik endotelial hücrelerin yüzeyinde bulunan bazı integrinler, filizlenen endotelial hücrelerin geçici ekstrasellüler matrikse bağlanmalarına, göç etmelerine ve hayatta kalmalarına yardımcı olur.

Tümörü çevreleyen mikro çevre içerisinde salgılanan faktörler, tümör ile ilişkili makrofajları (TAM'lar) aktive eder, daha sonra VEGF ve MMP'ler gibi anjiyogenik faktörleri üretir.

Perisitler, endotelial hücrelerin bazolateral yüzeyini saran ve normal fizyolojik koşullar altında vazokonstriksiyon ve genişlemesini düzenleyen destek hücreleri olarak işlev görürler. Tümör anjiyogenezi, damarların filizlenme aşamasında perisitten yoksundur daha sonra tümörün sağkalımını teşvik etmek ve yapısal destek sağlamak için endotelial hücreler tarafından alınır (Şekil 9) (65-67).



Şekil 9. Anjiyogenez yolağı (68)

1) Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF); inflamasyonda, vaskülojeniz ve anjiyogenez sırasında vasküler gelişimin uyarılmasında rol oynayan önemli bir anjiyogenez faktördür (69). 1980'lerde, anjiyogenezisi tetikleyen ilk moleküllerin keşfi gerçekleşmiştir (70). Günümüzde VEGF-A olarak adlandırılan bu faktör, ilk bulunduğu vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak adlandırılmıştı. VEGF molekülü homodimerik olup 46 kDa ağırlığındadır. Heparine bağlı glikoprotein bir yapı gösterir (71). Endotel hücreleri üzerinde mitojenik bir etkiye sahiptir, migrasyonu ve invazyonu artırır. Ayrıca tümör hücrelerine vasküler geçirgenliği artırarak metastazı kolaylaştırır (72).

VEGF ailesi, plasental büyüme faktörünün (PGF) yanı sıra VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-F'yi içerir. VEGF'in aminoasit sayılarına göre, VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-189 ve VEGF-206 olmak üzere bilinen en az beş izoformu vardır (73).

VEGF, biyolojik aktivitesini hücre yüzey reseptörleri ile etkileşerek gösterir. Bunun için endotel hücreleri ve lenf damarları üzerinde bulunan spesifik transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanır. Reseptörlere bağlanan VEGF, hücre içinde bulunan birçok proteini fosforilize eder. Böylece ikincil habercileri de aktif ederek, endotel hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu sağlar.

VEGF'in temel faaliyetleri;

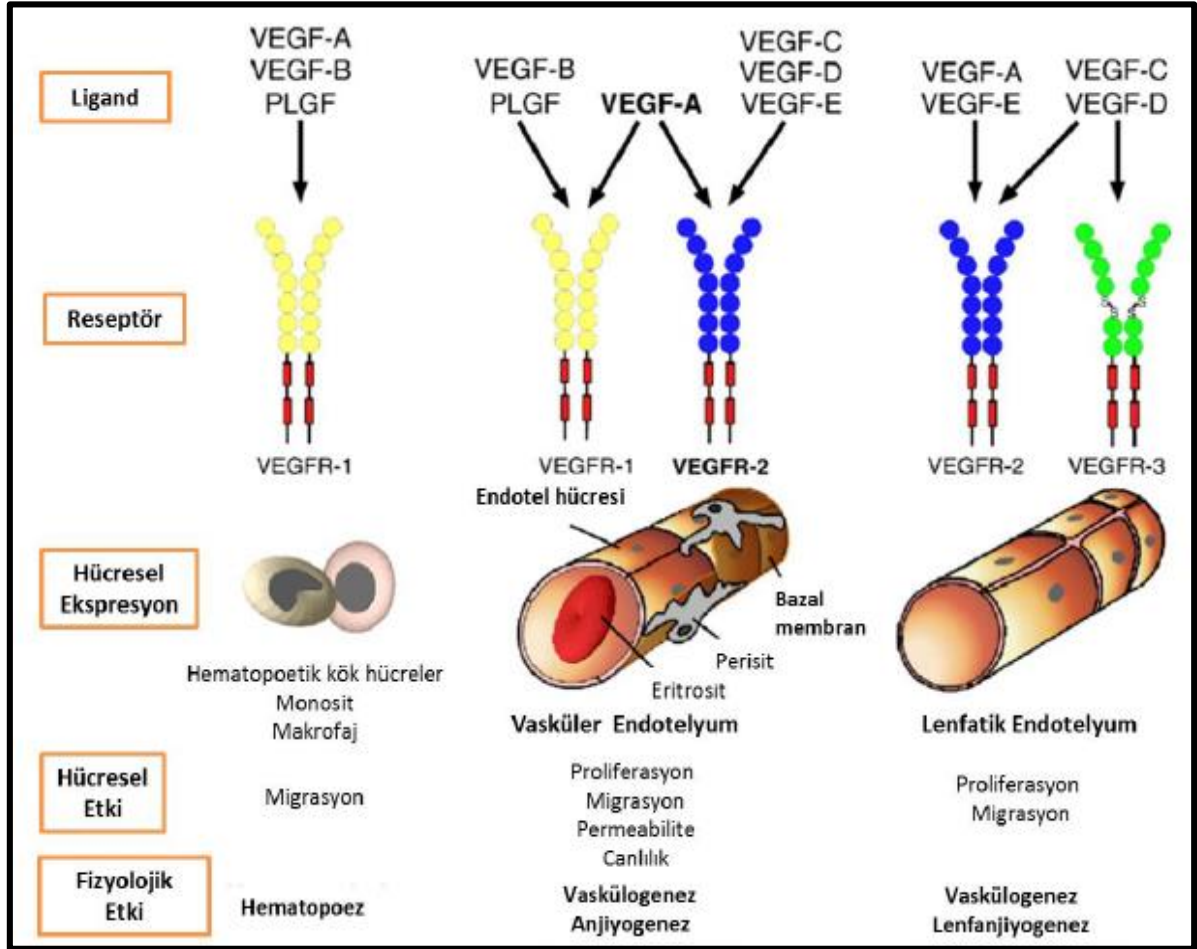
- 1)Vasküler geçirgenliği, nitrik oksit salınımını indükleyerek artırır.
- 2)Ekstrasellüler matriksin ve bazal membranın yıkımını artırır.
- 3)Endotel hücrelerin farklılaşmasında ve olgunlaşmasında, anjiyopoyetinlerin etkisiyle rol oynar (74).

Akciğer, göğüs, gastrointestinal sistem, böbrek, mesane ve yumurtalık da dahil olmak üzere birçok farklı tümör tipinde VEGF-A ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (75).

VEGFR-1 (Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü-1), birçok hematopoietik hücrede eksprese edilen 180-kDa'luk bir glikoproteindir (76). VEGFR-1, VEGF-B'ye ve PGF'ye bağlanır ve pozitif anjiyogenez düzenleyicisi olarak işlev görür. Yeni elde edilen veriler, VEGFR-1'in kinaz aktivitesinin, VEGFR-2 sinyallemesini güçlendirerek patolojik anjiyogenez sırasında ve yara iyileşmesinde, önemli bir rol oynadığını göstermektedir (77).

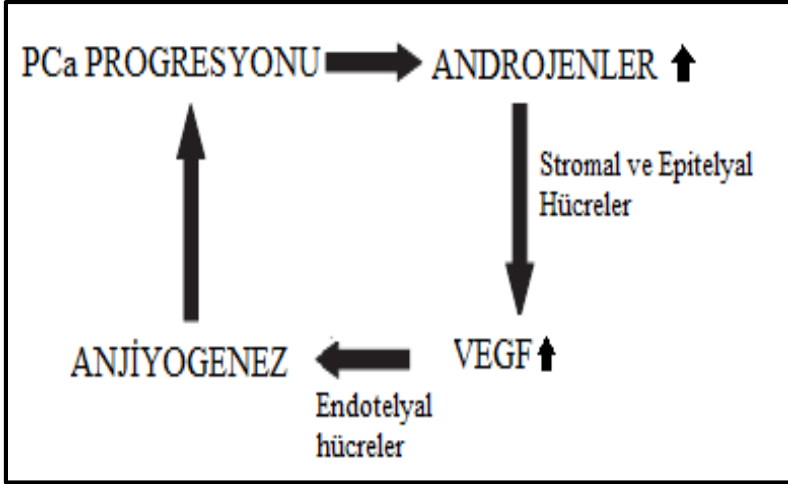
VEGFR-2, primitif hematopoietik kök hücrelerde, vasküler ve lenfatik endotel hücrelerinde ekspresse olurlar. VEGFR-2, VEGF-A'ya bağlanır ve mikrovasküler permeabilite, endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonun artması gibi önemli proanjiyogenik etkiye sahiptir (78).

VEGFR-3, 195 kDa ağırlığında öncü bir protein olarak sentezlenmiştir. VEGFR-3, VEGF-C ve VEGF-D'ye bağlanır ve VEGFR-2'ye benzer bir fonksiyona sahiptir. Ancak farklı olarak VEGFR-1 ve VEGFR-2, çoğu kan endotel hücresinin hücre yüzeyi üzerinde eksprese edilirken, VEGFR-3 çoğunlukla lenfatik endotel hücrelerinde eksprese edilir (79). VEGFR-3 lenfanjiyogenezin gelişmesinden sorumludur. VEGF-C'nin lenfatik filizlenmenin olduğu yerlerdeki parakrin ekspresyonu, VEGFR-3'ün lenfatik damarlardaki rolünü daha da desteklemektedir (80) (Şekil 10).



Şekil 10. VEGF ailesinin vaskülogenez, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezdeki moleküler mekanizmaları (81)

Birçok büyüme faktörü prostatta bulunur ve androjenler tarafından düzenlenir. VEGF en belirgin anjiyojenik faktör olup prostat bezi hücreleri tarafından eksprese edilir. Yapılan çalışmalarda elde edilen veriler, VEGF'nin yanı sıra anjiyogenezin, PCa'nın erken progresyonunda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Şekil 11) (82).



Şekil 11. PCa progresyonunda VEGF'in rolü

2) Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Fibroblastlar, endotel hücreleri ve osteoblastlar gibi çeşitli hücreler tarafından üretilir (83). bFGF, fibroblastlar ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere birçok farklı hücre tipi için güçlü bir mitojenik faktördür (84). Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi 18 ligand içerir ve 4 ana reseptör ile etkileşir. Prototip üyeleri, FGF-1 ve FGF-2, bir sinyal peptidinden yoksundur ve dolayısıyla çok iyi salgılanmaz. Ailenin diğer üyelerinde bir sinyal peptidi bulunur ve etkili bir şekilde salgılanır (85).

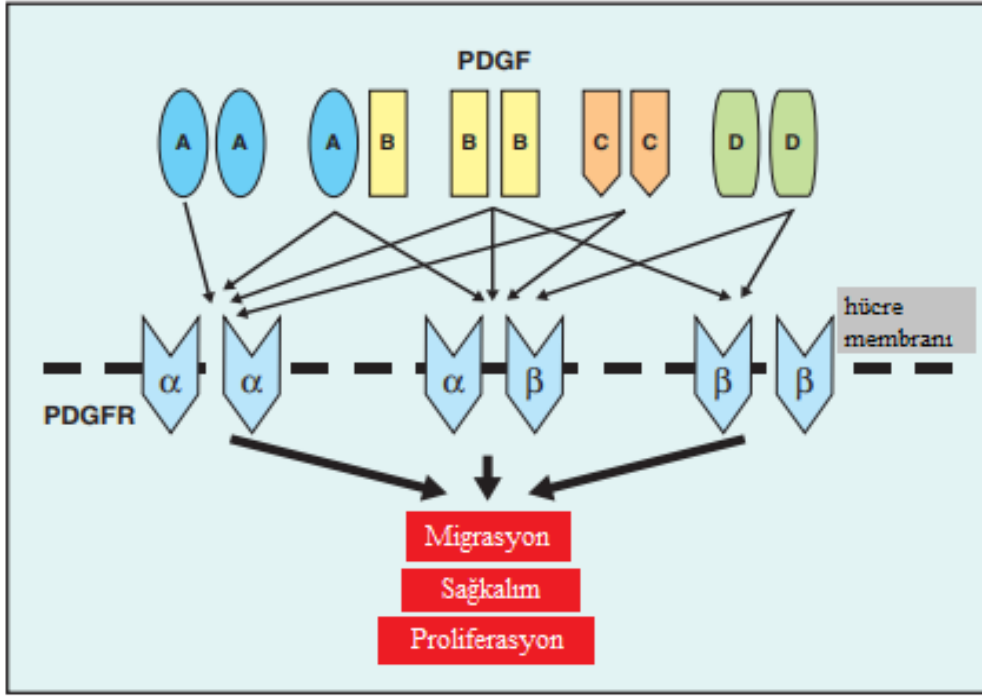
FGF'ler, nörotrofik, anjiyojenik ve lenfanjiyojenik aktiviteyi, kök hücre farklılaşmasının uyarılmasını, doku onarımını ve osteogenezisi de içeren geniş bir biyolojik fonksiyon spektrumu içerir (86).

FGFR'ler çoğu zaman tümörlerde aşırı eksprese edilir. FGFR genlerinin mutasyonları insan kanserlerinde bulunmuştur, bu da özellikle endotelyal hücre kültürü ve hayvan modellerinde FGFR aktivasyonunun anjiyogeneze yol açtığını belirtir (87).

Yapılan çalışmalarda prostat kanserinin ilerleyen aşamalarında, anormal FGF/FGFR sinyalizasyonunun epitelyal mezenşimal geçişte (EMT) rol oynadığı görülmüştür. Epitelyal mezenşimal geçiş, epitel hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek, metastaz invazyon ve apoptoza karşı direnç gibi mezenkimal özellikleri kazandığı bir süreçtir (88). Ayrıca FGFR sinyalizasyonu, fosfolipaz C γ , PI3K (Fosfatidil inositol 3-kinaz) / AKT (Protein kinaz B) ve MAPK (Mitojenle aktive protein kinaz) yolu dahil olmak üzere birçok sinyal iletim yolunu aktive ederek prostat kanseri progresyonunda önemli rol oynar (89).

3) Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF ailesi, heterodimer PDGF-AB'den ve A-, B-, C- ve D- polipeptit zincirlerinin disülfid bağlı homodimerlerinden oluşur. PDGF izoformları öncü moleküller olarak sentezlenir (90). PDGFR- α , PDGFR- β ve PDGFR- $\alpha\beta$ olmak üzere 3 çeşit repetörü bulunur (Şekil 12) (91).



Şekil 12. PDGF ve reseptör etkileşimleri

Endotel hücreleri tarafından eksprese edilen PDGF damar olgunlaşmasında ve perisitlerin alınmasında önemlidir. Embriyonal gelişim sırasında ve yetişkinlerde doku homeostazının kontrolünde önemli işlevleri vardır (92). PDGF sinyalleme, hücre göçünü, sağkalımı, proliferasyonu artırır ve VEGF transkripsiyonunu, sekresyonunu indükleyerek anjiyogenezi dolaylı olarak düzenler (93).

PDGF'lerin ve reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, prostat, yumurtalık ve küçük hücre dışı akciğer kanseri gibi diğer birçok kanser tipinde de görülmüştür (94). Yapılan son çalışmalar, PDGF'lerin ve reseptörlerinin, insan kanserlerinde otokrin uyarım yoluyla tümör hücre büyümesini etkilediğini göstermiştir (95). PDGF sinyalinin aşırı aktivitesi, bazı habis hastalıkların yanı sıra aşırı hücre proliferasyonu ile karakterize edilen ve malign olmayan hastalıkların gelişimi ile de ilişkilidir (92).

4) Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesi 11 üyeden ve 4 reseptörden oluşur. Birçok dokuda bulunan EGF, polipeptid bir yapıdadır. Endotel ve fibroblastlar için epitel hücreleri kemotaktik bir özellik gösterir (96).

EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), 170 kDa ağırlığında bir transmembran glikoproteinidir (97). Reseptör tirozin kinazların ErbB ailesi ErbB 1, 2, 3 ve 4'ü içerir. EGFR olarak da bilinen ErbB1, ligand bağlanmasını stimüle eder. Ana otokrin ligandları, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α)'dır (98). Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), epitelyal malignitelerde önemli bir faktördür. EGFR aktivitesi tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı artırır. EGFR yolağının aktivasyonu, VEGF gibi proanjyogenik faktörlerin yukarı düzenlenmesiyle sonuçlanır ve dolayısıyla anjiyogenezin dolaylı regülatörü olarak görülür (99).

5) Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (TGF- β)

Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), lenfosit, trombosit, makrofaj, kemik ve böbrek gibi farklı dokulardan izole edilmiştir. Trombositlerin alfa granüllerinde bol miktarda TGF- β bulunur (100).

TGF- β reseptörleri tip I, II veya III olarak sınıflandırılır. Tip I ve II reseptörleri, hücre içi protein bölgelerinde serin / treonin kinaz domainleri içerirken tip III, kinaz aktivitesine sahip değildir.

TGF- β 'nın in vitro biyolojik etkileri çok çeşitlidir. Ekspresyonuna bağlı olarak düşük dozda pro-anjiyogenik yüksek dozda anti-angiogenik özellik gösterir (101). Düşük dozda, anjiyogenik faktörleri ve proteazları yukarı doğru düzenleyerek anjiyogenezini teşvik eder. Yüksek dozda ise pRB (retinoblastoma proteini) fosforilasyonu önleyerek dolayısıyla geç G1 evresinde endotel hücreleri durdurarak, endotel hücrelerin çoğalmasını engeller (102).

TGF- β 'nın hücresel proliferasyon, farklılaşma, morfogenez, anjiyogenezin yanı sıra embriyonik gelişimde yara iyileşmesinde, hücre dışı proteolizde ve inflamasyonda da önemli rolü vardır (103).

TGF- β 'nin gen ekspresyonu, salgılanması ve düzenlenmesindeki değişiklikler, anjiyogenezin uyarılması ve bağışıklık sisteminin bastırılmasıyla tümör gelişimi için uygun bir ortam oluşturabilir. TGF- β 'lardan TGF- β 1, prostat kanserinde yüksek oranda eksprese edilir ve tümörün ilerlemesine, metastazına neden olur (104).

6) Matriks Metalloproteinazlar (MMP'ler)

Matriks metalloproteinazlar, ilk defa 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından tanımlanmıştır (105). MMP'ler, kanserde tümör invazyonunda, metastazda ve anjiyogenezde rol oynayan proteolitik enzimlerin ana grubudur. MMP ailesi, insanlar, kemiriciler ve amfibilerde karakterize olan en az 24 üyeden oluşmaktadır (106).

MMP'ler yapılarına ve substrat özgüllüklerine göre 5 alt grupta incelenebilirler:

1-Kollajenazlar

2-Stromelisinler

3-Jelatinazlar

4-Membran tipi MMPler (MT-MMP)

5-Sınıflandırılmayan MMP'ler (107).

MMP'ler, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri etkiler. Fizyolojik olarak, embriyonik gelişimi, yara onarımı, ovulasyon, kemik yeniden şekillenmesi, makrofaj fonksiyonu ve nötrofil fonksiyonu ile ilgilidir. Patolojik koşullarda ise, tümör metastazı, romatoid artrit, periodontal hastalık, osteoartrit, gastrik ülser ve ateroskleroz gibi aşırı ekstrasellüler matriks bozulması ile karakterize edilen önemli işlevleri de vardır (108).

MMP'ler anjiyogenezde hem pro-anjiyogenik hem de anti-anjiyogenik faktör olarak görev yapabilir. Ekstrasellüler matriksi yıkarak, matrikste bulunan anjiyogenik mitojenlerin serbest bırakılmasını sağlayarak tümör anjiyogenezisine neden olabilir (102). Tümör anjiyogenezisine katılan MMP ailesinin önemli üyeleri esas olarak MMP-2, MMP-9 ve MMP-14'tür (109). MMP-9 ve MMP-2 proteolitik olarak latent TGF- β 'yi parçalamakta, aktifleştirmekte ve tümör anjiyogenezisini teşvik etmektedir (102). Her iki enzimin inhibisyonu ise çeşitli tümör modellerinde invazyonu ve anjiyogenezini azaltabilmektedir. MMP-9, nötrofiller ve makrofajlar tarafından yüksek seviyelerde üretildiği için enflamasyon hücreleri ile ilişkilidir. MMP-9, büyük oranda hücre dışı matristen VEGF üretimi vasıtasıyla, anjiyogenezde önemli bir regülatör olarak işlev görür.

Tümör yayılımını sınırlayan ve dolayısıyla metastaz ile ilişkili mortaliteyi potansiyel olarak düşürmeyi hedefleyen MMP-14, birçok tümör tipinde eksprese edildiğinden yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemlidir (108).

7) Tümör Nekroz Faktörü-Alpha (TNF- α)

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa), akut enflamasyon sırasında makrofaj/monosit tarafından üretilen bir enflamatuvar sitokindir. TNF- α , 55 kDa ağırlığında TNFR-1 (tümör

nekroz faktör reseptörü -1) olarak adlandırılan bir hücre zar reseptörüne ya da 75 kDa ağırlığında TNFR-2 olarak adlandırılan bir hücre zar reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir (110). Endotel hücrelerinin proliferasyonunu doğrudan uyararak veya pro-anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu indirekt olarak düzenleyerek anjiyogenezi kolaylaştırır (111). Ayrıca hücrelerdeki çeşitli sinyal olaylarından sorumludur ve böylece nekroz veya apoptozise neden olur. TNF- α enfeksiyon ve kanserlere direnç açısından önemlidir (112).

8) Anjiyopoietinler

Anjiyogenik moleküllerden olan anjiyopoietinler (ANG), TIE2'nin ligandları olarak tanımlanmıştır.

Anjiyopoietin 1 ve 2, TIE2 reseptörlerinin agonist ve antagonist sinyalleri sebebiyle hem pro-anjiyogenik hem de anti-anjiyogenik özellik gösterir (113).

ANG1, TIE2 reseptör tirozin kinazı aracılığıyla, endotel ve kemik iliği hücresine sinyal gönderir. Endotel hücre-perisit etkileşimini artırarak endotel hücre sağkalımını ve vasküler olgunlaşmasını teşvik eden önemli bir vaskülojenik faktör olarak işlev görür.

ANG2, hipoksi ile yukarı doğru düzenlenir ve TIE2'yi ifade eden endotel hücrelerindeki bir otokrin döngü vasıtasıyla anjiyogenezi tetikleyebilir. ANG2-TIE2 aksisi, VEGF gibi diğer proanjiyojenik faktörleri aktive ederek tümörlerde anjiyogenezi artırır. Bununla birlikte ANG2, VEGF yokluğunda, endotel hücresi apoptozunu ve kan regresyonunu teşvik edebilir (114).

9) Hipoksi İle İndüklenen Faktör-1 (HIF-1)

Hipoksi ile indüklenen faktör 1 (HIF-1), heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. HIF1 kompleksi, PAS (Per, ARNT, Sim) ailesinin HIF-1 α ve HIF-1 β olmak üzere iki alt birimini kapsar (115). HIF1, hipoksik ortama yanıtı kolaylaştıran birçok genin (anjiyogenez, eritropoiezis, hücre döngüsü, metabolizma ve apoptozu düzenleyen genler vs.) transkripsiyonunu düzenler. Hem hipoksik koşullar hem de kimyasal hidroksilaz inhibitörleri HIF-1 α 'nın bozunmasını engeller ve stabilizasyonuna neden olur. Buna ek olarak, HIF-1 α , PI3K-AKT-mTOR yoluyla çeşitli sitokinler tarafından oksijenden bağımsız bir şekilde indüklenebilir (116).

10) İnterlökün 6 (IL-6)

İnterlökün (IL-6) pleiotropik bir sitokindir. Hem pro-enflamatuar hem de anti-inflamatuar işlevlere sahiptir. IL-6, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre sağkalımı apoptoz ve anjiyogenez gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptir. Son zamanlarda, tümör dokularında IL-6 ekspresyonunun kanser gelişimiyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (117).

11) İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü (IGFR)

Tip I insülin benzeri büyüme faktör reseptörü (IGFR), fetal ve doğum sonrası dokularda, birçok hücre hattında ve hücre tipinde yüksek oranda ekspresse olan bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür (118).

12)Fokal Adhezyon Kinazı (FAK)

Fokal adhezyon kinazı (FAK), integrin aracılığıyla sinyal iletiminde rol oynayan bir sitoplazmik protein tirozin kinazdır (119).

13) SMAD 2/3

Smad ailesinde bulunan sinyal iletim moleküllerinin üyeleri, TGF- β sinyallerini hücre yüzeyinden çekirdeğe ileten kritik bir hücre içi yolak bileşenleridir (120).

14) COX2

COX-2, inflamasyon bölgelerinde üretilen prostaglandinlerden sorumludur. Büyüme faktörleri, sitokinler ve çeşitli kanserojenler tarafından indüklenir. En önemlisi, COX-2, apoptoza, invazyon ve anjiogenez gibi kanserojen mekanizmalarına katılır. Çeşitli çalışmalar COX-2'nin göğüs, kolon, akciğer, pankreas, yemek borusu ve prostat kanserinde yukarı regüle edildiğini göstermiştir (121).

15) PAI-1

PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü-1), doku yenilenmesinde ve fibrinolizin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Salgılanan PAI-1, hücre dışı matriks bileşeni olan vitronektin ile etkileşime girer ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimini modüle eder (122). PAI-1, karaciğerde, vasküler endotelial hücrelerde, trombositlerde, makrofajlarda ve yağ dokusu gibi çeşitli dokularda yüksek oranda ekspresse edilir. PAI-1 transkripsiyonel olarak

TGF- β ile düzenlenir. Ayrıca TGF- β ile indüklenen PAI-1, kanser hücrelerinin göçünün ve invazyonunun inhibisyonuna aracılık eder (123).

16) Fosfatidil İnositol 3 Kinaz (PI3K)

Fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol-4-fosfat (PIP) ve fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatı (PIP2) fosforilasyon yoluyla fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat üretimini katalize eder. Büyüme faktörleri ve hormonlar, hücre büyümesini, hücre döngüsüne girişi, hücre göçünü ve hücre sağkalımını modüle eden fosforilasyon olayını tetikler. PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu) bu işlemi tersine çevirir ve PI3K sinyal yolağı, PTEN'nin işlev kaybına uğradığı insan kanserlerinde yapısal olarak aktive edilir (124).

17) AKT

AKT (protein kinaz B), büyüme faktörlerine ya da sitokin stimülasyonuna yanıt olarak, hücre sağkalım sinyallerinin düzenlenmesinde rol oynayan bir serin / treonin kinazdır. AKT kanserlerde, sık olarak hiperaktivasyon gösteren kinazlardan biridir ve birçok neoplazmanın tümörigenezinde kritik rol oynadığı bilinmektedir (125).

18) mTOR

mTOR (rapamisin'in mekanik hedefi), hücre büyümesinde ve homeostazda anahtar rol oynamaktadır. Tümör içerisinde anormal şekilde düzenlenebilmektedir. Anti kanser tedavisi için mTOR, potansiyel bir hedef olarak halen araştırılmaktadır (126).

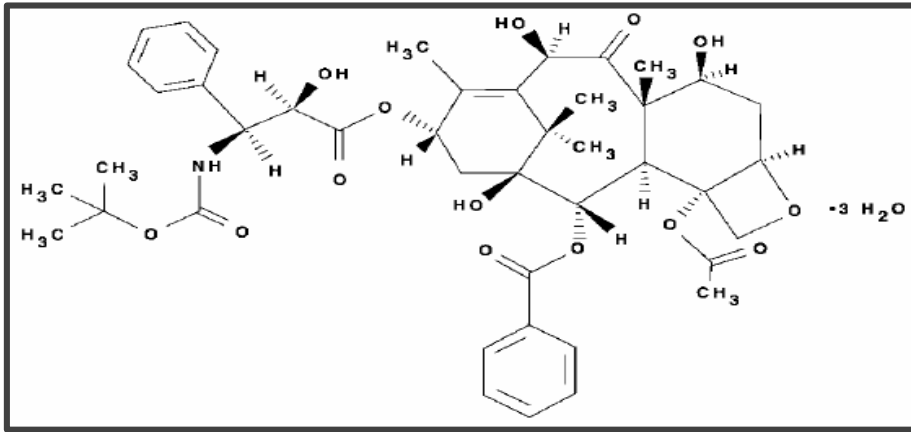
19) PHD1

PHD1 (Prolin hidroksilaz domain 1), EglN ailesinden olan prolin hidroksilazların üyesidir. HIF' in hidroksilasyonunu katalizleyen oksijen sensörleri olarak işlev görürler. PHD'nin mRNA (mesajcı ribonükleik asit) seviyeleri, düşük oksijen koşulları altında HIF ile hipoksiye cevap olarak yukarı doğru düzenlenir (127).

DOSETAKSEL

Taksan sınıfının kemoterapötik ajanları olan Paklitaksel ve Dosetaksel, tümör dokusu içerisinde hücre proliferasyonuna ve metastazik süreçlere etki ederek birden fazla mekanizma ile terapötik etki gösterdiği son yıllarda yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (9).

Antikanser ilaç olan Taxotere'nin etken maddesine 'Dosetaksel' adı verilmektedir. Dosetaksel, taksoid ailesine ait bir antineoplastik ajandır (128). Avrupa'da yetişen bir porsuk ağacı olan *Taxus baccata*'nın iğnelerinden 10-deasetil bakkatin III hemisi sentezi ile elde edilmektedir (8). Molekül ağırlığı 807,9 g/mol'dür. Kimyasal ismi, (2R,3S)-N-karboksil-3-fenilisoserin, N-ter-bütül ester, 13-ester ile 5 β -20-epoksi-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -heksahidroksitaks-11-en-9-on 4-asetat 2-benzoat, trihidrat'dır. Yapısal formülü ise aşağıda yer almaktadır (Şekil 13) (128).



Şekil 13. Dosetaksel' in yapısal formülü.

Dosetaksel'in, göğüs, akciğer, yumurtalık, baş, boyun, gastrik ve prostat kansinmaları gibi çeşitli tümör tiplerinde monoterapisi ve kombinasyon tedavisi oldukça etkilidir (129).

Paklitaksel'in yarı sentetik analogu olan Dosetaksel, mikrotübül stabilize edici anti-kanser bir ajandır. Mikrotübüller, α - ve β -tübülün heterodimerlerden oluşmaktadır. Mitoz sırasında kromozomların hareket etmesinde ve yavru hücrelere doğru ayrılmasında gerekli olan polimerizasyon dinamiklerine sahiptirler (130). Taksanlar, tübülün heterodimerinin β alt-birimine bağlanmaktadır. Bu etkileşim, tübülünün polimerizasyonunu hızlandırmakta ve oluşan mikrotübülleri stabilize etmektedir. Bu durum mikrotübüllerin depolimerizasyonunu ise engellemektedir (131). Netice de, Dosetaksel'in mikrotübülleri stabilize etmesiyle, normal mitotik süreçleri bozduğu, hücre döngüsünün G2/M fazındaki hücreleri bloke ettiği ve sonunda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir (9).

Çeşitli çalışmalar, Dosetaksel ve diğer mikrotübül hedefleyen ajanların kanser hücrelerinde apoptozu teşvik ettiğini göstermektedir. Ancak Dosetaksel'in apoptotik hücre ölümünü nasıl indüklediği henüz netlik kazanmamıştır (132). Bcl-2 gen ailesi, apoptozun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bcl-2'nin inhibisyonu apoptozu indüklerken,

Bcl-2' nin aşırı ekspresyonu apoptozu geciktirmektedir. Bu durum da bir strateji olarak direncin tersine çevrilmesi için, Bcl-2 ekspresyonunun down regülasyonu araştırılmaktadır. Anti-mikrotübül ajanların ise fosforilasyon yoluyla Bcl-2 fonksiyonunun inaktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (133).

Anjiyogenez, tümörlerin yeni kılcal damarları geliştirebileceği bir süreçtir (6). Birçok kemoterapötik ajanın ise, endotel hücre proliferasyonunda, migrasyonda ve anjiyogenez üzerinde önleyici bir etkisi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda Doksetaksel'in hem in vitro hem de in vivo koşullarda anjiyogenezi inhibe ettiği saptanmaktadır (10). Doksetaksel'in anti-anjiyogenik etkisinin, Paklitaksel'den dört kat güçlü olduğu bilinmektedir. Ancak Paklitaksel'in de in vitro koşullarda pikomolar ila nanomolar konsantrasyonlarda anjiyogenezi inhibe ettiği ve in vivo koşullarda mikro damar oluşumunu azalttığı bildirilmektedir (134).

Belirli bir tümör içindeki moleküler ve genetik değişikliklerin anlaşılmasıyla birlikte dosetaksel'in etki mekanizmasının karmaşıklıklarının anlaşılması, hastalar için en uygun tedavinin tanımlanmasına yardımcı olabilir (9). Doksetaksel'in nötropeni, ishal, mide bulantısı ve yorgunluk gibi olumsuz yan etkileri nedeniyle ciddi doz sınırlaması söz konusudur. Bu amaçla, diğer farmakolojik ajanlarla kombine terapinin hastalar üzerinde daha etkili olabileceği düşünülmektedir (135).

KURKUMİN

Kurkumin, Zencefilgiller (Zingiberaceae) ailesine ait olan olan Zerdeçal (*Curcuma Longa*) bitkisinin rizomundan (*Rhizoma Curcumae*) elde edilen hidrofobik, sarı renkli biyoaktif bir bileşendir (136) (Şekil 14).



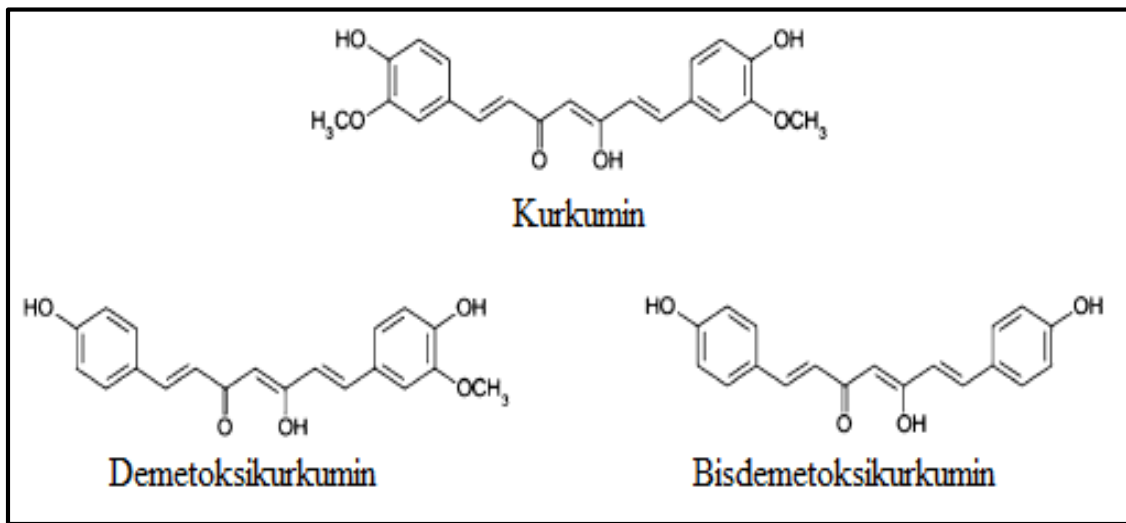
Şekil 14. *Curcuma longa* (137)

Zerdeçal, geleneksel olarak birçok Güney Asya ülkesinde, tıbbi uygulamalarda, yiyecek tatlandırıcı ve kumaş boyamada kullanılmaktadır (Şekil 15) (138). Kurkumin, 2000 yılı aşkın bir süredir Çin’de ve Hindistan’ın eski bir tıbbi sistemi olan Ayurveda’da cilt hastalıklarında, göz enfeksiyonlarında, yanıklarda, ısırıklarda ve aknelerde tedavi etmek amacıyla ilaç olarak kullanılmaktadır (139).



Şekil 15. *Curcuma longa* rizomunun toz hali

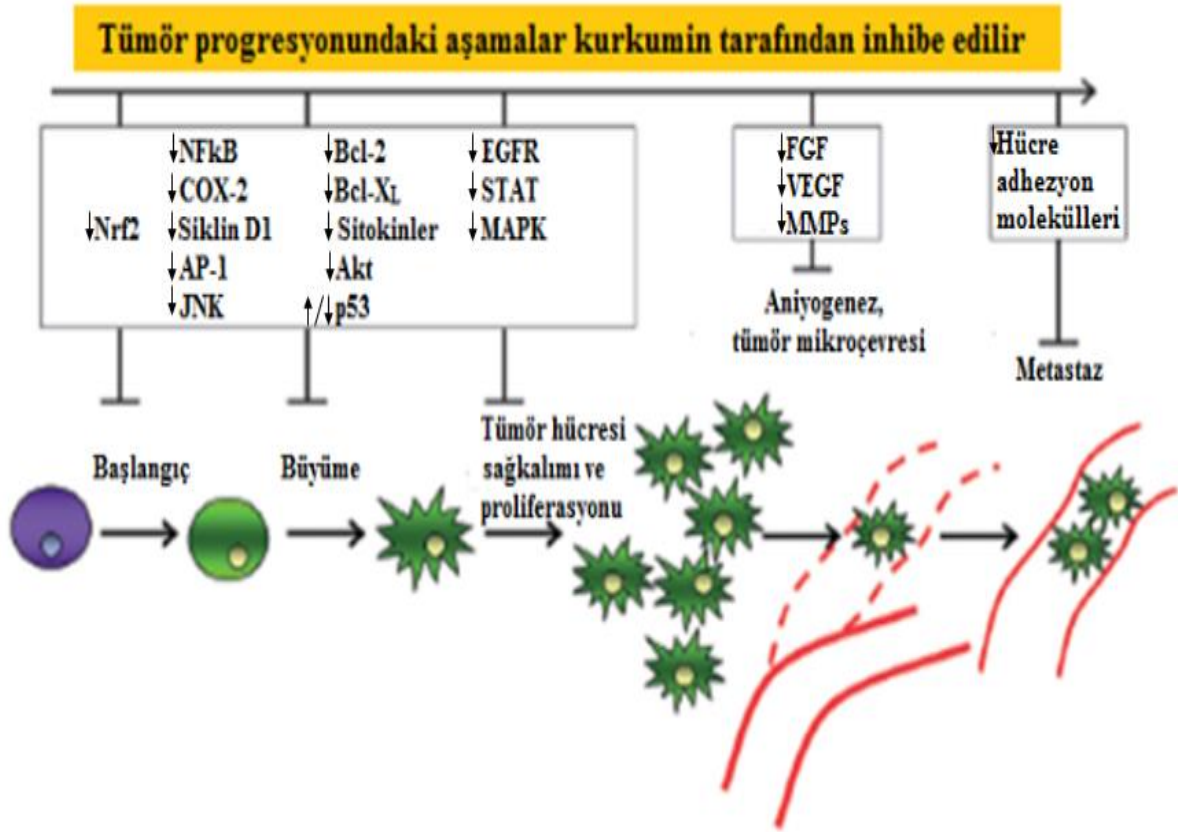
Zerdeçal tozunun yaklaşık % 2-6' sını kurkuminoidler oluşturmaktadır. Bu kurkuminoidler, % 77 kurkumin, % 17 demetoksikurkumin ve % 5 bisdemetoksikurkumin içermektedir (140) (Şekil 16). Suda, inorganik çözücülerde ve alkali koşullar altında çözünmeyen hidrofobik bir polifenoldür (141). Dimetil sülfoksit, etanol, metanol ya da aseton gibi organik çözücüler içinde çözünür ve 183°C'lik bir erime noktasına sahiptir (142).



Şekil 16. Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (143)

Kurkumin, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-diyabetik, anti-koagulan, anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-alerjik olan birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (140).

Son yıllarda yapılan, birçok in vivo ve in vitro çalışmalarda, kanserin önlenmesinde ve tedavisinde kurkuminin potansiyel kullanımı doğrulanmıştır (144). Mesane, göğüs, akciğer, pankreas, prostat, serviks, baş ve boyun, yumurtalık, böbrek, beyin, kemik iliği ve deri kanserleri hücrelerinde yapılan çalışmaların birçoğunda, pleiotropik bir molekül olan kurkuminin hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve apoptozu arttırarak aynı anda birden fazla sinyal yolunu etkilediği bildirilmektedir (Şekil 17) (11). Ayrıca kemoterapötik ajanların ve radyasyonun hücre kültürü üzerindeki etkisini de güçlendirdiği gösterilmiştir (145).

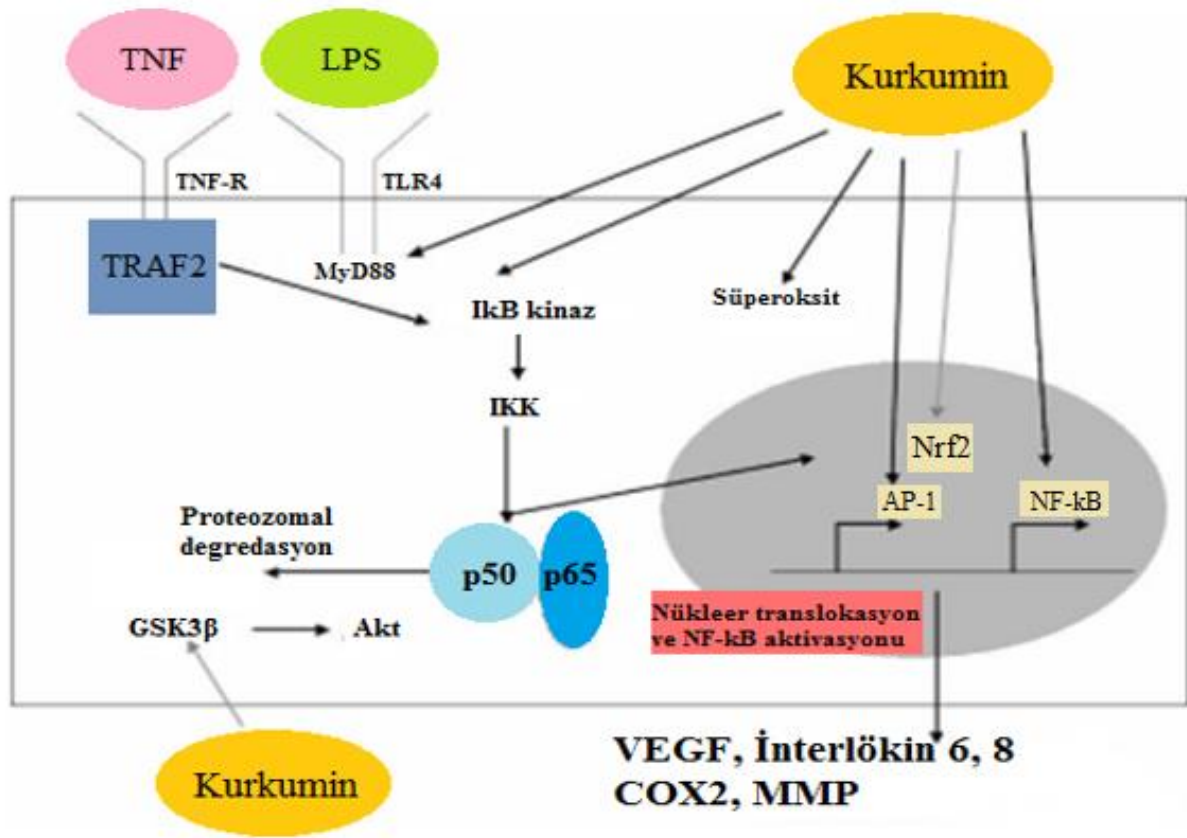


Şekil 17. Kurkuminin kanser gelişimini ve progresyonu inhibe etmesi ve maligniteye giden yolda birden fazla adımı hedeflemesi (11).

Yapılan çalışmalar, Kurkumin'in kanser hücrelerinde kemoterapi ve radyoterapi etkinliğini güçlendirdiği yönündedir (146).

Anjiyogenez için gerekli olan anjiyojenik faktörlere, anjiyogenik onkojenler aracılık eder ve bunlar VEGF ve bFGF gibi proanjiyojenik proteinlerin sentezlenmesini artırır ve anjiyogenez inhibitörlerinin ekspresyonunu azaltır. Proanjiyojenik proteinler arasında,

patolojik anjiyogenezde VEGF ve bFGF önemli faktörlerdir. Anjiyogenez inhibitörleri iki sınıfa ayrılabilir. Birinci sınıf veya direkt anjiyogenez inhibitörleri nispeten endotel hücreleri için spesifiktir ve tümör hücreleri üzerinde çok az etkiye sahiptir. İndirekt inhibitörlerin endotel hücreleri üzerinde doğrudan etkisi olmayabilir, ancak anjiyogenez stimülatörlerinin üretimini down regüle eder. Arbisser ve arkadaşları tarafından, kurkuminin doğrudan anjiyogenez inhibitörü olduğu ve aynı zamanda proanjiyojenik proteinlerin down regülasyonunda önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (Şekil 18) (147).



Şekil 18. Anjiyogenez yolağının kurkumin tarafından bastırılması.

Jelatinaz A (MMP-2) ve jelatinaz B (MMP-9), büyüme faktörlerinin aktive edilmesiyle yeni kılcal damarların oluşumuna neden olan metalloproteinazlardır. Kurkuminin MMP-2 ve MMP-9'u inhibe etmesiyle, ekstrasellüler matriksin yıkılması engellenir ve tümör hücrelerinin invazyonu baskılanır (148). Yapılan hücre kültürü ve ksenograft deneylerinde, tümör hücrelerinin büyüme ve invazyon potansiyelinin bastırılması ile birlikte MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunda düşüş görülmüştür (149). Jelatinaz-B ekspresyonu, FGF-2 ile düzenlenen transkripsiyon faktörü AP-1 tarafından indüklenir. Kurkuminoidler tarafından ise FGF-2

ekspresyonu inhibe edilir. Netice de, kurkuminoidlerin FGF-2'yi hedefleyerek MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiği ve kurkuminin MMP'leri modüle ederek bir anjiyogenez inhibitörü olarak rol oynadığını gösteren kanıtlar bulunmaktadır (11).

Yapılan çalışmalarda, Kurkuminin in vitro koşullar altında PC-3, DU145, LNCaP gibi çeşitli prostat kanser hücrelerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (150). Kurkumin ve analoglarının birçok kanser türünde etkili olduğu bilinmektedir. Kurkuminin türevleri olan diasetildemetoksikurkumin, triasetildemetilkurkumin ve 4- etoksikarboniletil kurkuminin, prostat kanserine karşı kurkuminden daha etkili olduğu bulunmuştur (151).

Kurkumin düşük biyoyararlanıma sahip olmasına rağmen, sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermemesi, molekül ağırlığının düşük olması ve tümör hücrelerinin gelişimini engellemede yüksek aktiviteye sahip olması sebebiyle, kemoterapötik bileşiklerin geliştirilmesinde ideal bir moleküldür (11).

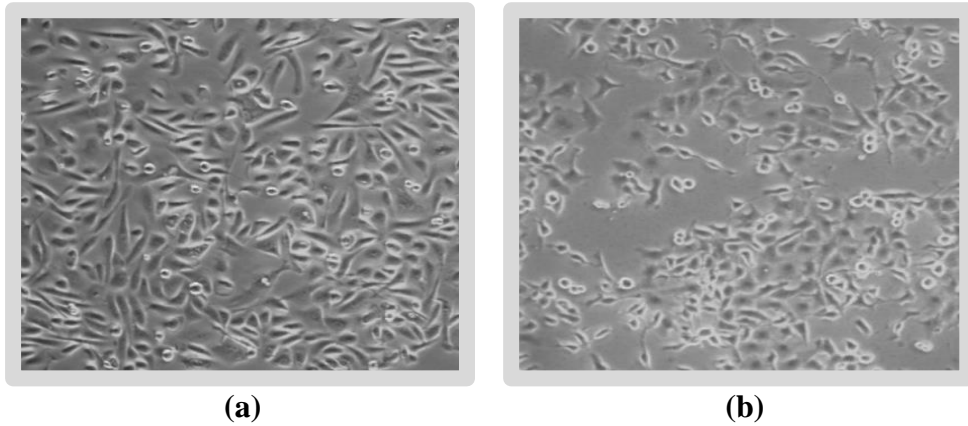
Kurkumin farmakolojik olarak güvenli kabul edilir ve ABD Gıda ve İlaç Kurumu tarafından insan tüketimi için güvenli olarak sınıflandırılır. Bilinen herhangi bir yan etkisi olmaksızın, genellikle çeyni olarak tüketilmektedir (152).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KANSER HÜCRE HATLARI

Çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Hücre Kültürü, Moleküler Genetik ve Görüntüleme laboratuvarlarında yürütüldü.

Bu çalışmada 62 yaşındaki Kafkas erkeğin 4.derece prostatik adenokarsinomlu hücrelerinin, kemik metastazından alınarak oluşturulan PC-3 ve 69 yaşındaki Kafkas erkeğin beyin metastazından alınarak oluşturulan DU-145 olmak üzere iki farklı prostat kanser hücresi kullanıldı. Her iki hücre hattı epitelyal morfolojide ve kültür kabının tabanına yapışan özelliktedir. Transfeksiyon için uygun olup aynı zamanda tümörjenik bir özellik gösterirler. İki hücre hattı da buhar fazındaki sıvı azotta dondurularak saklanmaktadır (Şekil 19) (153).



Şekil 19. (a) PC-3 (ATCC ®CRL-1435) ve (b) DU-145 (ATCC ® HTB-81) hücre hatlarının ışık mikroskopundaki görüntüleri (X20)

GEREÇLER

Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Markası Modeli ve Ülkesi
Biyogüvenlik Kabini	Heraeus, Almanya
Karbondioksitli İnkübatör	Heraeus, Almanya
Santrifüj	Centurion Scientific, İngiltere
İnvert Mikroskop	Nikon- Eclipse Ts100, Japonya
Otomatik Pipet Seti	Gilson, ABD
Dijital Pipetör	Thermo Scientific, ABD
Mikroplate Okuyucu	Thermo Fisher Scientific-Multiskan™ GO, ABD
Soğutmalı santrifüj	Hettich- Micro 200R, Almanya
Santrifüj	Hettich-Micro 200R, Almanya
Nanodrop	OPTİZEN-NanoQ, Kore
PCR Cihazı	Applied Biosystems-ProFlex, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-StepOnePlus, ABD
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems-7500, ABD
Gelişmiş Vorteks Karıştırıcı	WİSD-WiseMix, İngiltere
Analitik Terazi	AND-HR 250 AZ
Doku Homojenizatörü	QIAGEN, Almanya
Karıştırıcı Blok	Bioer Technology, Çin
4°C Buzdolabı	VESTEL, Türkiye
-20°C Derin Dondurucu	VESTEL, Türkiye
-80°C Derin Dondurucu	WİSD, İngiltere
Ultra Saf Su Cihazı	TKA, Almanya
Distile Su Cihazı	TKA, Almanya
Tali Görüntü Tabanlı Sitometre	İnvitrogen, ABD
Trinoküler Floresan Işık Mikroskobu	Carl Zeiss-AXİO, Almanya

YÖNTEMLER

HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN ORTAMI, PASAJLANMASI VE SAKLANMASI

Besi Ortamının Hazırlanması

Yapılan çalışmada kullanılan PC3 (ATCC ®CRL-1435) ve DU 145 (ATCC ® HTB-81) hücre hatları ‘‘American Type Culture Collection’’ (ATCC)’den temin edilmiştir. Projede PC3 (ATCC ®CRL-1435) ve DU 145 (ATCC ® HTB-81) hücre hatlarının kültüre alındığı besi ortamı içeriği, Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Besi ortamı içeriği

Malzeme	Miktar
Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium (DMEM)	200 ml
Minimum Essential Medium Eagle’s (EMEM)	200 ml
Ham’s F-12	200 ml
%5 Fetal Sığır Serum (FBS)	30 ml
%1 L-Glutamin	6 ml
%1 Penisilin/Streptomisin	6 ml

Hazırlanmış olan besiyeri +4°C sıcaklıkta saklandı.

Dondurulmuş Hücrelerin Canlandırılması

-80°C derin dondurucuda saklanmış olan DU 145 (ATCC ® HTB-81) ve PC3 (ATCC ®CRL-1435) hücre hatları 37°C sıcaklıkta bekletilerek çözülmesi sağlandı. Çözülen hücreler 1000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen viallerden, süpernatant dikkatli bir şekilde pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Vialerde dipte bulunan hücre pelletinin üzerine, pipetle dikkatli bir şekilde 1 ml besiyeri eklenip iyice karışmaları sağlandı. 25 cm²’lik flasklara 3 ml besiyeri koyuldu. Vialerde bulunan 1 ml besiyeri ve hücre karışımı, 25 cm²’lik flasklara koyularak hücre ekimi yapıldı. Flasklar 37°C’ de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alındı. DU 145 ve PC3 hücre hatları 3.pasaja kadar çoğaltıldı ve ileri kullanımları için stokları hazırlandı. Çalışmaların tamamında PC3 ve DU 145 hücre hatlarının 5. pasajlarından başlandı ve çalışma en fazla 25. pasajda sonlandırıldı.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücre pasajının ilk aşamasında, 75 cm²'lik flasklarda tabana tutunmuş olan hücrelerin besiyeri dökülüp uzaklaştırıldı. 75 cm²'lik flaska 6 ml (25 cm²'lik flaska 3 ml) Tripsin-EDTA (Etilendiamin tetraasetikası) konuldu ve 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde yaklaşık 10 dakika bekletildi. Hücrelerin tabandan kalkması sağlandı. Pipetle dikkatli bir şekilde, tripsinli hücreler toplanarak 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. PC3 hücre hattı 1000 rpm'de 2 dakika, DU 145 hücre hattı ise 750 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin, süpernatantı pipetle dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Falkon tüpün dibinde bulunan hücre peletinin üzerine 10 ml besiyeri konuldu ve iyice karıştırıldı. Karışım, steril bir pipet yardımıyla alınarak 75 cm²'lik flaska konuldu. İvert mikroskopta hücre yoğunluğuna bakıldı ve kontrol edildi. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alındı (Şekil 20).



(a)



(b)

Şekil 20. (a) İvert mikroskop, (b) 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör

Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Dondurma işlemi için öncelikle, 75 cm²'lik flaska hücrelerin tabandan kalkması için 6 ml Tripsin-EDTA konulup 10 dakika 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. İvert mikroskopta hücrelerin tabandan kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Tabandan kalkan hücreler, steril bir pipetle flasktan toplanarak 15 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı. PC3 hücre hattı 1000 rpm'de 2 dakika, DU 145 hücre hattı ise 750 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant steril bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Dipte bulunan hücre peletinin üzerine, hücrelerin tripsinden

tamamen arınması amacıyla 4 ml besiyeri konuldu, peletin çözülmesi için dikkatli bir şekilde çalkalandı ve santrifüj edildi. Süpernatant steril bir pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Dipte bulunan hücre peletinin üzerine % 10 DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren 6 ml besiyeri konuldu ve iyice karışmaları sağlandı. Hazırlanan süspansiyon steril bir pipet yardımıyla 4 adet viale, içlerinde 1,5 ml olacak şekilde paylaştırıldı. Vialler kısa süreli saklama için -80°C’de uzun süreli saklama için sıvı azota konuldu.

MOLEKÜLLERİN UYGULANMASI VE DOZ TESPİTİ (MTT TESTİ)

Dosetaksel Stok ve Uygulama Solusyonlarının Belirlenmesi

Dosetaksel, flakon şeklinde temin edildi. 5ml’inde 4 µM olacak şekilde Dosetaksel hesaplandı. Çözücü olarak 1 ml etanol, 9 ml ticari su karışımı kullanıldı. Hazırlanan karışım iyice vortekslendi. 4 µM’lık Dosetaksel’in seyreltilmesi için 8 adet 1,5 ml’lik ependorf hazırlandı. İlk ependorfa 4 µM’lık Dosetaksel’den 1 ml konuldu. Diğer kalan 7 ependorfun her birine, Dosetaksel’in çözücüsü olarak hazırlanan karışımdan 500 µl konuldu. İkinci ependorfa 500 µl Dosetaksel konuldu. İkinci ependorftan 500 µl alınarak üçüncü ependorfa konuldu ve vortekslendi. Bu şekilde devam edilerek yarı yarıya seri sulandırım yapıldı. Ependorf tüplerde hazırlanan bu karışımdan içerisinde 180 µl besi yeri bulunan kuyucuklara 20 µl konularak 10 kat seyrelmesi sağlandı. Bu şekilde Dosetaksel’in 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,125 nM’lık dozları kullanıldı. Uygulama 24. 48. ve 72. saatlik süreler ile 6 tekerrür olarak yapıldı. Plakanın çevresindeki kuyucuklara 20 µl su ve kalan kuyucuklara da kontrol için hazırlanan Dosetaksel’in çözücüsünden 20 µl uygulandı. Madde uygulaması yapılan plakalar 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

Kurkumin’in Stok ve Uygulama Solusyonlarının Belirlenmesi

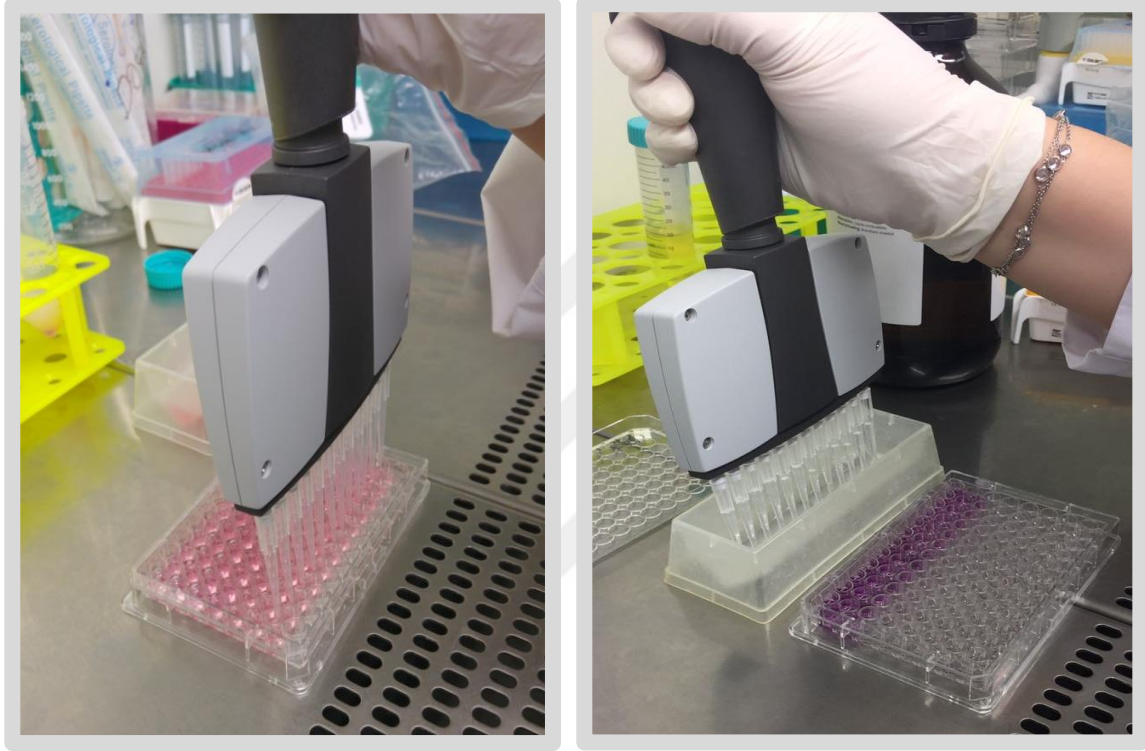
Kurkumin toz halinde temin edildi. Stok, 10 ml’inde 2,5 mM olacak şekilde hazırlandı. 9,2 mg tartılarak 15 ml’lik falkon tüplerine konuldu. Çözücüsü olarak 1 ml DMSO, 4 ml etanol ve 5 ml ticari su karışımı kullanıldı. Hazırlanan karışım iyice vortekslendi. Taşıt madde Kurkumin hazırlanırken kullanılan seyreltmeler birebir tekrar edilerek hazırlandı. 2,5 mM’lık stoktan 2 ml’inde 0,5 mM Kurkumin olacak şekilde seyreltme yapıldı. 0,5 mM’lık Kurkumin’in seri sulandırılması için 6 adet 1,5 ml’lik ependorf hazırlandı. İlk ependorfa 0,5 mM’lık Kurkumin’den 1 ml konuldu. Diğer kalan 5 ependrofun her birine Kurkumin’in taşıt maddesinden 500 µl konuldu. İkinci ependrofa 0,5 mM’lık Kurkumin’den 500 µl konuldu.

İkinci ependorftan 500 µl alınarak üçüncü ependorfa konuldu ve vortekslendi. Bu şekilde devam edilerek yarı yarıya seyreltilmeler yapıldı. Kurkumin'in 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM, 1,56 µM' lık dozları kullanıldı. Bir gün önceden ekim yapılan 96 kuyucuklu plakalara Kurkumin dozları 6 tekrerrür olacak şekilde 20 µl uygulandı ve 37°C'de %5 CO₂ koşullarında 24. 48. ve 72. saat süre ile inkube edildi. Bu süreler sonunda MTT testi yapıldı.

IC50 Dozlarının Belirlenmesi (MTT Testi)

Yapılan çalışmada, prostat kanseri hücre serisi olan DU 145 ve PC3 hücrelerine, antineoplastik bir ilaç olan Dosetaksel ve polifenol bir molekül olan Kurkumin uygulandı. İnvert mikroskopta, PC3 ve DU 145 prostat kanseri hücre hatlarının 75cm²'lik flaskların tabanını kapladığı gözlemlendi. 75 cm²'lik flaslardaki hücrelerin, besiyeri dökülüp uzaklaştırıldı. Hücrelerin tabandan kalkmasını sağlamak için 6 ml Tripsin-EDTA steril bir pipet yardımıyla flaslara konuldu ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 10 dakika bekletildi. İnvert mikroskopta hücrelerin tabandan tamamen kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Tabandan tamamen kalkan hücreler, 15 ml' lik falkon tüplere steril bir pipet yardımıyla aktarıldı. PC3 hücre hattı 1000 rpm'de 2 dakika, DU 145 hücre hattı ise 750 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin, süpernatantı pipetle dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrasında falkon tüpün dibinde ise hücre peleti elde edildi. 96 kuyucuklu plaka için, 20 ml besiyeri ve hücre peleti karışımı hazırlandı ve iyice karıştırıldı. Falkon tüpte hazırlanan karışım her seferinde karıştırıldı ve steril bir küvete az az döküldü. Çoklu pipet yardımıyla hücrelerin homojen dağılmasını sağlamak için, her defasında pipetaj yapılarak 96 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 180 µl hücre ekimi yapıldı. Hücre ekimi yapılan plakalar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 12 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında invert mikroskopta hücrelerin tabana tutunup tutunmadığı ve homojen bir yayılım gösterip göstermediği kontrol edildi. Dosetaksel'in her bir konsantrasyonu, 8 kuyucuğa Kurkumin'in her bir konsantrasyonu 6 kuyucuğa, 6 tekrerrür edecek şekilde 96 kuyucuklu plakada düzenlendi. Homojen dağılım gösteren hücrelerin her kuyucuğuna, 20 µl madde uygulaması yapıldı. Uygulama yapılan plakalar 24, 48 ve 72 saat 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücre sağkalım (viyabilite) analizleri için MTT testi yapıldı. MTT testi için 5 mg/ml dozunda "Yellow tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)" test solüsyonu hazırlandı. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 20 µl MTT solüsyonu pipetlendi. Daha sonra plakalar 2 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğundaki

besiyeri dökülerek uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200 µl ultra püre DMSO pipetlendi (Şekil 21). 2 saat, enzimatik boyanın DMSO tarafından çözünmesi için beklenildi ve plakalar Multiskan GO mikropilaka okuyucu ile 492 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Kontrol grubundan elde edilen değer % 100 canlılık olarak alındı ve karşılaştırmalı hücre sağ kalım-ölüm oranı şeklinde tespit edildi.



(a)

(b)

Şekil 21. (a) 96 kuyucuklu plakaya hücre ekimi, (b) Enzimatik boyanın DMSO ile çözdürülmesi.

LD50 Değeri Belirlenen Kurkumin'in Uygulanması

Dosetaksel'in 8 farklı konsantrasyondaki dozu ve Kurkumin'in LD50 dozu hazırlandı. 1 gün önceden 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş olan ve madde uygulaması yapılabilecek yoğunluğa gelmiş olan PC3 ve DU 145 hücrelerine, Dosetaksel'in dozlarıyla Kurkumin'in LD50 dozunun kombinasyonu uygulandı. Dosetaksel'in 400 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,125 nM'lık dozlarının her biri Kurkumin'in 50 µM dozu ile birlikte uygulandı. Kurkumin'in Dosetaksel dozlarıyla kombinasyonu olan 8 farklı konsantrasyondaki dozlar 6 tekerrür olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 20 µl olacak

şekilde pipetlendi. 24, 48 ve 72. saatler için uygulama yapılan plakalar 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra yukarıda anlatıldığı gibi hücre sağkalım (viyabilite) analizleri için MTT testi yapıldı. Kontrol grubundan elde edilen değer % 100 canlılık olarak alındı ve karşılaştırmalı hücre sağ kalım-ölüm oranı şeklinde belirlendi. % 100 toplam değer üzerinden, elde edilen sonuçlar hesaplandı. Konsantrasyon ve ölüm oranları kullanılarak SPSS 18 yazılımı kullanılarak Log10 tabanında logaritmik probit analizi yapıldı. Böylece moleküllerin tek tek ve karışımların birlikte oluşturdukları IC50 konsantrasyonları belirlendi.

UYGULAMA GRUPLARI

Yukarıdaki çalışmalar ile Dosetaksel ve Kurkumin için uygulama dozları belirlendi. Tezin bundan sonraki aşamalarında uygulama grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol

Grup 2: 35 nM Dosetaksel

Grup 3: 70 nM Dosetaksel

Grup 4: 50 µM Kurkumin

Grup 5: 35 nM Dosetakel + 50 µM Kurkumin

Grup 6: 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin

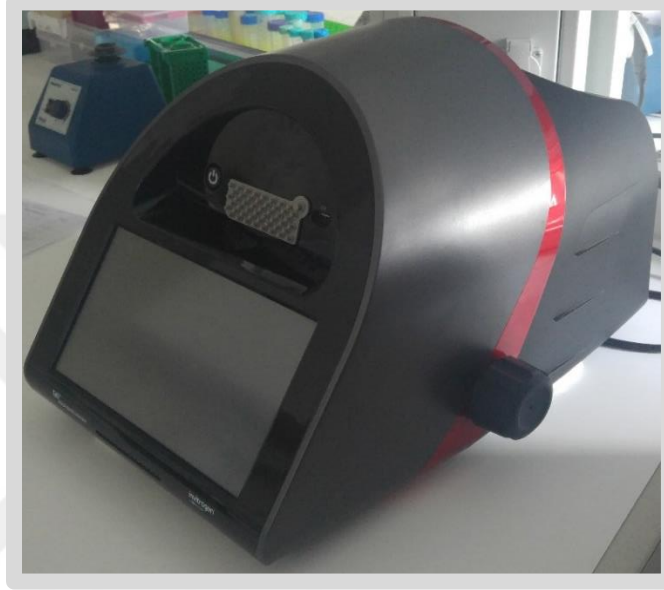
İNVAZYON DENEYİ

Yara İyileştirme: 25 cm²'lik flasklara, PC3 ve DU 145 hücre hatlarının ekimi yapıldı. Ekim yapılan hücrelerin flask tabanını %90 oranında kaplaması beklendi. Daha sonra 200 µl' lik sarı pipet ucuyla flask tabanındaki kaplama malzemesine zarar verilmeden 3 farklı noktada yara oluşturuldu. Yara oluşturulduktan sonra kalkan hücrelere tekrar yapışması engellenmesi için flask içindeki besi yeri uzaklaştırıldı ve flasklar PBS ile yıkandı. Uygulama yapılacak madde 15 ml'lik falkon tüpte hazırlandı. Flasklar içine 3 ml bu madde içeren besi yerleri konuldu. İnkübatöre alınan flasklarda. 0.,12. ve 24. saatlerde trinoküler ışık mikroskopunda hücreler gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

GENOMİK VE PROTEOMİK ÇALIŞMALAR

TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi

Bu yöntemde hücreler, Tali® Apoptosis Assay Kit Annexin V Alexa Fluor® 488 ve propidyum iyodid kullanılarak boyandı. Ölü hücreler kırmızı ve yeşil floresan (sarı olarak gözlenir), apoptotik hücreler yeşil floresan, canlı hücreler çok az floresan gösterirler veya hiç göstermezler (154) (Şekil 22).



Şekil 22. TALİ cihazı

TALİ sitometre ile apoptoz tayin çalışması için 25 cm²'lik flasklara 4 ml besiyeriyle hücre ekimi yapıldı. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alındı. Hücrelerin çoğalma durumuna bakıldı. Madde uygulaması yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda 25 cm²'lik flasklardan besiyeri uzaklaştırıldı. 25 cm²'lik flasklara 3 ml Tripsin EDTA eklendi. 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde yaklaşık 10 dakika bekletildi. Hücrelerin tabandan kalkması sağlandı. Pipetle dikkatli bir şekilde, tripsinli hücreler toplanarak 1,5 ml'lik ependorflara aktarıldı. Hücreler, 1500 rpm'de 1,5 dakika 24°C'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant tamamen çekilerek uzaklaştırıldı ve dipte bulunan hücre peleti analiz için kullanıldı. Tali® Apoptosis Assay Kit Annexin V Alexa Fluor® 488 ve propidyum iyodid (Life technologies) kullanılarak kit protokolüne geçildi.

1)Ependorfun dibinde bulunan hücre peletinin üzerine 100 µl 1X Annexin binding buffer (ABB) konuldu.

- 2) 1X Annexin binding buffer'ın her 100 µl'si için 5 µl Annexin V AlexaFluor® 488 (Component A) konuldu ve vortekslendi.
- 3) 25°C'de, karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 4) İnkübasyondan sonra 1500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- 6) Ependorfun dibinde bulunan hücre peletinin üzerine 100 µl 1X Annexin Binding Buffer (ABB) eklenerek vortekslendi.
- 7) Ependorflara, her 100 µl 1X Annexin binding buffer için 1 µl TALİ® Propidium Iodide (PI, component B) solüsyonu eklendi.
- 8) 25°C'de, karanlıkta 1-5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 9) İnkübasyon sonrasında ependorfun içerisindeki karışımdan 25 µl alınarak TALİ slaytlarına konuldu ve TALİ apoptoz analiz programı ile okundu.

Genetik Çalışmalar

a)RNA izolasyonu: RNA (ribonükleik asit) izolasyonu için, 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına yukarıda anlatıldığı şekilde hücre ekimi yapıldı. 1 gün sonra hücre yoğunluğu homojen dağılım gösterdiğinden madde uygulaması yapıldı. Madde uygulaması yapılmadan önce besiyeri dökülüp, yeni besiyeri konuldu. Dozlar, 12 tekrerrür olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya pipetlendi. 48 saat 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 48.saatın sonunda RNA izolasyonu protokolü uygulandı.

Prostat kanseri hücre serisi olan DU 145 ve PC3 hücrelerinde, total RNA izolasyonunda ambion® RNA Kiti(Life technologies) kullanıldı ve izolasyon kit protokolüne göre yapıldı.

- 1) Lizis solüsyonu, her 1 ml lizis buffer içinde 10 µl 2-merkaptoetanol olacak şekilde hazırlandı.
- 2) 96 kuyucuklu plakalardaki hücrelerin medyumunu uzaklaştırıldı.
- 3) 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna lizis solüsyonundan 125 µl eklendi ve 20 dakika hücrelerin lizis olması için beklenildi.
- 4) Lizis olan hücreler her 4 kuyucukta, 1 adet 1,5 ml'lik ependrofta birleştirildi ve üzerine son hacim 500 µl olduğundan 1:1 oranında %70'lik etanol eklendi, hemen vortekslendi.
- 5) Bu karışım spin kolonlara aktarıldı ve 12000 g'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edildi.
- 6) Spin kolonda, altta biriken sıvı döküldü ve 700µl wash buffer I eklendi.
- 7) 12000 g'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edildi ve spin kolonların alt kısmı değiştirildi.

- 8) 500 µl wash buffer 2 eklendi.
- 9) 12000 g'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edildi ve altta biriken sıvı döküldü.
- 10) Bir kere daha 500 µl wash buffer 2 eklendi.
- 11) 12000 g'de 15 saniye 25°C'de santrifüj edildi ve altta biriken sıvı döküldü.
- 12) Filtrenin kuruması için 2 dakika 12000 g'de 25°C'de santrifüj edildi ve alttaki tüp atıldı, üst kolon yeni toplama tüplerinin içine alındı.
- 13) Üzerine 30 µl RNaz (ribonükleaz) içermeyen su, membranın tam ortasına pipetlendi ve 1 dakika 25°C'de inkübe edildi.
- 14) 12000 g'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 15) Üstteki kolon atıldı ve toplama tüpünde biriken RNA'nın miktarı Nanodrop'ta ölçüldü (Şekil 23).



(a)



(b)

Şekil 23. (a) Soğutmalı santrifüj, (b) Nanodrop cihazı

b) RNA'dan cDNA sentezlenmesi: Prostat kanseri hücre serisi olan DU 145 ve PC3 hücrelerinden elde edilen RNA'ların, cDNA (komplementer deoksiribonükleik asit) 'sının elde edilebilmesi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanıldı.

- 1) -80°C'de saklanan RNA'ların +4°C'de erimesi sağlandı.
- 2) cDNA master mix, 1,5 ml'lik ependorfta hazırlandı.

Bir reaksiyonluk cDNA master mix i;

- 2 µl 10X RT Buffer,
- 0,8 µl 25X dNTP Mix (100 mM),
- 2 µl 10X RT Random Primers,
- 1 µl Multi Scribe™ Reverse Transcriptase ve
- 4,2 µl Nükleaz içermeyen H₂O'dan oluşur.

3) 200 µl'lik PCR striplerinde, elde edilen RNA'ların son hacmi 10 µl olacak şekilde H₂O ile eşitlendi.

4) PCR striplerindeki 10 µl RNA ve nükleaz içermeyen H₂O karışımının üzerine, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'i ile hazırlanan cDNA master mix karışımından 10 µl eklendi ve son hacim 20 µl'ye tamamlandı.

5) Son hacmi 20 µl olan reaksiyon karışımı PCR cihazına konuldu (Şekil 24).

PCR cihazı;

Adım 1: 25 °C, 10 dk,

Adım 2: 37 °C, 120 dk,

Adım 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlandı ve cDNA sentezi yapıldı.

6) Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 C'de saklandı.



Şekil 24. PCR cihazı

c)Real Time PCR (RT-qPCR) Çalışmaları: Prostat kanseri hücre serisi olan DU 145 ve PC3 hücre hatlarında kontrol ve deneme gruplarında Anjiyogenez yolağı genleri olan PHD1

(Hipoksi ile İndüklenen Faktör Prolyl Hydroxylase 1), HIF-1 α (Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 Alfa), HIF-1 β (Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 Beta), CBP (cAMP-response element binding proteine bağlanan protein), P300 (Histone acetyltransferase p300), IL-6 (İnterlökin-6), VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü), VEGFR (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü), FGFR3 (Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü 3), IGFR 2 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü 2), SRC, INOS (Nitrik Oksit Sentaz), FAK (Fokal Adhezyon Kinazı), SMAD3 (mothers against decapentaplegic homolog 3), COX-2 (Siklooksijenaz 2), PAI-1 (Plasminojen Aktivatör İnhibitorü-1) ve MMP-3 (Matriks Metalloproteinaz 3)'ün ekspresyonu tüm gruplarda RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi (Tablo 4).

Tablo 4. Gen isimleri, primer baz dizileri ve uzunlukları

Gen adı		Primer	Primer uzunluğu(Bp)
β -tübülin	Forward	GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC	27
	Reverse	CACCAACTTCATCCACGTTCCACC	23
GAPDH	Forward	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	24
	Reverse	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	24
β - aktin	Forward	CCTCTGAACCCTAAGGCCAAC	21
	Reverse	TGCCACAGGATTCCATACCC	20
PHD1	Forward	CGTGAGGCATGTTGACAATC	20
	Reverse	AACACCTTTCTGTCCCGATG	20
HIF-1 α	Forward	AGCCAGATCTCGGCGAAGT	19
	Reverse	CAGAGGCCTTATCAAGATGCG	21
CBP	Forward	CTCTACATCCTAAGTGCTAGG	21
	Reverse	CAGTAGATGCTAGAGAAAGCC	21
P300	Forward	GGGGAAATTTTGGCTGGCAAG	21
	Reverse	CTGCTCTACCTAAATTCCCAG	21
HIF-1 β	Forward	CAAGCCCCTTGAGAAGTCAG	20
	Reverse	GAGGGGCTAGGCCACTATTC	20

IL-6	Forward	ATGAACTCCTTCTCCACAAG	20
	Reverse	AGAGCCCTCAGGCTGGACTG	20
VEGF	Forward	AGGAGGGCAGAATCATCACG	20
	Reverse	CAAGGCCACAGGGATTTTCT	21
VEGFR	Forward	GAACATTTGGGAAATCTCTTGC	22
	Reverse	CGGAAGAACAATGTAGTCTTTGC	23
FGFR-3	Forward	CAGTTGGTCTTCGGCAGC	18
	Reverse	TGCTGCCAAACTTGTTCT	18
IGFR-2	Forward	CCCAGGCAGGGTTTTCTTTT	20
	Reverse	ACCGGGCCACACACATTTA	19
SRC	Forward	AGAGTGCCCTATCCTGGGAT	20
	Reverse	AAAGTAGTCTTCCAGGAAGGCC	22
INOS	Forward	CCAGAGAGATTCATCTGACCG	21
	Reverse	GGTCCCTACAACGAGTCTGAA	21
FAK	Forward	GTGTGAGGGAGAAGTATGAG	20
	Reverse	ATCTGTAGACTGGAGACAGG	20
SMAD3	Forward	TGCTGGTGACTGGATAGCAG	20
	Reverse	CTCCTTGAAGGTGCTGAAG	20
COX-2	Forward	CAGGATACAGCTCCACAGCA	20
	Reverse	ATCACAGGCTTCCATTGACC	20
PAI-1	Forward	AGCTCCTTGTACAGATGCCG	20
	Reverse	ACAACAGGAGGAGAAACCCA	20
MMP-3	Forward	GGTCTCTTTCACCTCAGCCAACAC	23
	Reverse	CAGGCGGAACCGAGTCAGG	19

Endojen gen olarak β -tübülin, GAPDH, ve β -aktin kullanıldı.

Gen ekspresyonu çalışmalarında prostat kanseri hücre serisi olan DU 145 ve PC3 hücre hatlarından izole edilen RNA'lardan, elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Reaksiyon başına 7 μ l

SYBR Green Master mix ve 0,5 µl cDNA, striplerde hazırlanarak otomatik çoklu pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakanın içerisine konuldu. Her reaksiyon için 0,2 µl forward, 0,2 µl reverse primer ve 7 µl nükleaz içermeyen su striplerde hazırlandı. Daha sonra otomatik çoklu pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakalara nükleaz içermeyen su ile sulandırılmış forward ve reverse primer karışımı eklendi. Hazırlanan 96 kuyucuklu plaka, RT-qPCR cihazına konuldu.

RT-qPCR, 1 siklus 50°C'de 2 dakika ve 95°C'de 10 dakika, bunu takiben 50 siklus denatürasyon (95°C 15 sn), annelling (primer eşleşmesi) ve elongasyon (primer uzaması) (60°C'de 1 dakika) olacak şekilde programlanmıştır.

Proteomik Çalışmalar

a)Protein izolasyonu: Protein izolasyonu için 25 cm²'lik flasklara hücre ekimi yapıldı. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alındı. Hücrelerin çoğalma durumuna bakıldı. Daha önceki yapılan çalışmalarda belirlenen doz ve sürelerle, madde uygulaması yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda 25 cm²'lik flasklardan besiyeri uzaklaştırıldı. 25 cm²'lik flasklara 3 ml Tripsin-EDTA eklendi. 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde yaklaşık 10 dakika bekletildi. Hücrelerin tabandan kalkması sağlandı. Pipetle dikkatli bir şekilde, tripsinli hücreler toplanarak 1,5 ml'lik ependorflara aktarıldı.

1)Hücreler, 3000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tümüyle uzaklaştırıldı.

2)Hücre peletinin üzerine 0,1 M'lık sodyum fosfat tamponundan 400 µl eklendi.

Sodyum Fosfat Tamponunun Hazırlanışı

- i. Solusyon A: Na₂HPO₄.2H₂O'dan 1,78 gr tartıldı. 50 ml'ye dH₂O ile tamamlanarak 0,2 M'lık Solusyon A elde edildi.
 - ii. Solusyon B: NaH₂PO₄.2H₂O'dan 0,78 gr tartıldı. 25 ml'ye dH₂O ile tamamlanarak 0,2 M'lık Solusyon B elde edildi.
 - iii. Solusyon A'dan 18 ml, Solusyon B'den 7 ml alındı. 50 ml'ye dH₂O ile tamamlanarak 0,1 M'lık Sodyum Fosfat Tamponu elde edildi.
- 3) Hücreler, bilyelerin yardımıyla doku homojenizatöründe 1 dakika parçalandı.
 - 4) Parçalanmış hücreler, çalkalayıcı da 1 dakika çalkalandı.
 - 5) Süspansiyon edilen hücreler, doku homojenizatöründe 2 dakika inkübe edildi.
 - 6) Hücreler 14000 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi.
 - 7) Santrifüj edildikten sonra süpernatant, 1,5 ml'lik ependorfa aktarıldı.
 - 8) Elde edilen proteinlerin miktarı nanodropta ölçüldü ve proteinler -80°C'de saklandı.

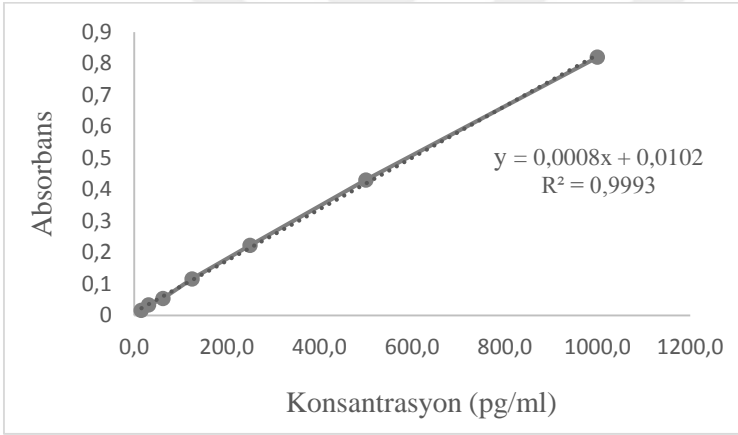
b) VEGF-A Elisa analizi: Protein izolasyonu yapılan örneklerin, protein miktarları nanodropta ölçüldü. Örnekler, protein miktarlarının son hacmi 0,12 µl olacak şekilde sodyum fosfat tamponu ile eşitlendi. Daha sonra Human VEGF-A Platinum ELİSA kit protokolüne geçildi (Tablo 5).

Tablo 5. ELİSA plaka düzeni

	1	2	3	4
A	Standart 1	Standart 1	Örnek 1	Örnek 1
B	Standart 2	Standart 2	Örnek 2	Örnek 2
C	Standart 3	Standart 3	Örnek 3	Örnek 3
D	Standart 4	Standart 4	Örnek 4	Örnek 4
E	Standart 5	Standart 5	Örnek 5	Örnek 5
F	Standart 6	Standart 6	Örnek 6	Örnek 6
G	Standart 7	Standart 7	Örnek 7	Örnek 7
H	Blank	Blank	Örnek 8	Örnek 8

- 1) Tüm standart kuyucuklarına, 100µl sample diluent eklendi.
- 2) Human VEGF-A standardından (konsantrasyonu=2000 pg/ml), 100 µl A1 ve A2'ye pipetlendi. A1 ve A2 içerikleri karıştırıldı ve sırasıyla B1 ve B2'ye aktarıldı. İşlem bu şekilde devam ettirildi. Son kuyucuklardan (G1, G2) 100 µl atıldı.
- 3) Blank kuyucuklarına, 100 µl sample diluent duplicate olacak şekilde eklendi.
- 4) Örneklerin kuyucuklarına, 50 µl sample diluent eklendi.
- 5) Örneklerin kuyucuklarına, 50 µl örnek, duplicate olacak şekilde eklendi.
- 6) Yapışkan bir film ile kapatıldı ve oda sıcaklığında (18-25 °C) 400 rpm'de mikrolaka çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi.
- 7) Yapışkan film çıkarıldı ve içerisindeki sıvı döküldü. Wash buffer ile 6 kez yıkandı.
- 8) Tüm kuyucuklara, 100 µl biotin-conjugate eklendi.
- 9) Yapışkan bir film ile kapatıldı ve oda sıcaklığında (18-25 °C) 400 rpm'de mikrolaka çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
- 10) İnkübasyondan sonra yapışkan film çıkarıldı ve içerisindeki sıvı döküldü. Wash buffer ile 6 kez yıkandı.
- 11) Tüm kuyucuklara 100 µl seyreltilmiş streptavidin-HRP eklendi.

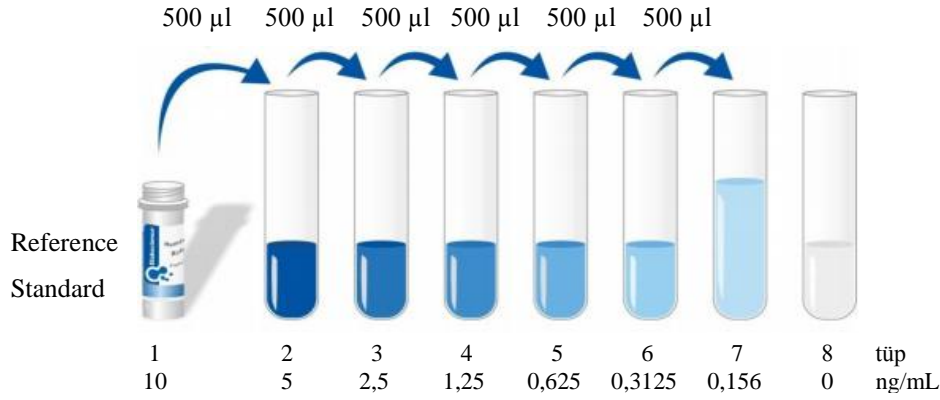
- 12) Yapışkan bir film ile kapatıldı ve oda sıcaklığında (18-25 °C) 400 rpm'de mikropilaka çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
- 13) İnkübasyondan sonra yapışkan film çıkarıldı ve içerisindeki sıvı döküldü. Wash buffer ile 6 kez yıkandı.
- 14) Tüm kuyucuklara, 100 µl TMB substrat solusyonu eklendi.
- 15) Mikropilaka, oda sıcaklığında (18-25°C) yaklaşık 30 dakika inkübe edildi. Yoğun ışığa maruz bırakılmaktan kaçınıldı.
- 16) Plakadaki renk değişimi izlendi ve en yüksek standart, koyu mavi renge dönüştüğünde substrat reaksiyonu stop solusyonuyla durduruldu.
- 18) Tüm kuyucuklara hızlı bir şekilde 100 µl stop solusyonu eklendi. Stop solusyonu eklendikten hemen sonra, spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okundu.
- 19) Belirlenen O.D değerleri, standart eğri grafiği (Şekil 25) kullanılarak analiz edildi.



Şekil 25. VEGF-A Human ELİSA, standart eğri grafiği

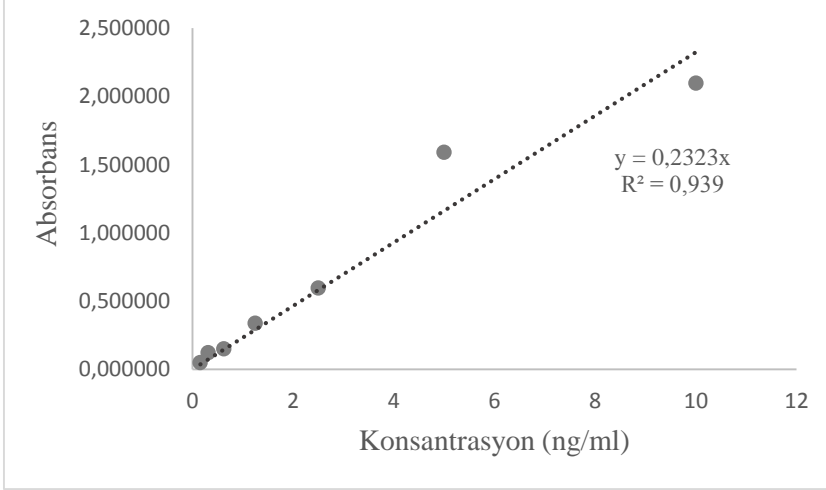
HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) ELİSA Analizi: Protein izolasyonu yapılan örneklerin, protein miktarları nanodropta ölçüldü. Örnekler, 3 tekerrürlü gruplar halinde çalışıldı. Grupların içindeki en düşük konsantrasyona sahip örneklerin protein miktarları baz alındı ve kendi aralarında sodyum fosfat tamponu ile eşitlendi. Daha sonra Human HIF-1 α kit protokolüne geçildi.

Önerilen konsantrasyonlarda, standardın seri sulandırılması yapıldı (Şekil 26).



Şekil 26. Standardın seri sulandırılması

- 1) Kullanmadan önce, tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- 2) Her kuyucuğa 100µl standart, blank ve örnek eklendi. Blank olarak, reference standard&sample diluent kullanıldı. 96 kuyucuklu plaka sealer ile kapatıldı. 37 °C’de 90 dk. inkübe edildi.
- 3) Her kuyucuğun sıvısını çıkarıldı, yıkama yapılmadı.
- 4) Her kuyucuğa 100µl biotinylated detection Ab solüsyonu eklendi. 96 kuyucuklu plaka sealer ile kapatıldı. İyi karışması sağlandı. 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
- 5) Her kuyucuk, wash buffer (yaklaşık 350µl) ile yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- 6) Her kuyucuğa yaklaşık 100µl HRP konjugatı eklendi. 96 kuyucuklu plaka sealer ile kapatıldı. 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
- 7) Her kuyucuk, wash Buffer (yaklaşık 350µl) ile yıkandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı
- 8) Her kuyucuğa 90µl Substrate reagent eklendi. Yeni bir sealer ile kapatıldı. 37 °C’de 15 dakika inkübe edildi.
- 9) Kuyucuklarda belirgin bir gradyan ortaya çıktığında reaksiyon durduruldu. Her kuyucuğa 50µl stop solusyonu eklendi.
- 10) Mikroplaka okuyucu da 450 nm’de O.D değerini belirlendi.
- 11) Belirlenen O.D değerleri, standart eğri grafiği kullanılarak analiz edildi (Şekil 27).



Şekil 27. HIF-1 α ELİSA, standart eğri grafiği

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

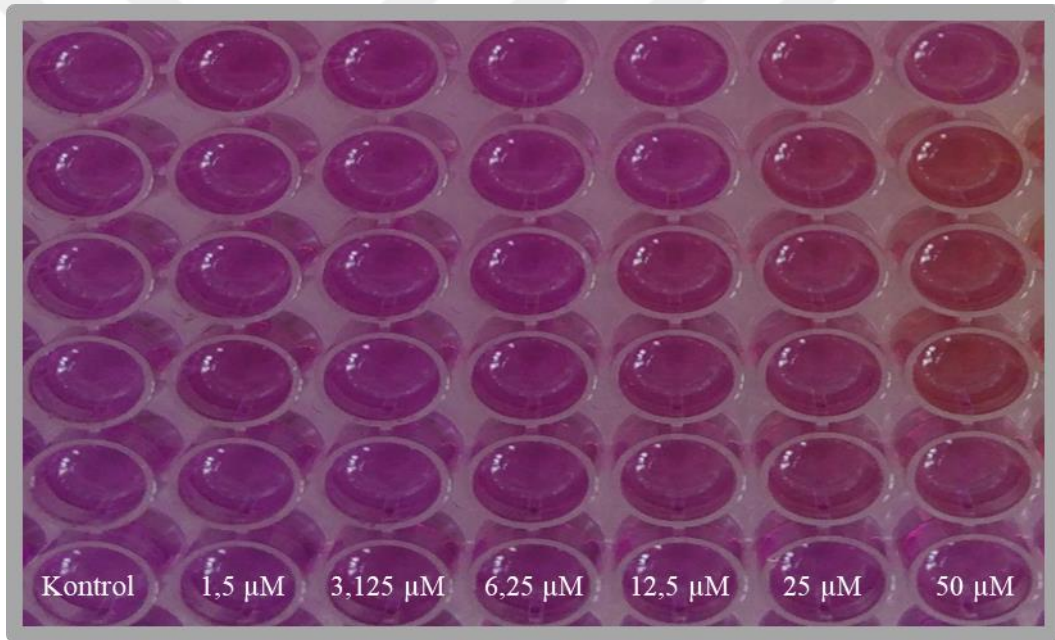
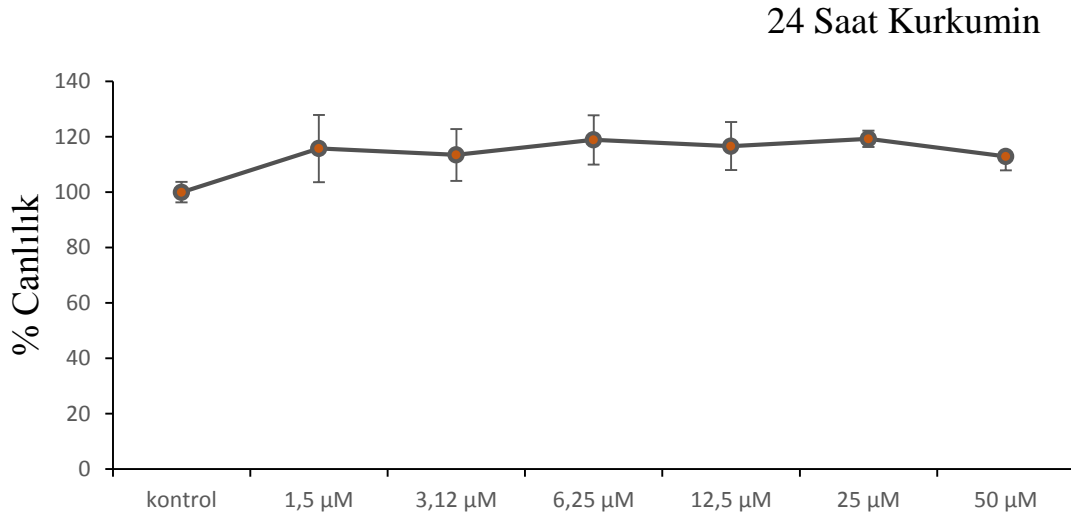
qRT-PCR çalışmalarında gruplar arasında $\Delta\Delta C_t$ metodu ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi, Tali analizinde yazılım ile elde edilen ekspresyon, canlı hücre ölü hücre ve apoptotik hücre değerleri ve moleküllerin farklı doz ve süre uygulamasına verdiği genomik ve proteomik yanıtların kontrol ve deneme gruplarında karşılaştırılması, tek yönlü ANOVA testi ile yapıldı ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ($p \leq 0.05$) ile saptandı. Çalışmada istatistiksel analizler SPSS 18 (üniversite lisanslı) programı ile yapıldı.

BULGULAR

PC-3 HÜCRE HATTINDA MOLEKÜLLERİN IC₅₀ DOZLARININ BELİRLENMESİ (MTT TESTİ)

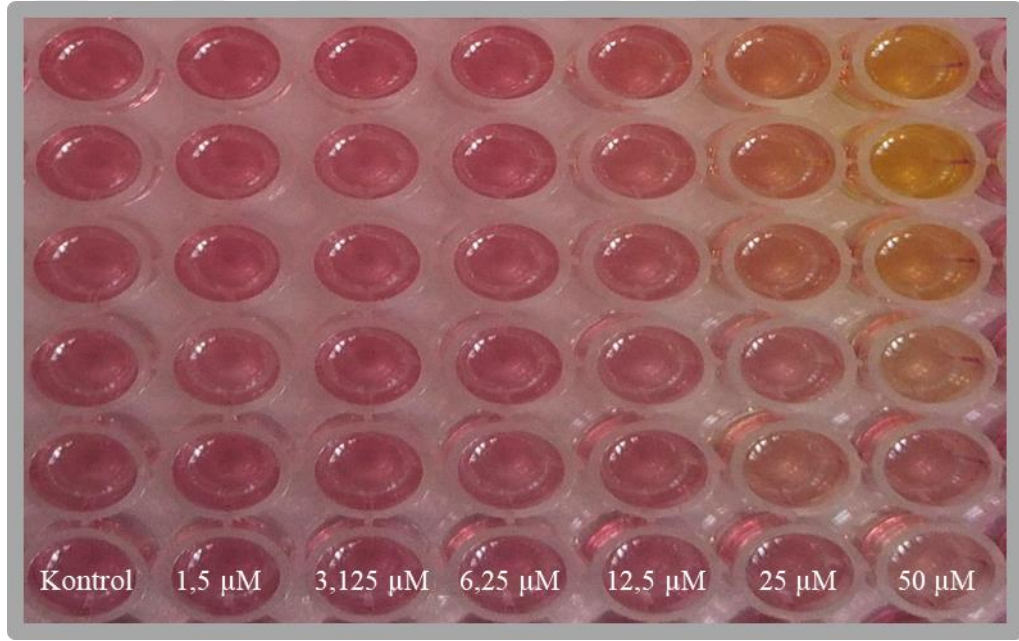
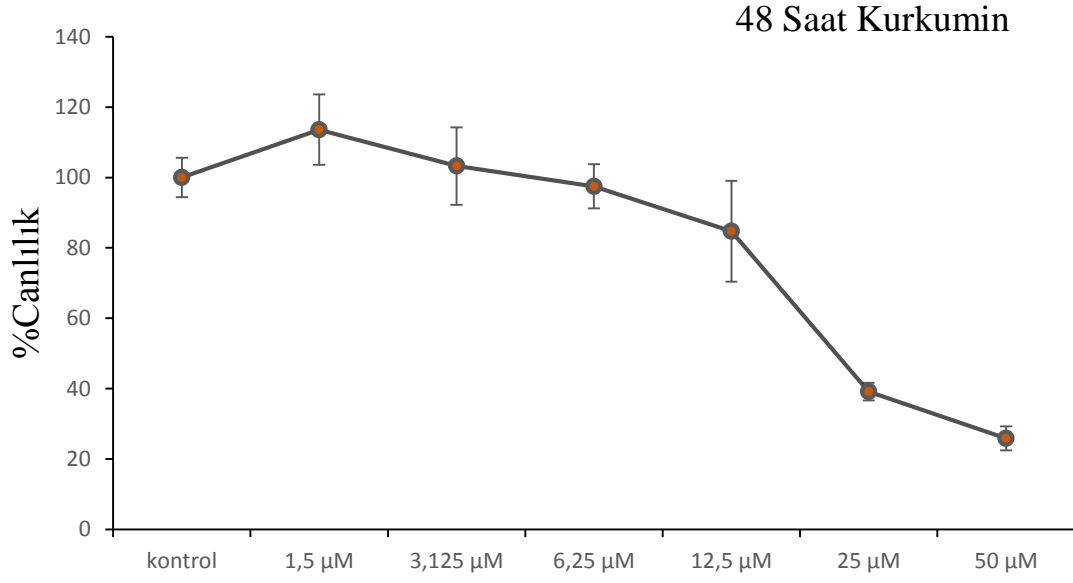
Kurkumin

PC3 hücre hattında 1,5-50 µM doz aralıklarında değişen 6 farklı konsantrasyon uygulanan Kurkumin, 24 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede artırdı ($F_{24 \text{ Saat}} = 4,144$; $sd=6-35$; $P=,003$). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 1,5 µM uygulama konsantrasyonunda $\%115,78 \pm 12,16$ olarak belirlenirken, 50 µM Kurkumin konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece $\%112,95 \pm 5,01$ 'i canlı kaldı (Şekil 28).



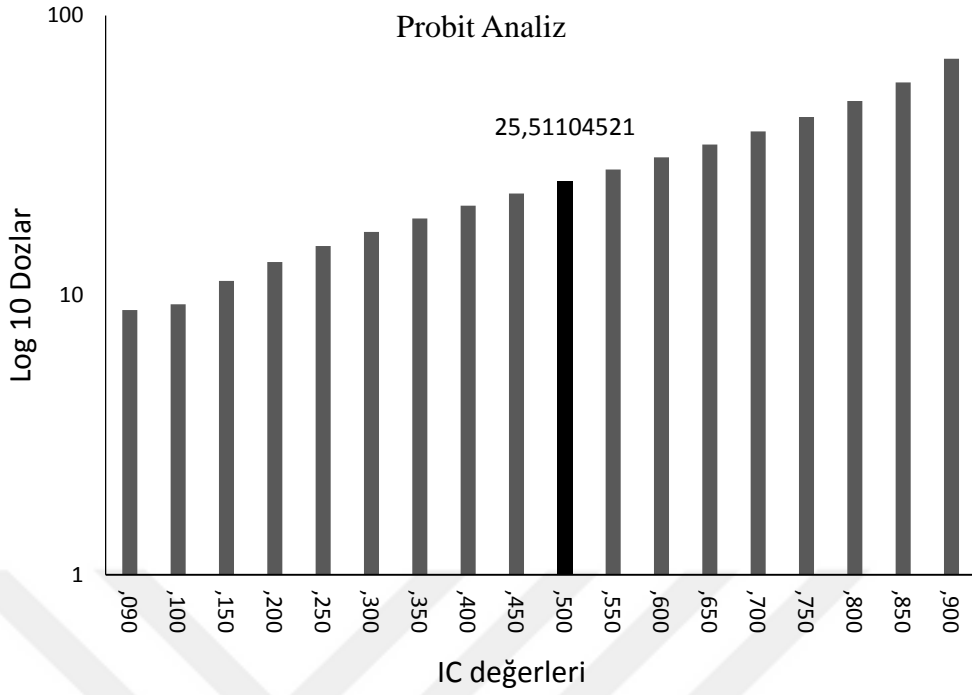
Şekil 28. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

PC3 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Kurkumin, 48 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{48 \text{ Saat}} = 95,079$; $sd=6-35$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 1,5 µM uygulama konsantrasyonunda % $113,58 \pm 9,98$ olarak belirlenirken, 50 µM Kurkumin konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece % $25,87 \pm 3,36$ 'sı canlı kaldı (Şekil 29).



Şekil 29. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

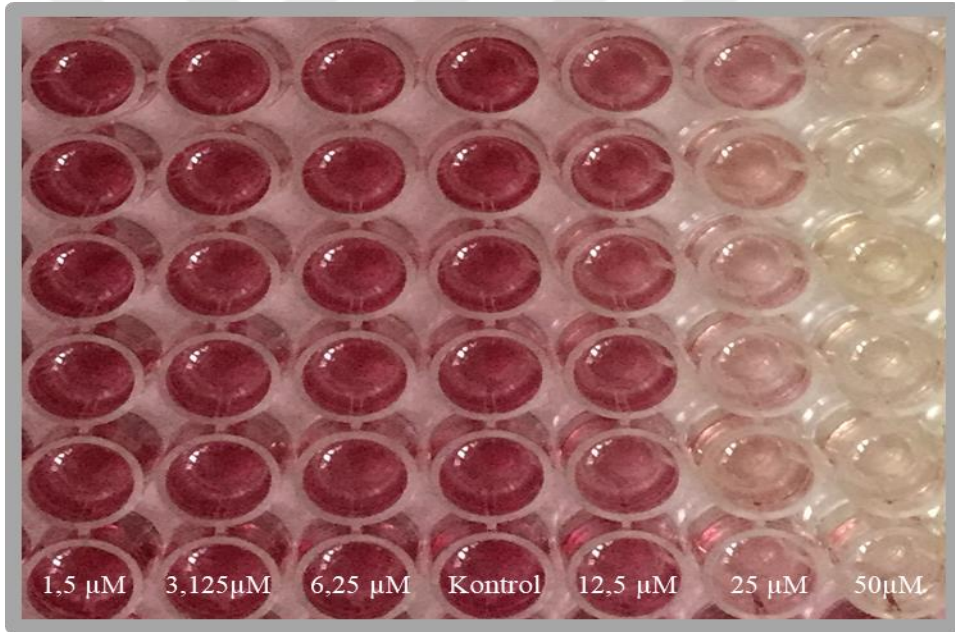
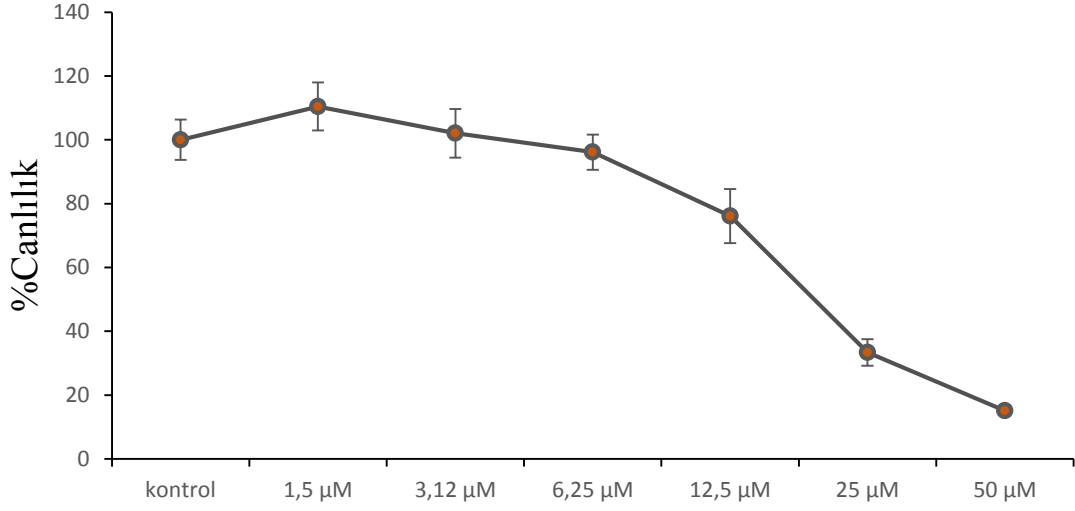
Çalışma kapsamında 48 saatlik Kurkumin uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Kurkumin'in PC3 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 48 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 25,51 µM olarak saptandı (Şekil 30).



Şekil 30. Kurkumin'in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

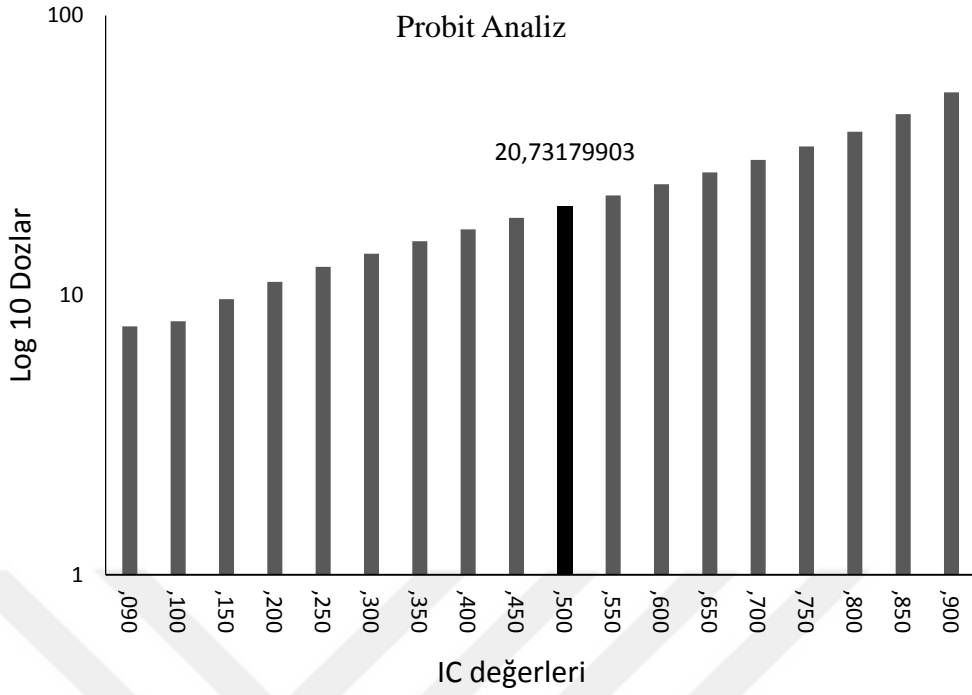
PC3 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Kurkumin, 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{72 \text{ Saat}} = 211,36$; $sd=6-35$; $p < 0,0001$). Yapılan çalışmada 72 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 1,5 μM uygulama konsantrasyonunda $\% 110,43 \pm 7,54$ olarak belirlenirken, 50 μM Kurkumin konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece $\% 15,09 \pm 1,58$ 'i canlı kaldı (Şekil 31).

72 Saat Kurkumin



Şekil 31. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

Çalışma kapsamında 72 saatlik Kurkumin uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Kurkumin'in PC3 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 72 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 20,73 µM olarak saptandı (Şekil 32).



Şekil 32. Kurkumin'in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

PC3 Prostat Kanseri Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Yapılan çalışmada Kurkumin, PC3 hücre hattına 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile uygulanmış ve her bir uygulama birbiriyle aynı olacak şekilde 1,5-50 µM aralığında 6 farklı konsantrasyonda yapılmıştır. Uygulamalarda elde edilen kontrole kıyasla belirlenen % canlılık oranları ve bu oranlar kullanılarak yapılan korelasyon analizi sonuçları Tablo 6 ve Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 6 genel olarak değerlendirildiğinde; prostat kanseri hücre hattı olan PC3'de, 48 ve 72 saatlik Kurkumin uygulaması sonrasında doza bağımlı olarak canlı hücre sayısında düşüş görüldüğü halde 24 saatlik Kurkumin uygulamasında kontrole göre artış görülmektedir.

Tablo 6. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulmasının hücre canlılığına etkisi.

KURKUMİN Doz-% Canlı Hücre Tablosu				
Doz	N	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	6	100,00±1,51 ^b	100,00±2,26 ^b	100,00±2,58 ^b
1,5 µM	6	115,78±4,96 ^a	113,58±4,07 ^a	110,43±3,08 ^a
3,12 µM	6	113,48±3,82 ^a	103,25±4,49 ^b	102,07±3,11 ^b
6,25 µM	6	118,88±3,64 ^a	97,48±2,55 ^b	96,12±2,26 ^b
12,5 µM	6	116,62±3,54 ^a	84,73±5,85 ^c	76,12±3,45 ^c
25 µM	6	119,32±1,20 ^a	39,13±1,02 ^d	33,31±1,69 ^d
50 µM	6	112,95±2,04 ^a	25,87±1,37 ^e	15,09±0,64 ^e

Yapılan çalışmada kullanılan dozlar, Kurkumin'in 50 µM'lık konsantrasyonundan başlanarak, seri sulandırım ile yarı yarıya azaltıldı ve 6 farklı konsantrasyonda uygulandı. Tablo 6 incelendiğinde, 24 saatlik uygulamada kontrole kıyasla canlı hücre sayılarında artış görüldü. 48 saatlik uygulamada ise doza bağımlı olarak canlı hücre sayısında azalma belirlendi. Ancak 72 saatlik uygulamayla kıyaslandığında doz etkinliğinde bir düşüş görüldü. Dozlar arasındaki en belirgin farkın ise 72 saatlik uygulama sonrasında olduğu belirlendi.

Doza bağımlı düşüş ile ilgili yapılan korelasyon analizinde en yüksek korelasyon -0,918 korelasyon kat sayısı değeri ile 48 saatlik uygulama da belirlenirken bunu -0,944 korelasyon kat sayısı ile 72 saatlik uygulama takip etti. 24 saatlik uygulamada ise doz-zaman ilişkisine ait anlamlı bir korelasyon bulunamadı (Tablo 7).

Sonuç olarak veriler değerlendirildiğinde, Kurkumin uygulaması prostat kanseri hücre serisi olan PC3 üzerinde doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi ise 72 saat olarak belirlendi.

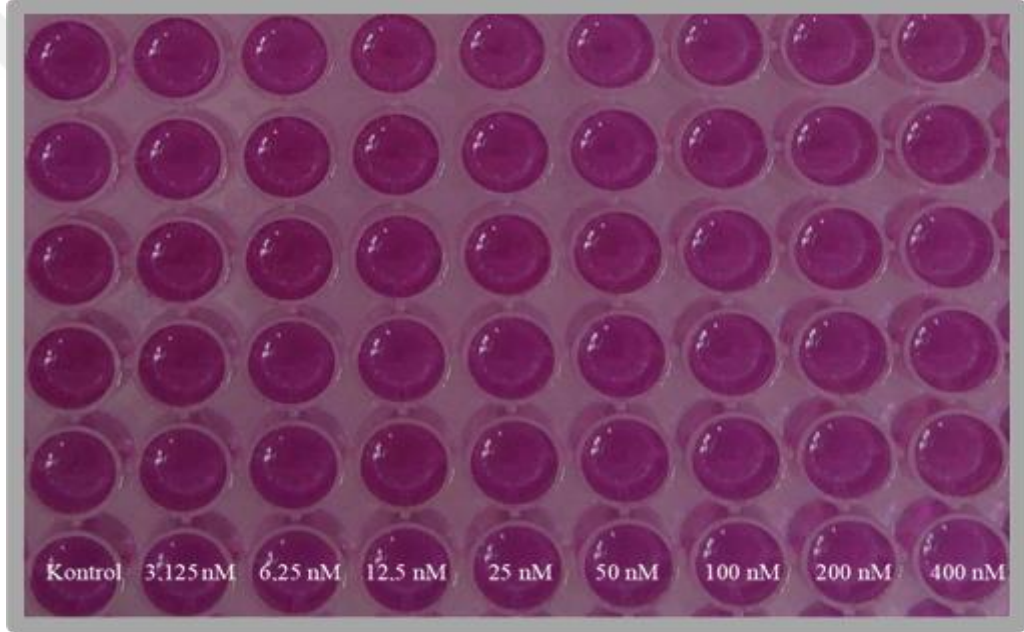
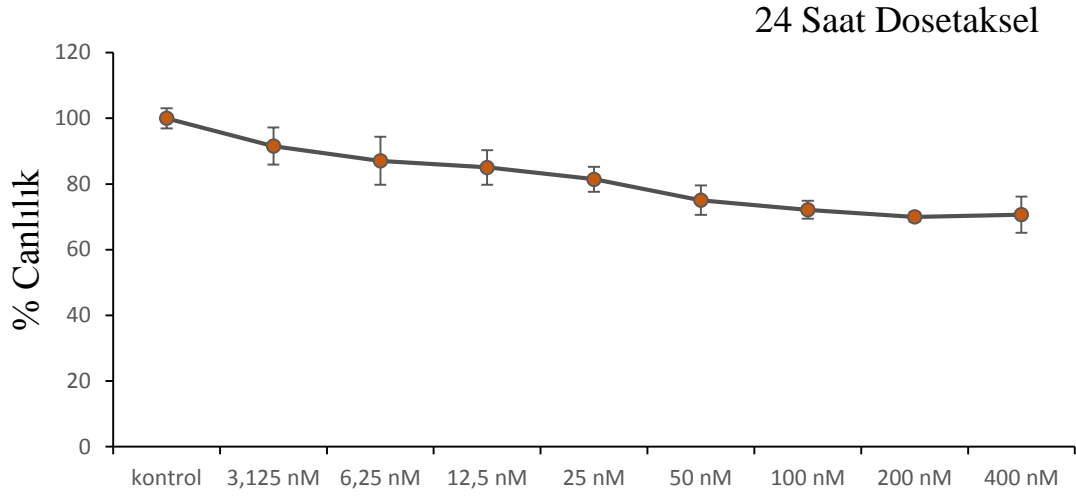
Tablo 7. Kurkumin doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.

Kurkumin Korelasyon Tablosu					
		24 Saat	48 Saat	72 Saat	Dozlar
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	-,108	-,152	,144
	Sig. (2-tailed)		,498	,335	,364
	N	42	42	42	42
48 Saat	Pearson Korelasyon	-,108	1	,979**	-,918**
	Sig. (2-tailed)	,498		,000	,000
	N	42	42	42	42
72 Saat	Pearson Korelasyon	-,152	,979**	1	-,944**
	Sig. (2-tailed)	,335	,000		,000
	N	42	42	42	42
Dozlar	Pearson Korelasyon	,144	-,918**	-,944**	1
	Sig. (2-tailed)	,364	,000	,000	
	N	42	42	42	42

**Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed)

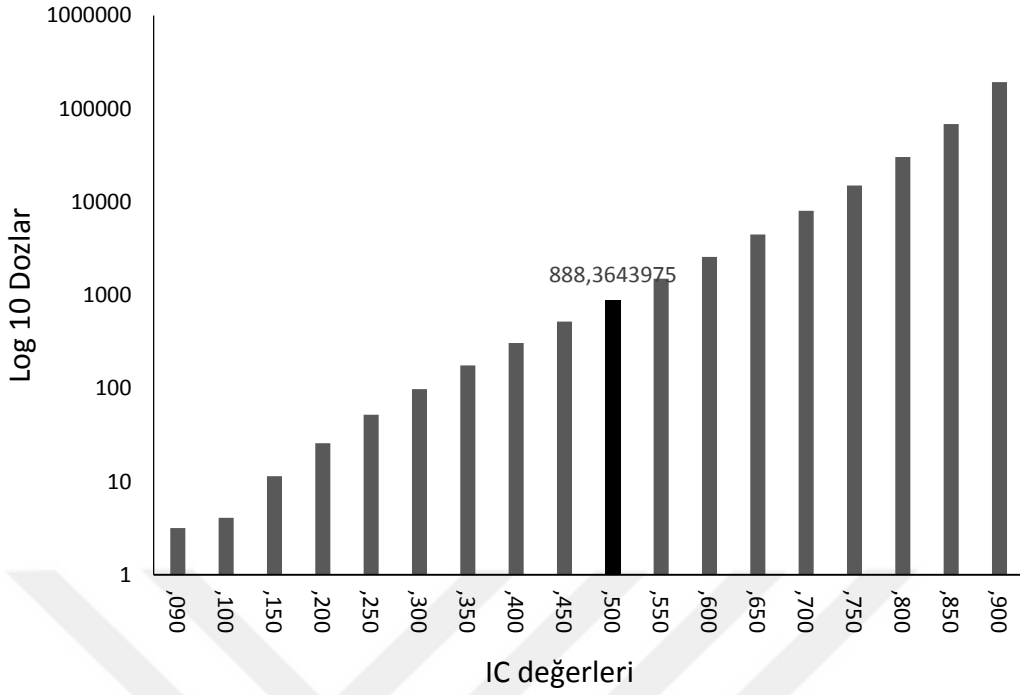
Dosetaksel

PC3 hücre hattında 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyon ile uygulanan Dosetaksel, 24 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{24\text{ Saat}} = 29,55$; $sd=8-44$; $p < 0,0001$). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 3,125 nM uygulama konsantrasyonunda % $91,54 \pm 5,69$ olarak belirlenirken, 200 nM Dosetaksel konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece % $69,97 \pm 1,41$ 'i canlı kaldı (Şekil 33).



Şekil 33. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dostaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma.

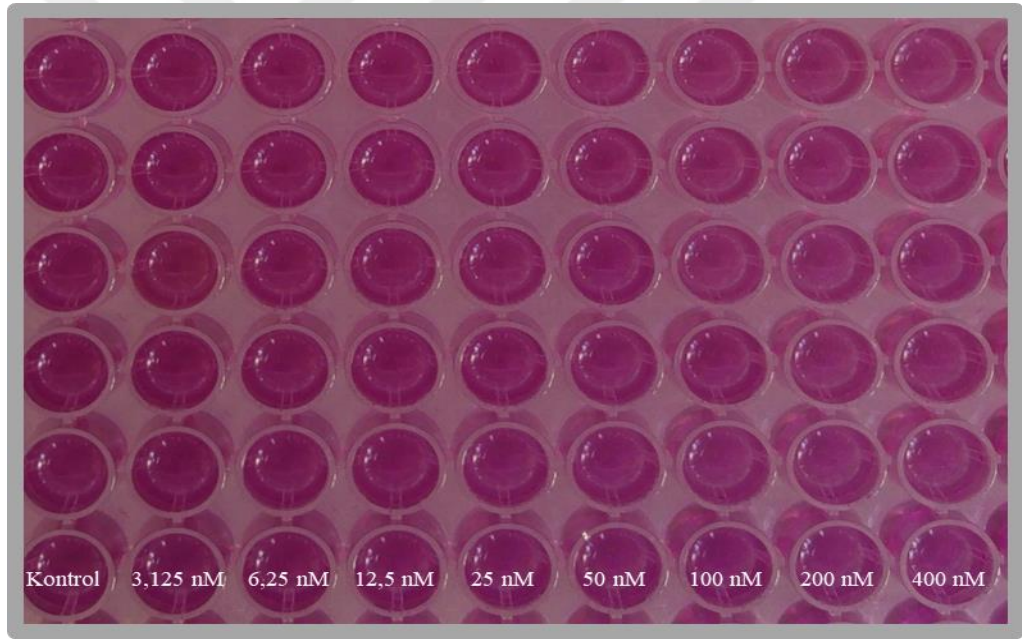
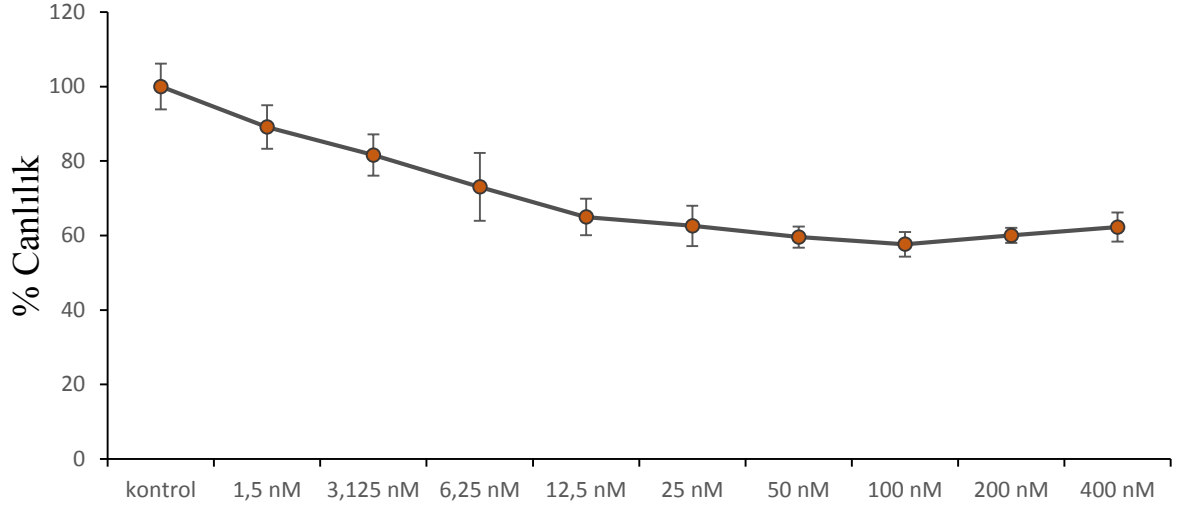
Çalışma kapsamında 24 saatlik Dostaksel uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Dostaksel'in PC3 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 888,36 nM olarak saptandı (Şekil 34).



Şekil 34. Dosectaxel'in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

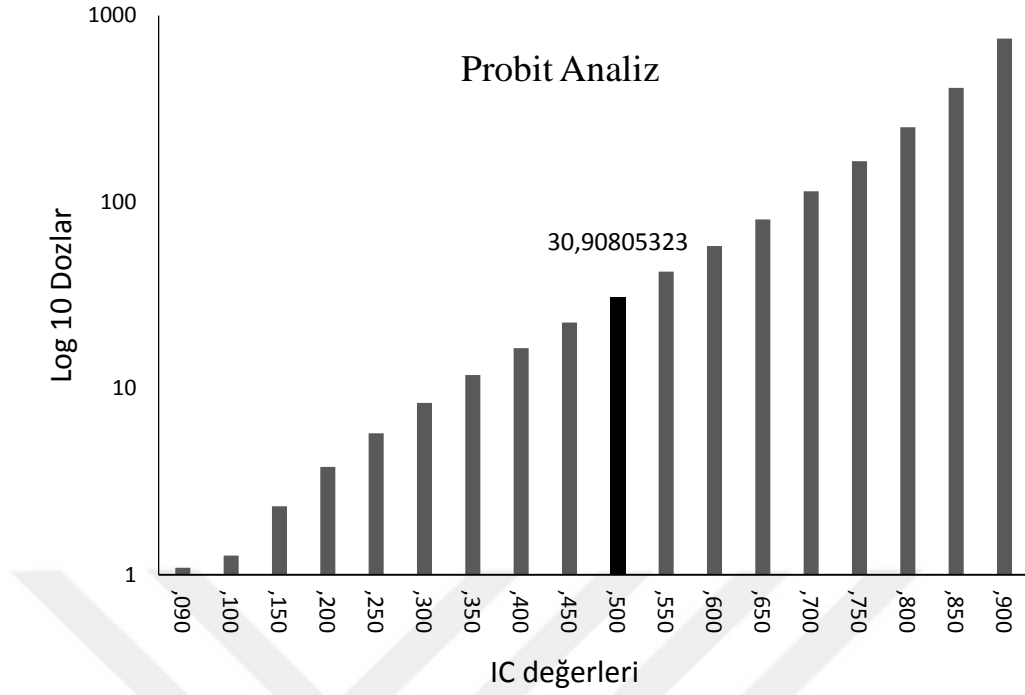
PC-3 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Dosectaxel 48 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{48 \text{ Saat}} = 42,47$; $sd=8-45$; $p < 0,0001$). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 1,5 nM uygulama konsantrasyonunda $89,13 \pm 5,86$ olarak belirlenirken, 100 nM Dosectaxel konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece $57,64 \pm 3,31$ 'i canlı kaldı (Şekil 35).

48 Saat Doksetsel



Şekil 35. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Doksetsel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma.

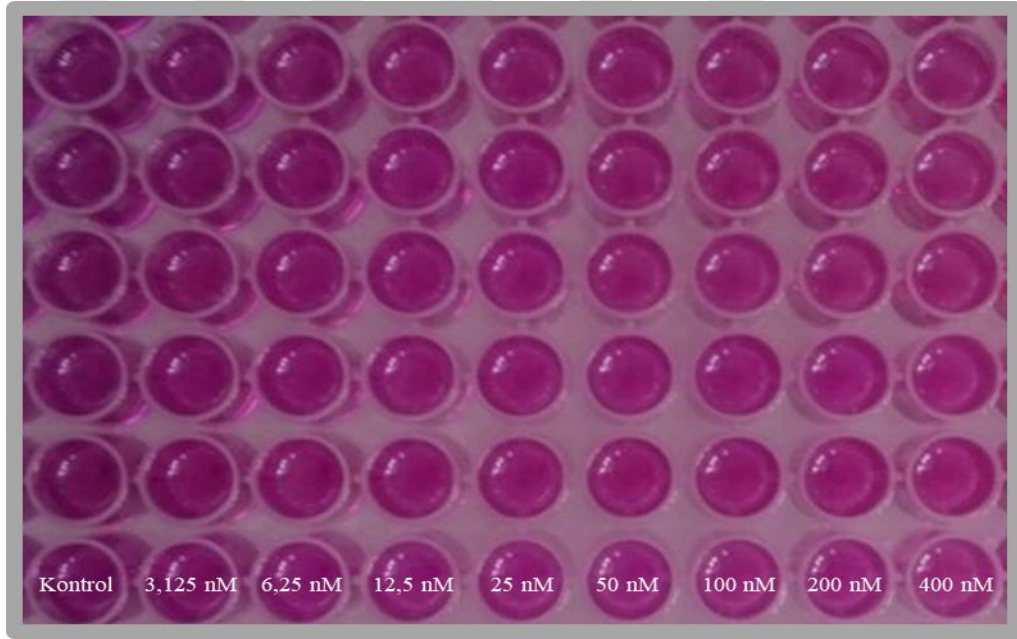
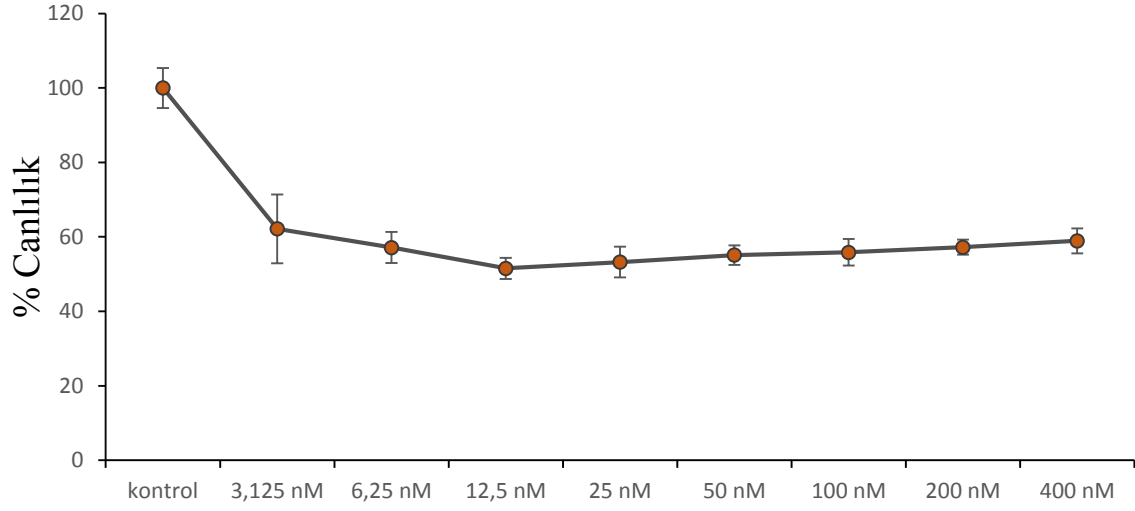
Çalışma kapsamında 48 saatlik Doksetsel uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Doksetsel'in PC3 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 48 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 30,90 nM olarak saptandı (Şekil 36).



Şekil 36. Dosetaksel'in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

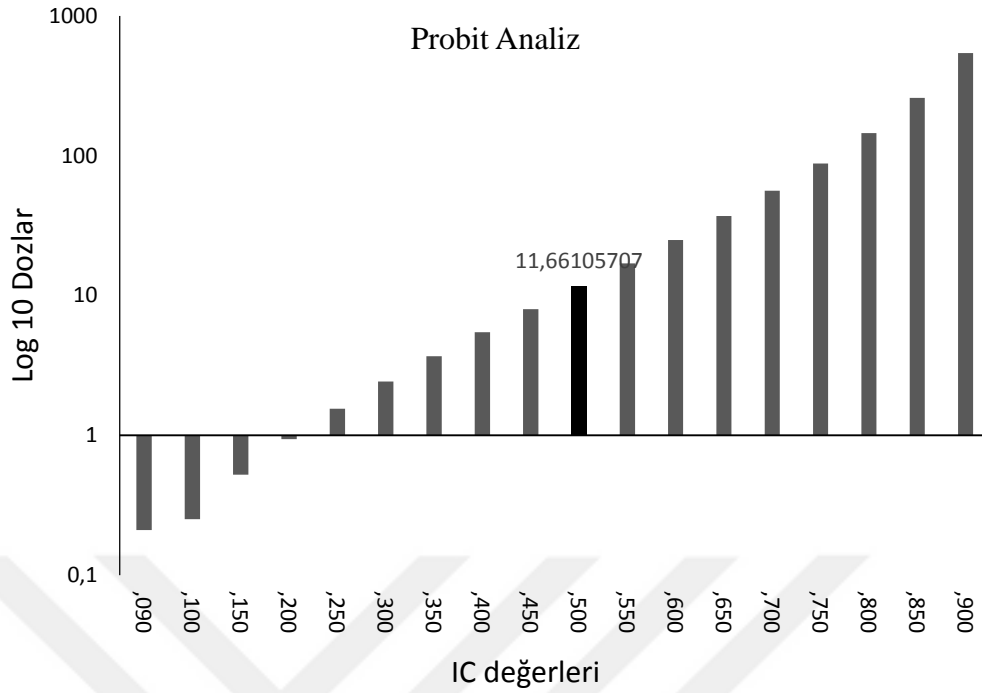
PC3 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Dosetaksel 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{72 \text{ Saat}} = 62,15$; $sd = 8-45$; $p < 0,0001$). Yapılan çalışmada 72 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 3,125 nM uygulama konsantrasyonunda % $62,17 \pm 9,24$ olarak belirlenirken, 12,5 nM Dosetaksel konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece % $51,53 \pm 2,81$ 'i canlı kaldı (Şekil 37).

72 Saat Doseksel



Şekil 37. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Doseksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma.

Çalışma kapsamında 72 saatlik Doseksel uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Doseksel'in PC3 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 72 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 11,66 nM olarak saptandı (Şekil 38).



Şekil 38. Dosetaksel'in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

PC-3 Prostat Kanseri Hücre Hattında Dosetaksel Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Yapılan çalışmada Dosetaksel, PC3 hücre hattına 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile uygulanmış ve her bir uygulama birbiriyle aynı olacak şekilde 3,125-400 nM aralığında 8 farklı konsantrasyonda yapılmıştır. Uygulamalarda elde edilen kontrole kıyasla belirlenen % canlılık oranları ve bu oranlar kullanılarak yapılan korelasyon analizi sonuçları Tablo 8 ve Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 8 genel olarak değerlendirildiğinde, prostat kanseri hücre hattı olan PC3'de 24, 48 ve 72 saatlik Dosetaksel uygulaması sonrasında doza bağımlı olarak bir düşüş görülmektedir. Doz-zaman ilişkisine bağlı olarak hücre ölümü en fazla 72 saatlik Dosetaksel uygulamasında belirlendi. 24 ve 48 saatlik uygulamalarda canlı hücre sayısında doza bağımlı olarak bir azalma görülse de 72 saatlik uygulamayla kıyaslandığında düşük bulundu.

Tablo 8. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM aralıklarında Doseksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

DOSEKSEL Doz-% Canlı Hücre Tablosu				
Doz	N	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	6	100,00±1,25 ^a	100,00±2,50 ^a	100,00±2,19 ^a
3,125 nM	6	91,54±2,32 ^b	81,62±2,27 ^b	62,17±3,77 ^b
6,25 nM	6	87,06±2,99 ^{bc}	73,05±3,72 ^c	57,14±1,69 ^{bcd}
12,5 nM	6	85,06±2,14 ^c	64,98±2,01 ^d	51,53±1,14 ^d
25 nM	6	81,41±1,54 ^c	62,61±2,21 ^{de}	53,23±1,69 ^{cd}
50 nM	6	75,06±1,84 ^d	59,61±1,15 ^{de}	55,10±1,07 ^{cd}
100 nM	6	72,12±1,11 ^d	57,64±1,35 ^e	55,85±1,45 ^{cd}
200 nM	6	69,97±0,57 ^d	60,01±0,82 ^{de}	57,24±0,83 ^{bcd}
400 nM	6	70,65±2,25 ^d	62,26±1,59 ^{de}	58,94±1,37 ^{bc}

Yapılan çalışmada dozlar, Doseksel'in 400 nM konsantrasyonundan başlanarak, seri sulandırım ile yarı yarıya azaltıldı ve 8 farklı konsantrasyonda uygulandı. Tablo 8 incelendiğinde, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda canlı hücre sayılarında bir düşüş görüldüğü halde doz etkinliğinin, 72 saatlik uygulamaya göre daha az olduğu belirlendi.

Doza bağımlı düşüş ile ilgili yapılan korelasyon analizinde en yüksek korelasyon -0,638 korelasyon kat sayısı değeri ile 24 saatlik uygulamada belirlenirken, bunu -0,401 korelasyon kat sayısı değeri ile 48 saatlik uygulama takip etti. Ancak 72 saatlik Doseksel uygulamasında doz-zaman ilişkisine ait anlamlı bir korelasyon bulunamadı.

Sonuç olarak veriler değerlendirildiğinde, Doseksel uygulaması PC3 hücre hattı üzerinde doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi ise 72 saat olarak belirlendi.

Tablo 9. Dosetaksel doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu

		Dosetaksel Korelasyon Tablosu			
		24 Saat	48 Saat	72 Saat	Dozlar
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	,771**	,567**	-,638**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000
	N	54	54	54	54
48 Saat	Pearson Korelasyon	,771**	1	,824**	-,401**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,003
	N	54	54	54	54
72 Saat	Pearson Korelasyon	,567**	,824**	1	-,176
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,204
	N	54	54	54	54
Dozlar	Pearson Korelasyon	-,638**	-,401**	-,176	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,003	,204	
	N	54	54	54	54

** Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

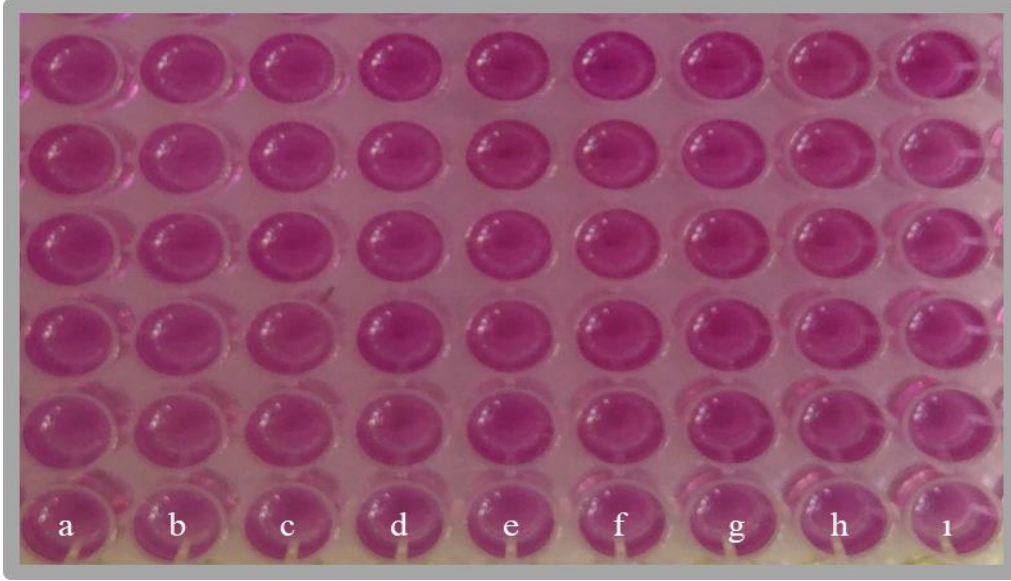
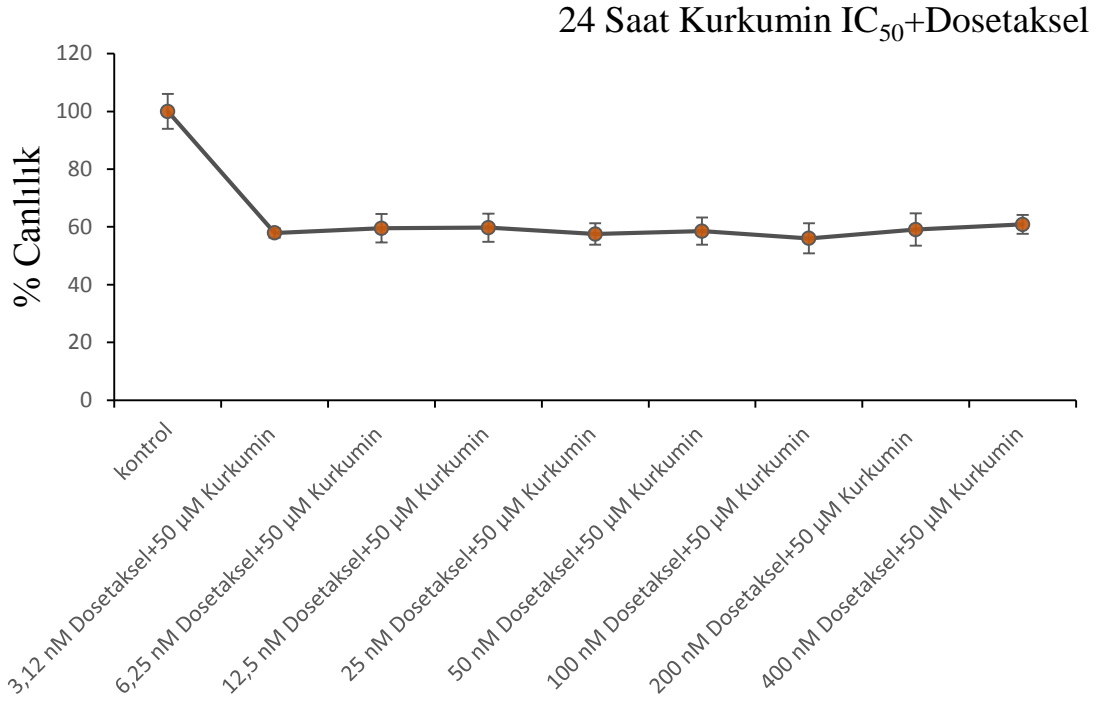
Kurkumin ve Dosetaksel'in Birlikte Uygulanması

Daha önceki çalışmalarda IC₅₀ değeri belirlenen Kurkumin, Dosetaksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozuyla kombinlenerek PC3 prostat kanseri hücre hattına uygulandı. Yapılan denemede 96 kuyucuklu plakalara 160 µl hücre ekimi yapıldı. Hücre ekimi yapılan plakalar, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında invert mikroskopta hücrelerin tabana tutunup tutunmadığı ve homojen bir yayılım gösterip göstermediği kontrol edildi. Dosetaksel'in 3,125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozu, 8 kuyucuğa 6 tekrür edecek şekilde 96 kuyucuklu plakaya 20µl uygulandı. Daha sonra Dosetaksel uygulaması yapılan her kuyucuğun üzerine 50µM'lık Kurkumin'den 20µl uygulandı. Uygulama yapılan plakalar 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde kültüre alındı. PC3 hücre hattında Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte hücre canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi için plakalar 24, 48 ve 72 saat süresince inkübasyona bırakıldı.

PC3 hücre hattında, 50 µM Kurkumin ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozu birlikte uygulandı. 24 saat sonunda hücre canlılığı istatistik olarak anlamlı bulundu ($F_{24\text{ Saat}} = 53,83$; $sd=8-45$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı, 400 nM Dosetaksel ve 50

μM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda % $60,87 \pm 3,26$ olarak belirlenirken, 100 nM Doksetaksel ve 50 μM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda, ortamdaki hücrelerin sadece % $56,01 \pm 5,22$ 'si canlı kaldı (Şekil 39).

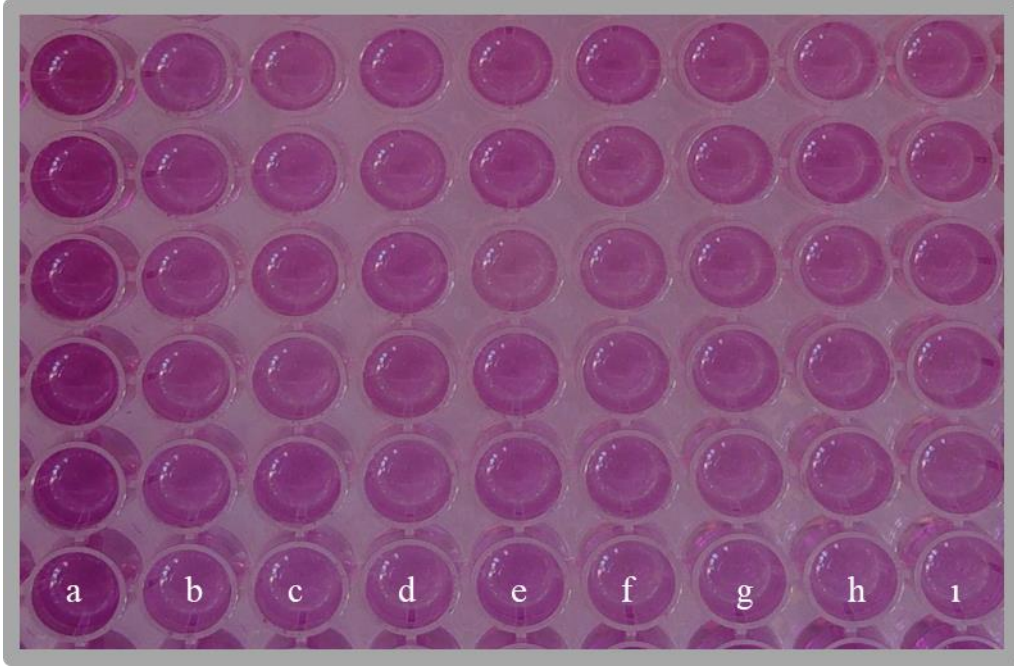
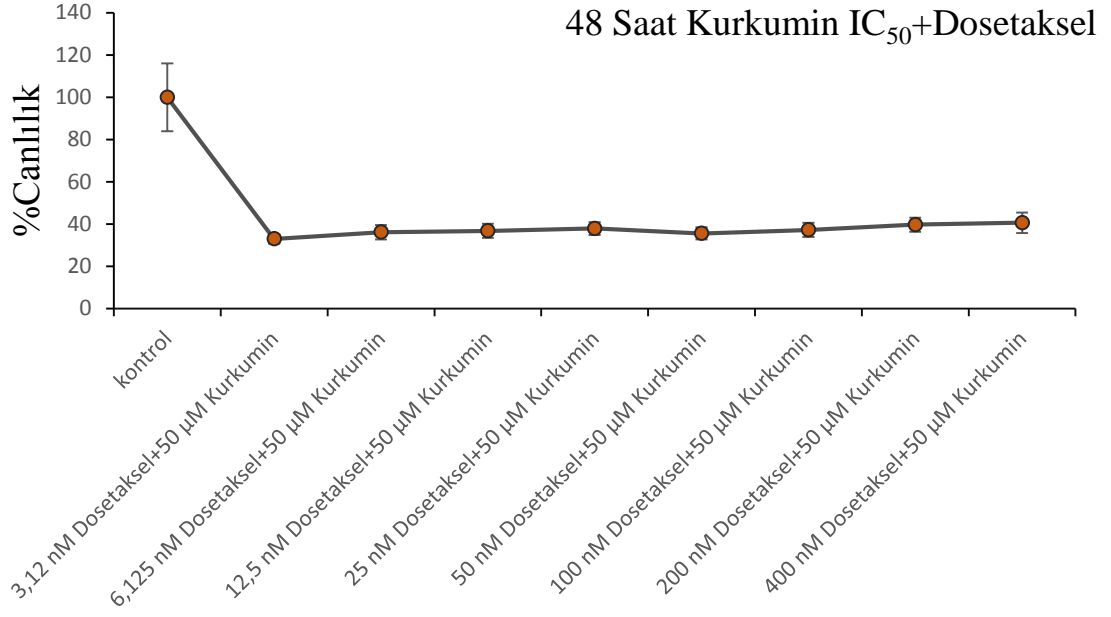




Şekil 39. a. Kontrol b. 400 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin c. 200 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin d. 100 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin e. 50 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin f. 25 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin g. 12,5 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin h. 6,25 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin i. 3,125 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile Doksetsel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

PC3 hücre hattında, 50 µM Kurkumin ile Doseksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozu birlikte uygulandı. 48 saat sonunda hücre canlılığı istatistik olarak anlamlı bulundu ($F_{48 \text{ saat}} = 68,73$; $sd=8-45$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı, 400 nM Doseksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda % $40,61 \pm 4,88$ olarak belirlenirken, 3,12 nM Doseksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda, ortamdaki hücrelerin sadece % $32,97 \pm 2,19$ 'u canlı kaldı (Şekil 40).

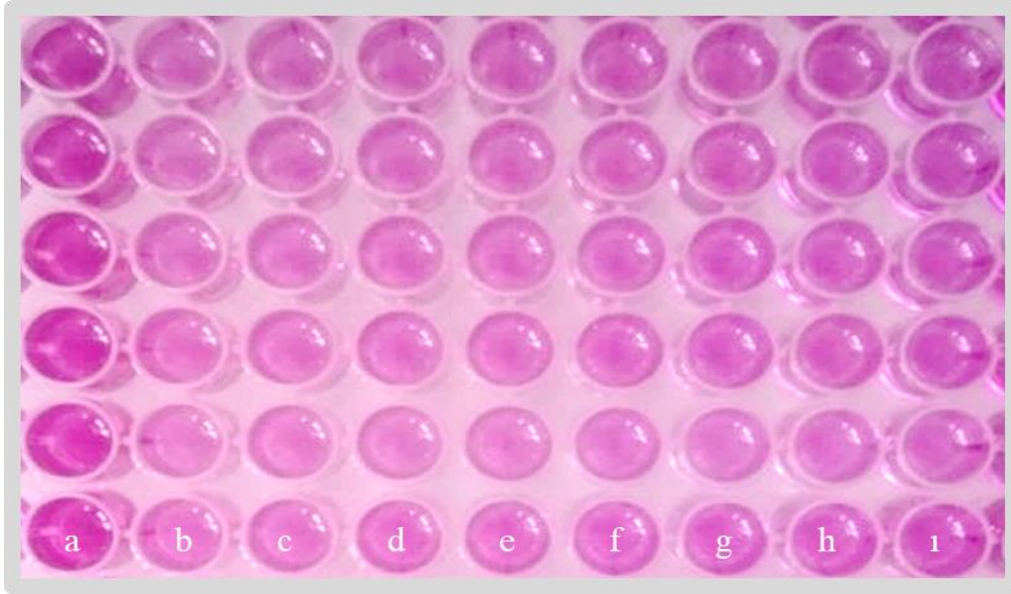
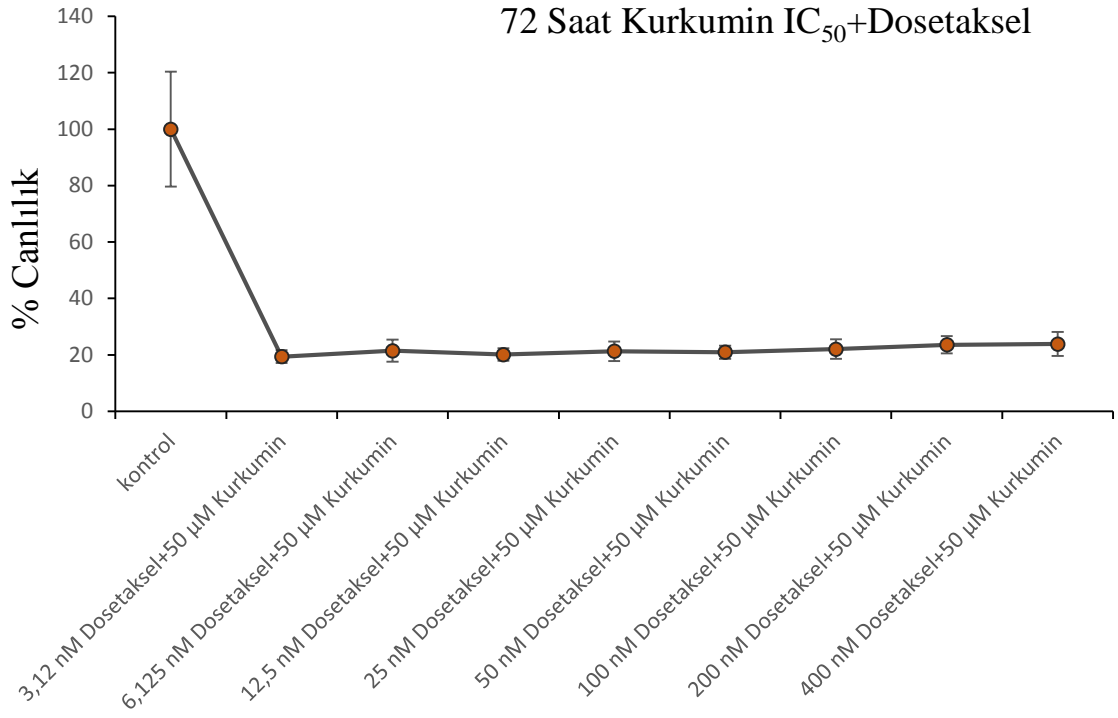




Şekil 40. a. Kontrol b. 400 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin c. 200 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin d. 100 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin e. 50 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin f. 25 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin g. 12,5 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin h. 6,25 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin i. 3,125 nM Doksetsel + 50 μM Kurkumin. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile Doksetsel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

PC3 hücre hattında, 50 µM Kurkumin ile Doseksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozu birlikte uygulandı. 72 saat sonunda hücre canlılığı istatistik olarak anlamlı bulundu ($F_{24 \text{ Saat}} = 74,33$; $sd=8-45$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 72 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı, 400 nM Doseksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda % $23,87 \pm 4,21$ olarak belirlenirken, 3,12 nM Doseksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda, ortamdaki hücrelerin sadece % $19,35 \pm 2,25$ 'i canlı kaldı (Şekil 41).





Şekil 41. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin i. 3,125 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

PC3 Prostat Kanseri Hücre Hattında Kurkumin ve Doseksel'in Birlikte Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Yapılan çalışmada, PC3 hücre hattına 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile Doseksel'in 3,125-400 nM aralığında 8 farklı konsantrasyonunun her biri, 50 µM Kurkumin ile birlikte uygulanmıştır. Uygulamalarda elde edilen kontrole kıyasla belirlenen % canlılık oranları ve bu oranlar kullanılarak yapılan korelasyon analizi sonuçları

Tablo 10 ve Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 10 genel olarak değerlendirildiğinde, prostat kanseri hücre serisi olan PC3'de Doseksel dozlarının Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile kombinasyonunda 24, 48 ve 72 saat sonrasında doza bağlı olmadığı halde zamana bağlı düşüş görülmüştür.

Tablo 10. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Doseksel konsantrasyonlarının 50 µM Kurkumin ile birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi.

DOSEKSEL+KURKUMİN Doz-% Canlı Hücre Tablosu				
Doz	N	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	6	100,00±2,48 ^a	100,00±6,55 ^a	100,00±8,32 ^a
3,12 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	57,89±0,65 ^b	32,97±0,89 ^b	19,35±0,92 ^b
6,125 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	59,53±2,01 ^b	36,12±1,41 ^b	21,48±1,59 ^b
12,5 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	59,71±1,97 ^b	36,79±1,36 ^b	20,09±0,89 ^b
25 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	57,55±1,49 ^b	37,87±1,23 ^b	21,29±1,41 ^b
50 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	58,52±1,92 ^b	35,54±1,16 ^b	20,94±0,95 ^b
100 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	56,01±2,13 ^b	37,20±1,35 ^b	22,03±1,41 ^b
200 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	59,08±2,28 ^b	39,70±1,35 ^b	23,57±1,25 ^b
400 nM Doseksel+50 µM Kurkumin	6	60,87±1,34 ^b	40,61±1,99 ^b	23,87±1,72 ^b

Yapılan çalışmada Doseksel dozları, 400 nM konsantrasyondan başlanarak, seri sulandırım ile yarı yarıya azaltılmıştır. 50 µM Kurkumin dozu ise, sulandırılan her Doseksel dozuyla beraber uygulanmıştır. Zamana bağlı olarak 72 saatlik uygulamada canlı hücre sayısında azalma görülmüştür.

Doz-zaman ilişkisine göre yapılan korelasyon analizinde 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaların dozlarla arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

Sonuç olarak veriler değerlendirildiğinde, Doseksel dozlarının 50 µM Kurkumin dozuyla birlikte uygulanması PC3 hücre hattı üzerinde zamana bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi 72 saat olarak belirlendi

Tablo 11. Doseksel+Kurkumin'in doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.

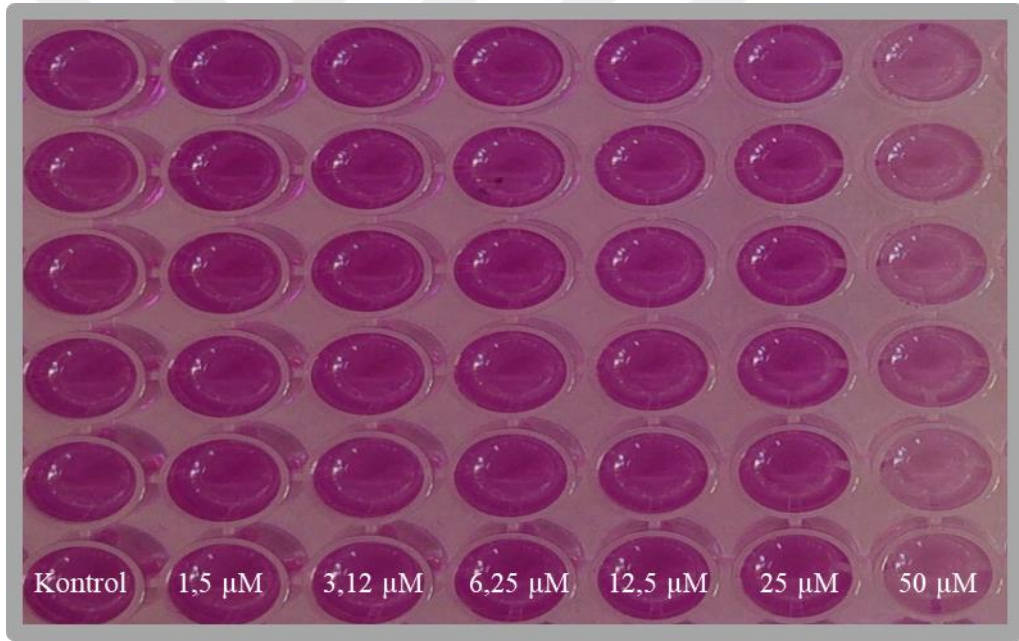
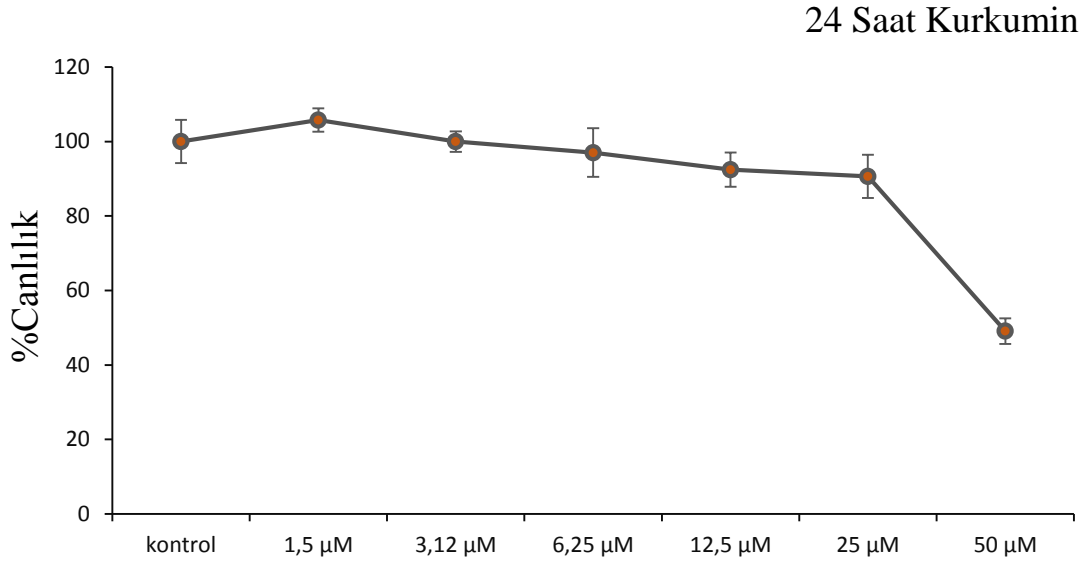
Doseksel+Kurkumin Korelasyon Tablosu					
		24 Saat	48 Saat	72 Saat	Dozlar
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	,897**	,910**	-,190
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,168
	N	54	54	54	54
48 Saat	Pearson Korelasyon	,897**	1	,981**	-,159
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,252
	N	54	54	54	54
72 Saat	Pearson Korelasyon	,910**	,981**	1	-,195
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,158
	N	54	54	54	54
Dozlar	Pearson Korelasyon	-,190	-,159	-,195	1
	Sig. (2-tailed)	,168	,252	,158	
	N	54	54	54	54

** Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed).

DU-145 HÜCRE HATTINDA MOLEKÜLLERİN IC₅₀ DOZLARININ BELİRLENMESİ (MTT TESTİ)

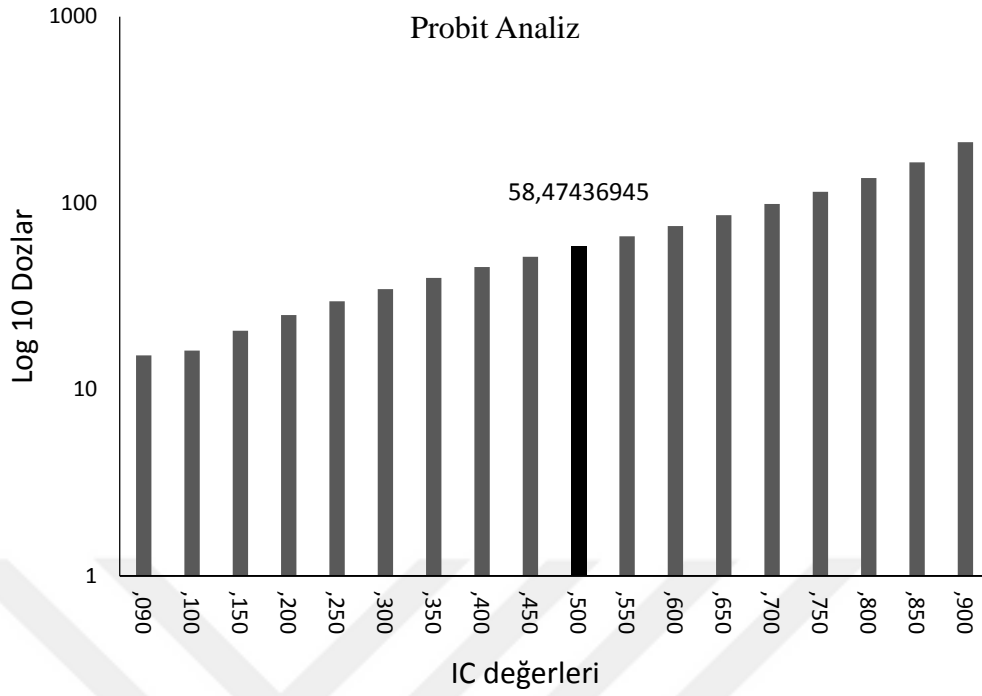
Kurkumin

DU 145 hücre hattında 1,5-50 µM doz aralıklarında değişen 6 farklı konsantrasyon ile uygulanan Kurkumin, 24 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü (F_{24 Saat} = 95,211; sd=6-35; p<0,0001). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 1,5 µM uygulama konsantrasyonunda % 105,79±3,11 olarak belirlenirken, 50 µM Kurkumin konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece % 49,10±3,45'i canlı kaldı (Şekil 42).



Şekil 42. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

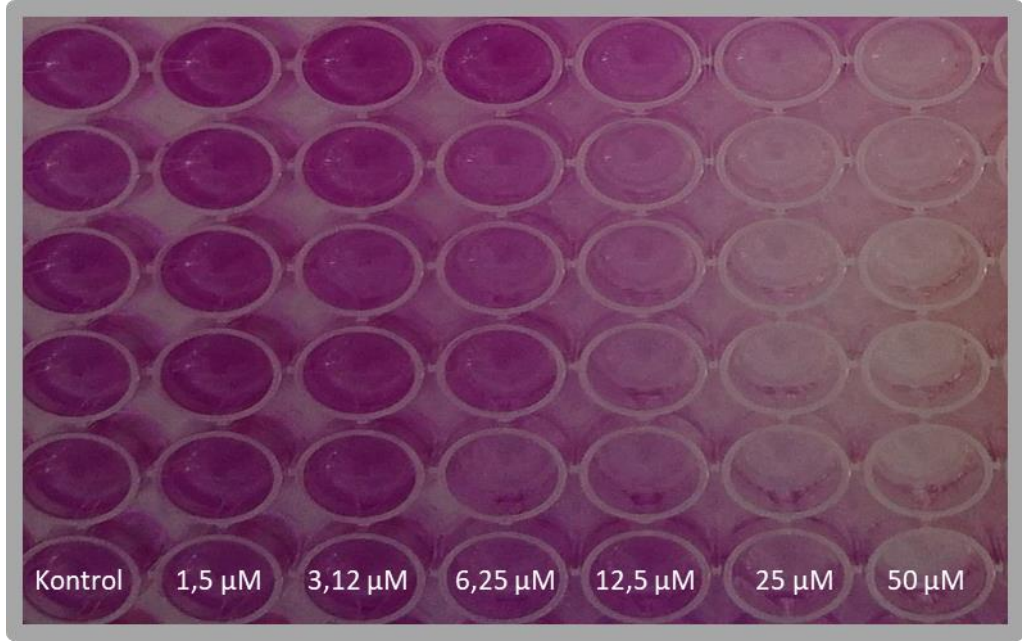
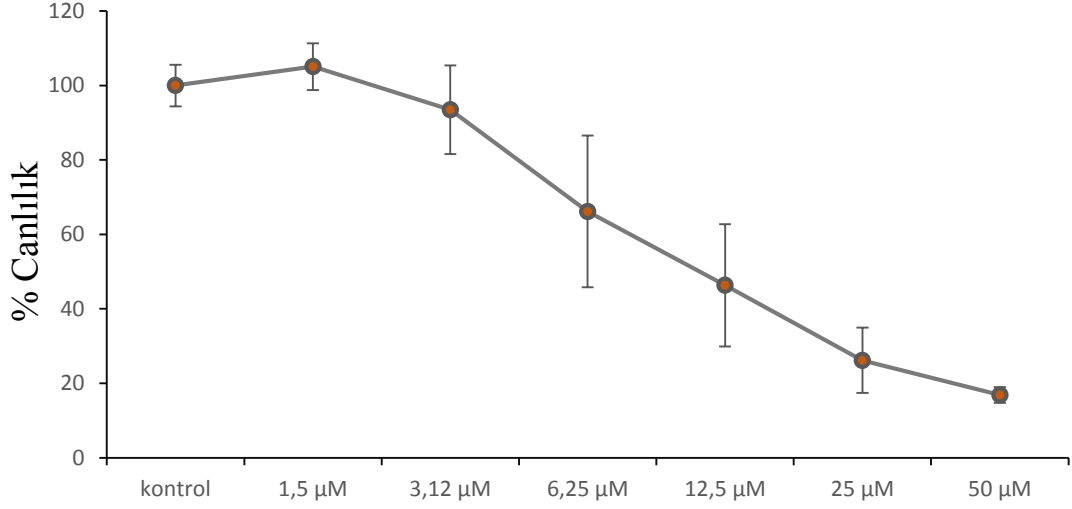
Çalışma kapsamında 24 saatlik Kurkumin uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 58,47 µM olarak saptandı (Şekil 43).



Şekil 43. Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

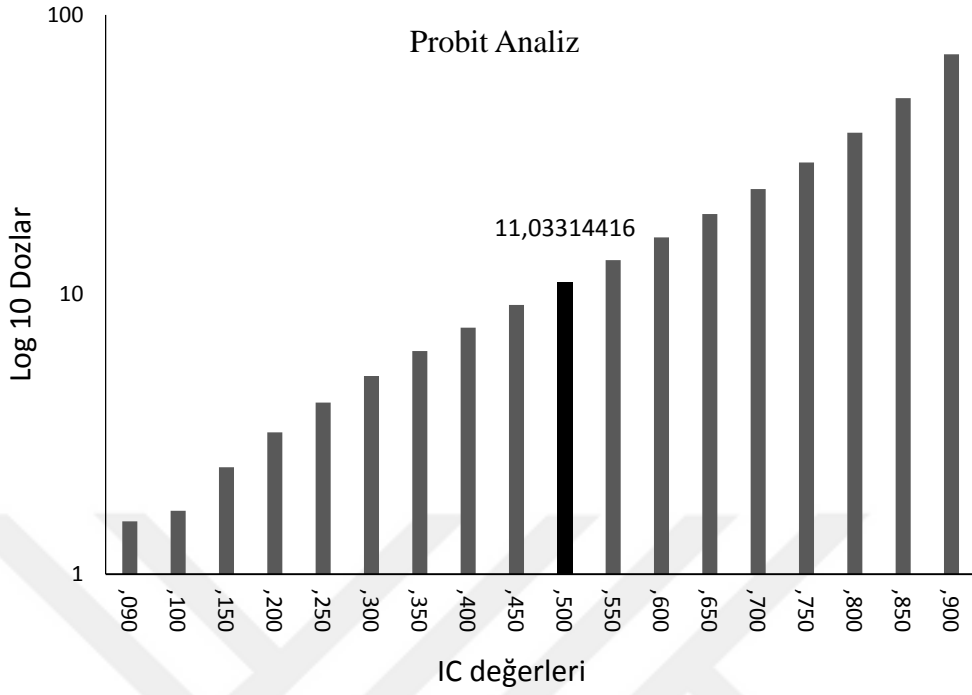
DU 145 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Kurkumin, 48 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{48 \text{ Saat}} = 55,80$; $sd=6-35$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı $1,5 \mu\text{M}$ uygulama konsantrasyonunda $\% 105,07 \pm 6,28$ olarak belirlenirken, $50 \mu\text{M}$ Kurkumin konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece $\% 16,84 \pm 2,13$ 'ü canlı kaldı (Şekil 44).

48 Saat Kurkumin



Şekil 44. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

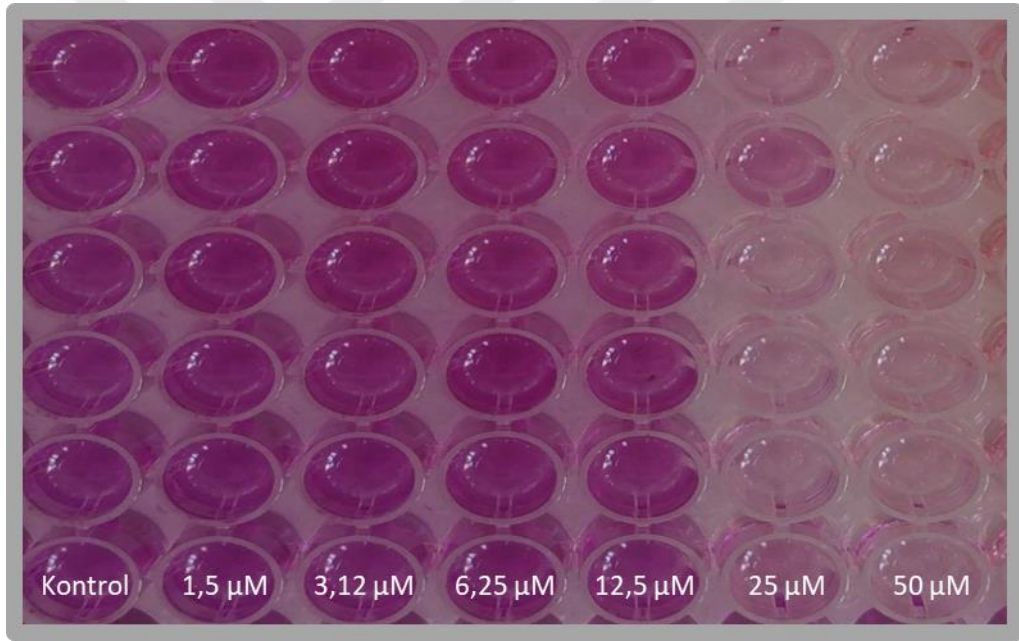
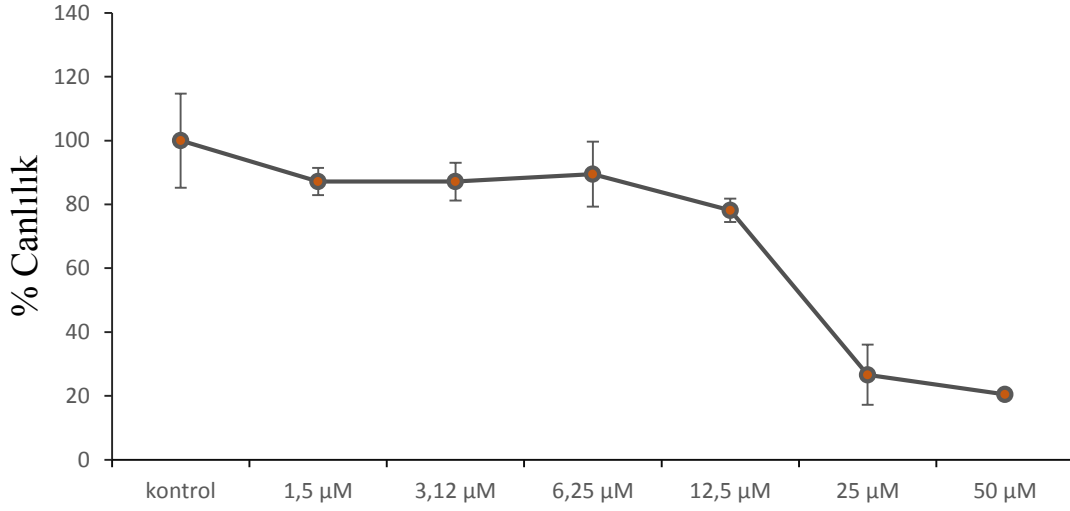
Çalışma kapsamında 48 saatlik Kurkumin uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 48 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 11,03 µM olarak saptandı (Şekil 45).



Şekil 45. Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

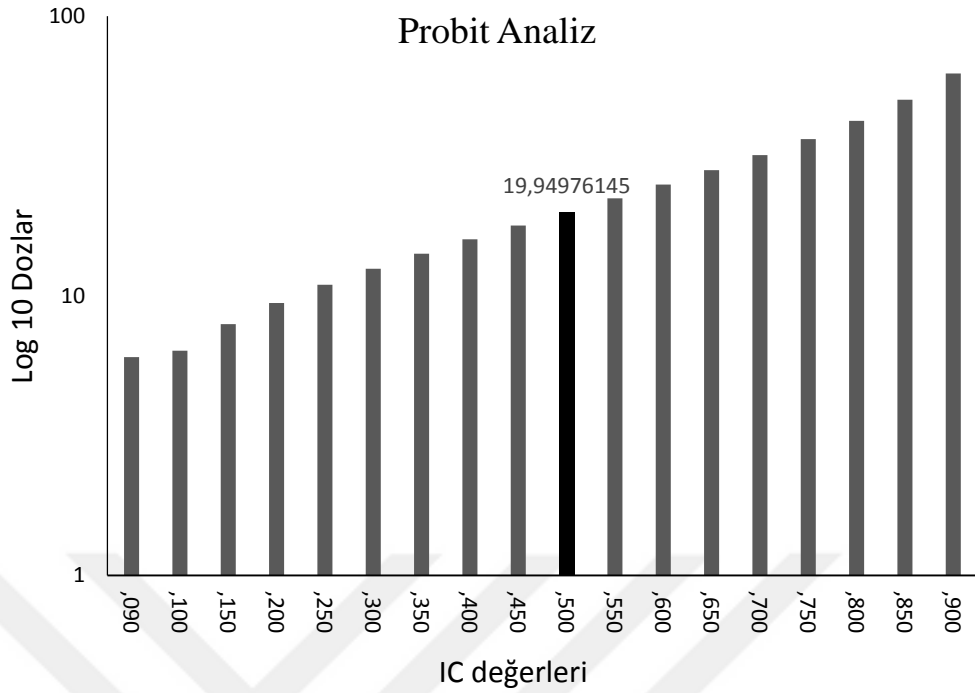
DU 145 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Kurkumin, 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{72 \text{ Saat}} = 91,62$; $sd=6-35$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 72 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı $6,25 \mu\text{M}$ uygulama konsantrasyonunda $\% 89,44 \pm 10,18$ olarak belirlenirken, $50 \mu\text{M}$ Kurkumin konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece $\% 20,51 \pm 1,31$ 'i canlı kaldı (Şekil 46).

72 Saat Kurkumin



Şekil 46. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

Çalışma kapsamında 72 saatlik Kurkumin uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 72 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 19,94 µM olarak saptandı (Şekil 47).



Şekil 47. Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

DU-145 Prostat Kanseri Hücre Hattında Kurkumin Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Yapılan çalışmada Kurkumin, DU 145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile uygulanmış ve her bir uygulama birbiriyle aynı olacak şekilde 1,5-50 µM aralığında 6 farklı konsantrasyonda yapılmıştır. Uygulamalarda elde edilen kontrole kıyasla belirlenen % canlılık oranları ve bu oranlar kullanılarak yapılan korelasyon analizi sonuçları Tablo 12 ve Tablo 13 'de verilmiştir.

Tablo 12 genel olarak değerlendirildiğinde; Kurkumin, DU 145 prostat kanseri hücre hattına 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulandı ve doza bağımlı olarak düşüşler görüldü. Doz zaman ilişkisine bağılı olarak en yüksek hücre ölümü 48 saatlik uygulamada gerçekleşti ve bunu 72 saatlik uygulama takip etti. DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde en az etkiyi diğer uygulama süreleriyle karşılaştırıldığında 24 saatlik Kurkumin uygulaması gösterdi.

Tablo 12. DU 145 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

KURKUMİN Doz-% Canlı Hücre Tablosu				
Doz	N	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	6	100,00±2,36 ^{ab}	100,00±2,28 ^a	100,00±6,01 ^a
1,5 µM	6	105,79±1,27 ^a	105,07±2,56 ^a	87,21±1,74 ^{bc}
3,12 µM	6	100,00±1,11 ^{ab}	93,51±4,86 ^a	87,14±2,42 ^{bc}
6,25 µM	6	97,05±2,65 ^{bc}	66,17±8,33 ^b	89,44±4,15 ^b
12,5 µM	6	92,46±1,86 ^{cd}	46,32±6,70 ^c	78,16±1,49 ^c
25 µM	6	90,63±2,37 ^d	26,17±3,58 ^d	26,62±3,85 ^d
50 µM	6	49,10±1,40 ^e	16,84±0,86 ^d	20,51±0,53 ^d

Çalışma kapsamında; dozlar, Kurkumin'in 50 µM konsantrasyonundan başlanarak, seri sulandırım ile yarı yarıya azaltıldı ve 6 farklı konsantrasyonda uygulandı. Tablo 12 incelendiğinde; dozlar arasındaki en belirgin farkın, 48 saatlik Kurkumin uygulaması sonrasında olduğu görüldü. 24 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde dozlar ile canlı hücre sayıları arasında bir düşüş görüldüğü halde Kurkumin'in doz etkinliğinin azaldığı belirlendi.

Doza bağımlı düşüş ile ilgili yapılan korelasyon analizinde en yüksek korelasyon -0,929 korelasyon kat sayısı değeri ile 24 saatlik uygulamada belirlenirken, bunu -0,900 korelasyon kat sayısı değeri ile 72 saatlik uygulama ve -0,839 korelasyon kat sayısı ile 48 saatlik uygulama takip etti (Tablo 13).

Sonuç olarak veriler değerlendirildiğinde, Kurkumin uygulaması DU 145 hücre hattı üzerinde doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi 48 saat olarak belirlendi.

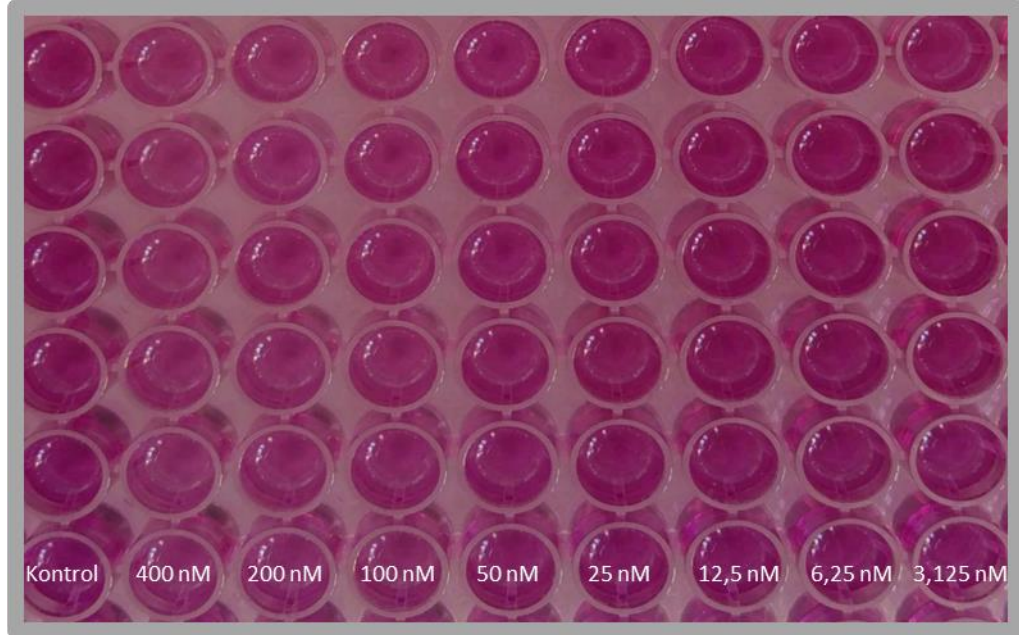
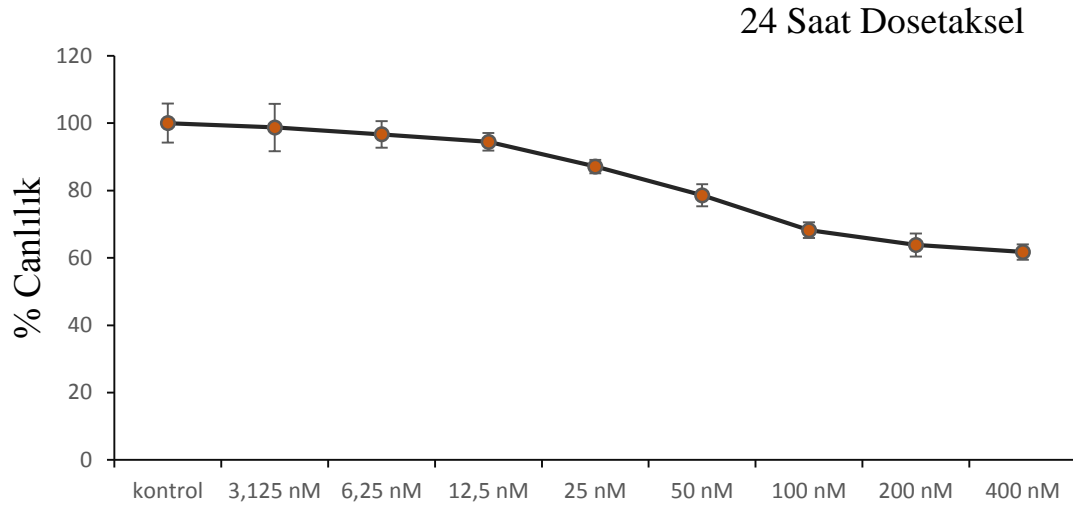
Tablo 13. Kurkumin doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.

Kurkumin Korelasyon Tablosu				
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	Dozlar
24 Saat Pearson Korelasyon	1	,701**	,754**	-,929**
Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000
N	42	42	42	42
48 Saat Pearson Korelasyon	,701**	1	,826**	-,839**
Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000
N	42	42	42	42
72 Saat Pearson Korelasyon	,754**	,826**	1	-,900**
Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000
N	42	42	42	42
Dozlar Pearson Korelasyon	-,929**	-,839**	-,900**	1
Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	
N	42	42	42	42

**Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed)

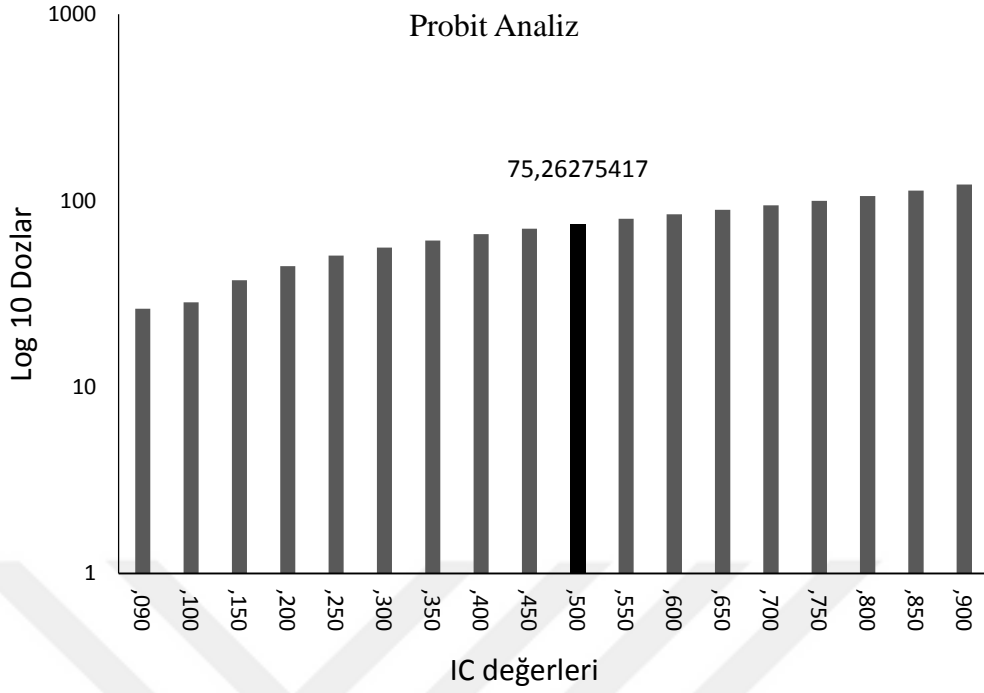
DOSETAKSEL

DU 145 hücre hattında 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyon uygulanan DoseTaksel, 24 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{24\text{ Saat}} = 94,045$; $sd=8-44$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 3,125 nM uygulama konsantrasyonunda % $98,72 \pm 7,04$ olarak belirlenirken, 400 nM DoseTaksel konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece % $61,73 \pm 2,25$ 'i canlı kaldı (Şekil 48).



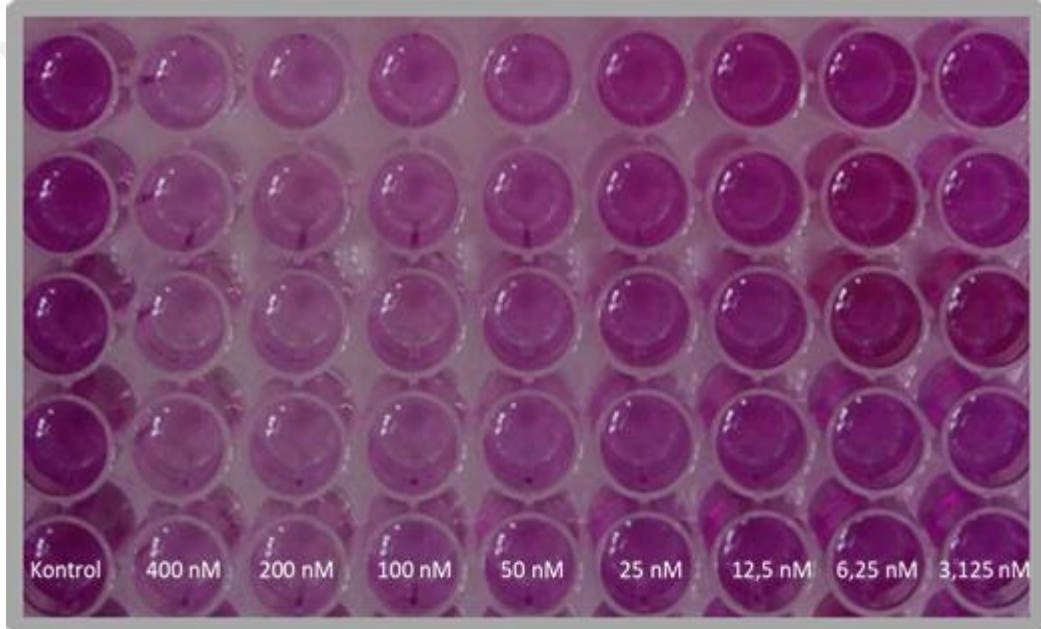
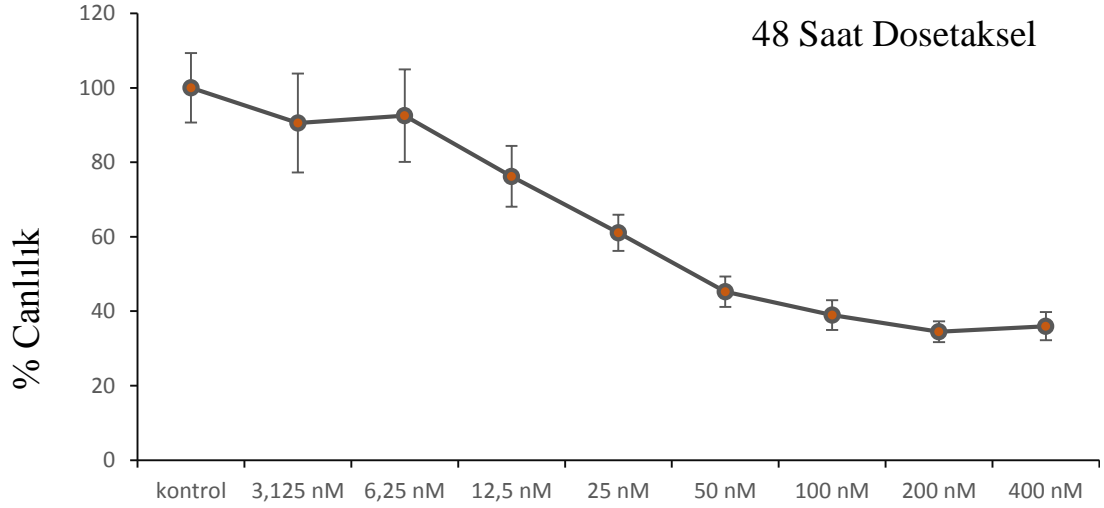
Şekil 48. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma.

Çalışma kapsamında 24 saatlik Dosetaksel uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Dosetaksel'in DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 75,26 nM olarak saptandı (Şekil 49).



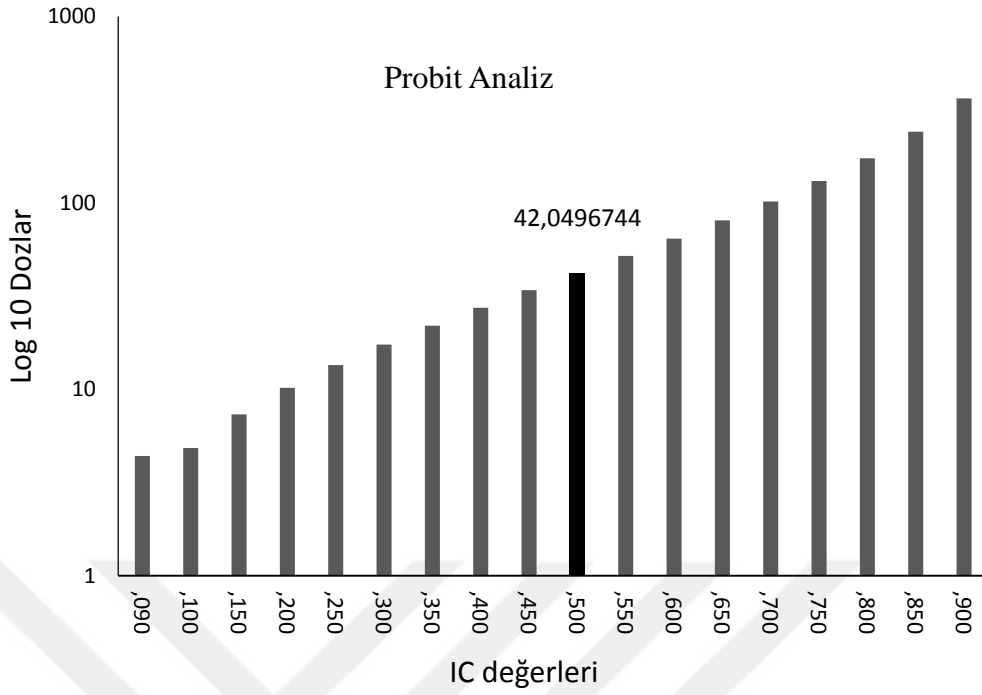
Şekil 49. Dosetaksel'in DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

DU 145 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Dosetaksel, 48 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{48 \text{ Saat}} = 84,123$; $sd=8-45$; $p < 0,0001$). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 6,25 nM uygulama konsantrasyonunda $\% 90,52 \pm 13,28$ olarak belirlenirken, 200 nM Dosetaksel konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece $\% 34,46 \pm 2,77$ 'si canlı kaldı (Şekil 50).



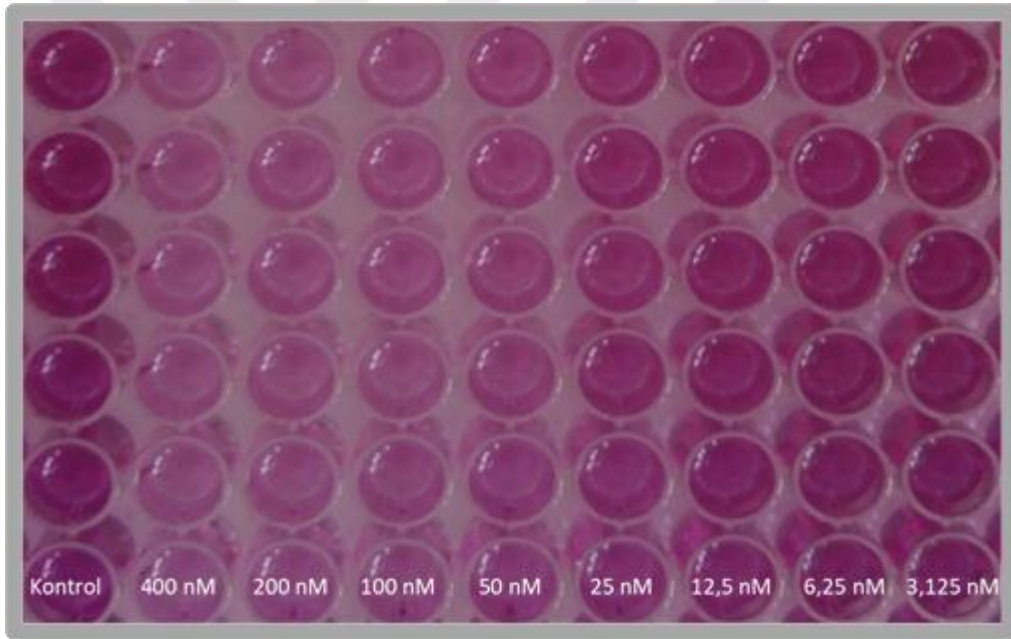
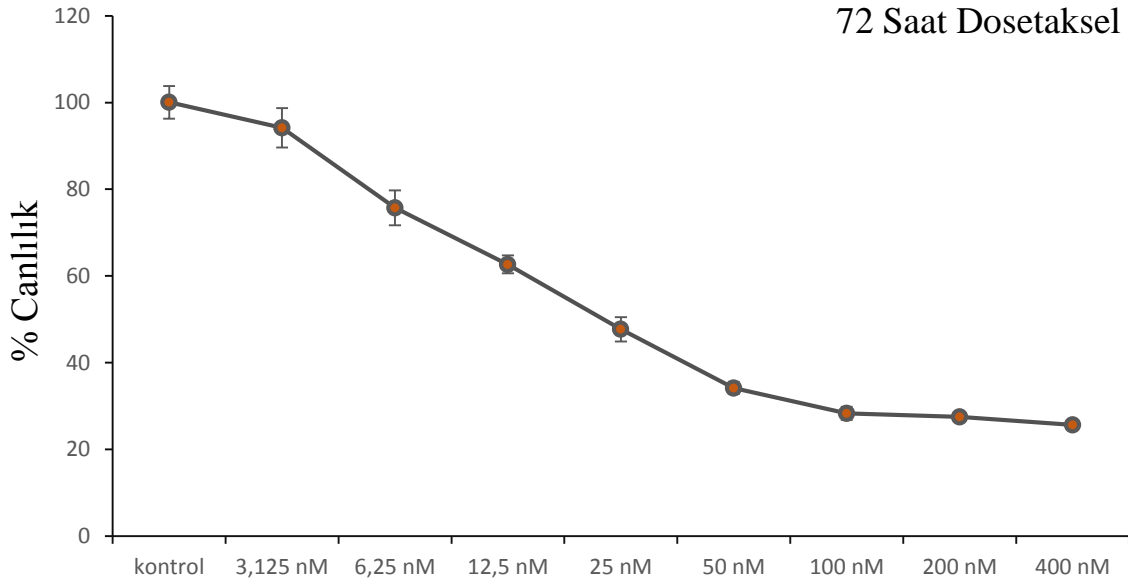
Şekil 50. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Doksetsel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma.

Çalışma kapsamında 48 saatlik Doksetsel uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Doksetsel'in DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 48 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 42,04 nM olarak saptandı (Şekil 51).



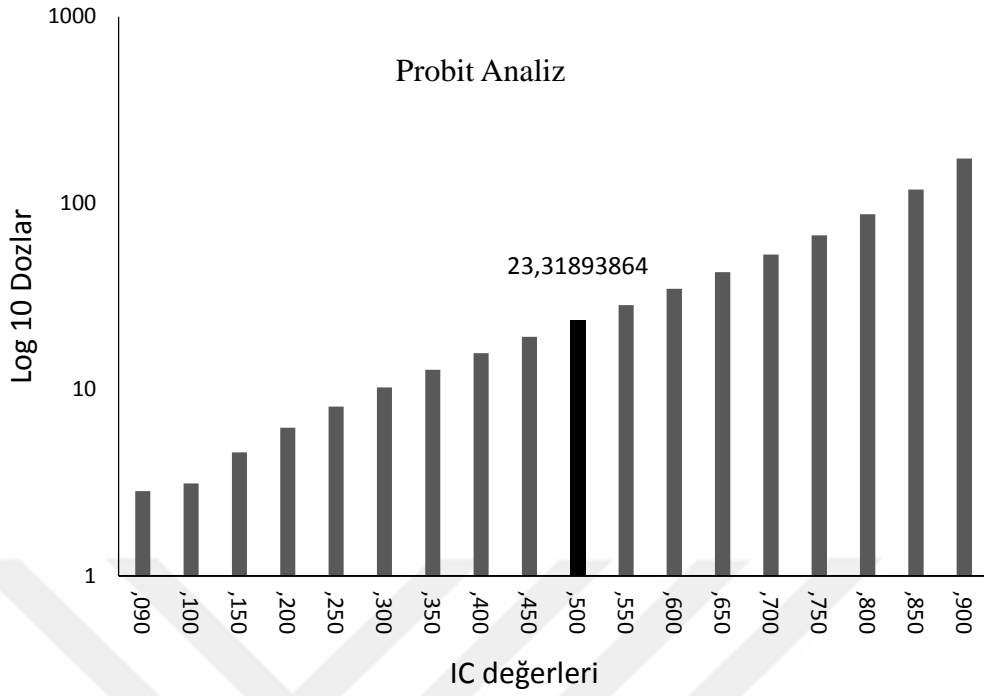
Şekil 51. Dosetaksel'in DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

DU 145 hücre hattında farklı konsantrasyonlar ile uygulanan Dosetaksel 72 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{72 \text{ Saat}} = 669,03$; $sd=8-45$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 72 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı 3,125 nM uygulama konsantrasyonunda % $94,15 \pm 4,51$ olarak belirlenirken, 400 nM Dosetaksel konsantrasyonunda ortamdaki hücrelerin sadece % $25,66 \pm 1,06$ 'sı canlı kaldı (Şekil 52).



Şekil 52. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma.

Çalışma kapsamında 72 saatlik Dosetaksel uygulaması sonucu belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve Dosetaksel'in DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 72 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 23,31 nM olarak saptandı (Şekil 53).



Şekil 53. Dosetaksel'in DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

DU-145 Prostat Kanseri Hücre Hattında Dosetaksel Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Yapılan çalışmada Dosetaksel, DU 145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile uygulanmış ve her bir uygulama birbiriyle aynı olacak şekilde 3,125-400 nM aralığında 8 farklı konsantrasyonda yapılmıştır. Uygulamalarda elde edilen kontrole kıyasla belirlenen % canlılık oranları ve bu oranlar kullanılarak yapılan korelasyon analizi sonuçları Tablo 14 ve Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 14 genel olarak değerlendirildiğinde; prostat kanseri hücre serisi olan DU 145 üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik Dosetaksel uygulaması sonrasında, doza bağımlı olarak bir düşüş görüldü ve düşüşün lineer bir şekilde gerçekleştiği belirlendi. 72 saatlik Dosetaksel uygulaması DU 145 hücre hattında en düşük konsantrasyondan başlayarak dramatik bir şekilde hücre ölümü oluşturdu. 24 ve 48 saatlik uygulamalarda da hücre ölümünde belirgin bir azalma görülse de 72 saatle kıyaslandığında ölüm oranı düşük bulundu.

Tablo 14. DU 145 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM aralıklarında Doseksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi.

DOSEKSEL Doz-% Canlı Hücre Tablosu				
Doz	N	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	6	99,89±2,35 ^a	100,00±3,39 ^a	100,04±1,54 ^a
3,125 nM	6	98,72±3,15 ^{ab}	90,52±4,85 ^b	94,15±1,84 ^b
6,25 nM	6	96,68±1,61 ^{ab}	92,52±4,53 ^{ab}	75,70±1,63 ^c
12,5 nM	6	94,45±1,05 ^b	76,22±2,98 ^c	62,67±0,84 ^d
25 nM	6	87,13±0,81 ^c	61,06±1,77 ^d	47,72±1,14 ^e
50 nM	6	78,57±1,34 ^d	45,22±1,49 ^e	34,19±0,56 ^f
100 nM	6	68,20±0,94 ^e	38,97±1,46 ^{ef}	28,35±0,61 ^g
200 nM	6	63,82±1,39 ^{ef}	34,46±1,01 ^f	27,53±0,42 ^g
400 nM	6	61,73±0,92 ^f	35,96±1,38 ^f	25,66±0,43 ^g

Yapılan çalışmada Doseksel dozları, 400 nM konsantrasyondan başlanarak, seri sulandırım ile yarı yarıya azaltıldı ve 8 farklı konsantrasyonu uygulandı. Tablo 14 incelendiğinde 24 ve 48 saatlik uygulamalarda canlı hücre sayılarında bir düşüş görüldüğü halde doz etkinliği, 72 saatlik uygulamaya daha düşük olarak belirlendi.

Doza bağımlı düşüş ile ilgili yapılan korelasyon analizinde en yüksek korelasyon -0,811 korelasyon kat sayısı değeri ile 24 saatlik uygulamada belirlenirken, bunu -0,689 korelasyon kat sayısı değeri ile 48 saatlik uygulama ve -0,664 korelasyon kat sayısı ile 72 saatlik uygulama takip etti (Tablo 15).

Sonuç olarak veriler değerlendirildiğinde, Doseksel uygulaması DU 145 hücre hattı üzerinde doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. Bununla birlikte en etkili uygulama süresi 72 saat olarak belirlendi.

Tablo 15. Dosetaksel doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.

Dosetaksel Korelasyon Tablosu					
		24 Saat	48 Saat	72 Saat	Dozlar
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	,900**	,891**	-,811**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000
	N	53	53	53	53
48 Saat	Pearson Korelasyon	,900**	1	,940**	-,689**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000
	N	53	54	54	54
72 Saat	Pearson Korelasyon	,91**	,940**	1	-,664**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000
	N	53	54	54	54
Dozlar	Pearson Korelasyon	-,811**	-,689**	-,664**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	
	N	53	54	54	54

**Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed)

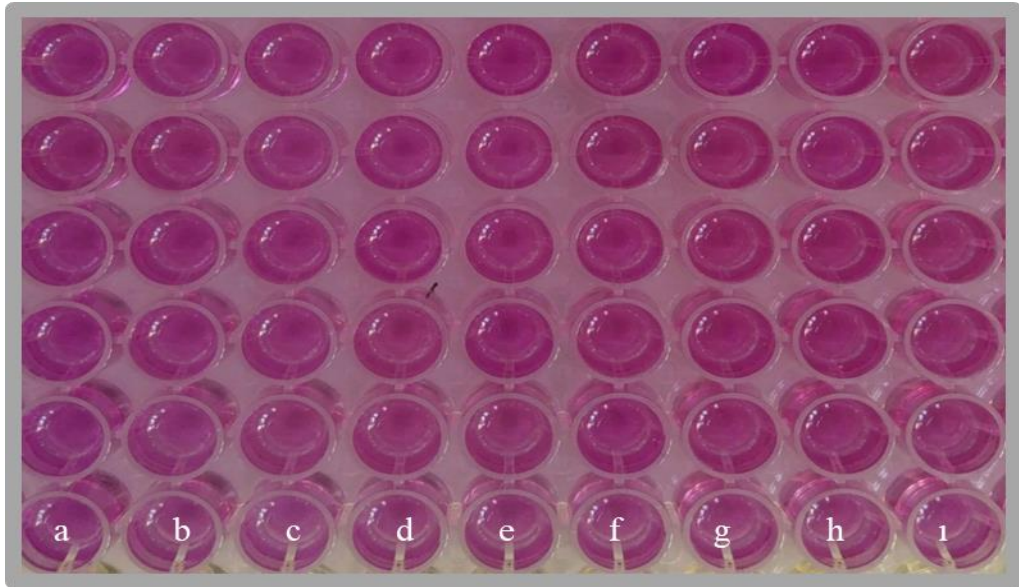
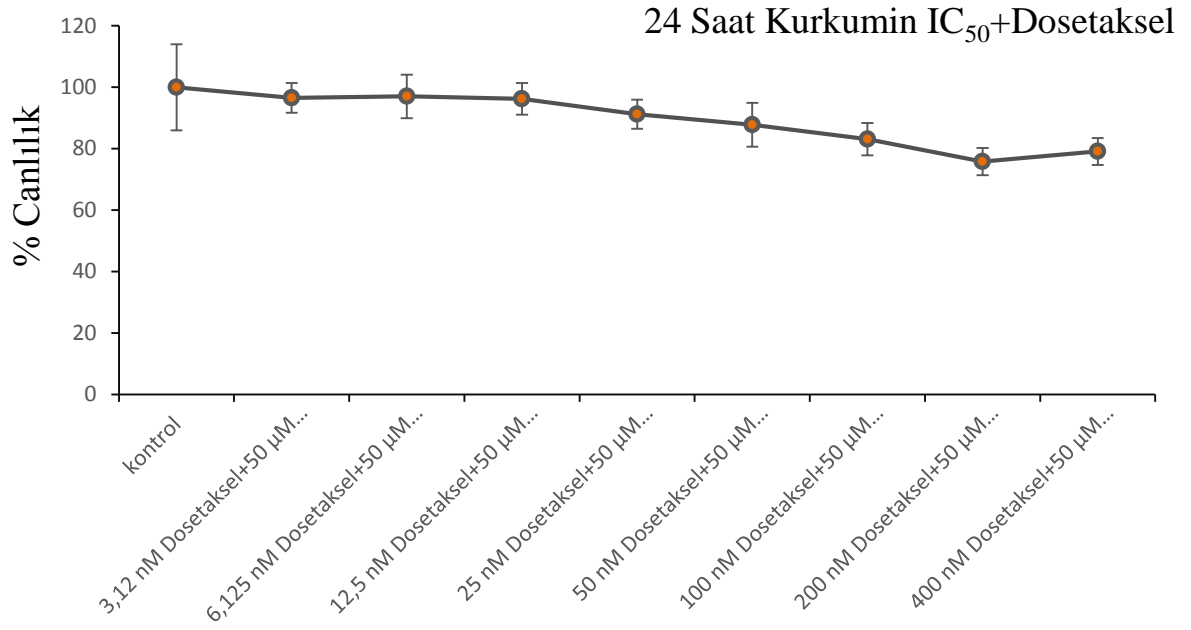
Kurkumin ve Dosetaksel'in Birlikte Uygulanması

Daha önceki çalışmalarda IC₅₀ değeri belirlenen Kurkumin, Dosetaksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozuyla kombinlenerek DU 145 prostat kanseri hücre hattına uygulandı. Yapılan denemede 96 kuyucuklu plakalara 160 µl hücre ekimi yapıldı. Hücre ekimi yapılan plakalar, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında invert mikroskopta hücrelerin tabana tutunup tutunmadığı ve homojen bir yayılım gösterip göstermediği kontrol edildi. Dosetaksel'in 3,125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozu 8 kuyucuğa ve 6 tekrerrür edecek şekilde 96 kuyucuklu plakaya 20 µl uygulandı. Daha sonra Dosetaksel uygulaması yapılan her kuyucuğun üzerine 50µM'lık Kurkumin'den 20 µl uygulandı. Uygulama yapılan plakalar 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde kültüre alındı. DU 145 hücre hattında Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte hücre canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi için plakalar 24, 48 ve 72 saat süresince inkübasyona bırakıldı.

DU 145 hücre hattında, 50 µM Kurkumin ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanması, 24 saat sonunda hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü (F_{24 Saat} =9,33; sd=8-45; p<0,0001). Yapılan çalışmada 24 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı, 6,125 nM Dosetaksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda

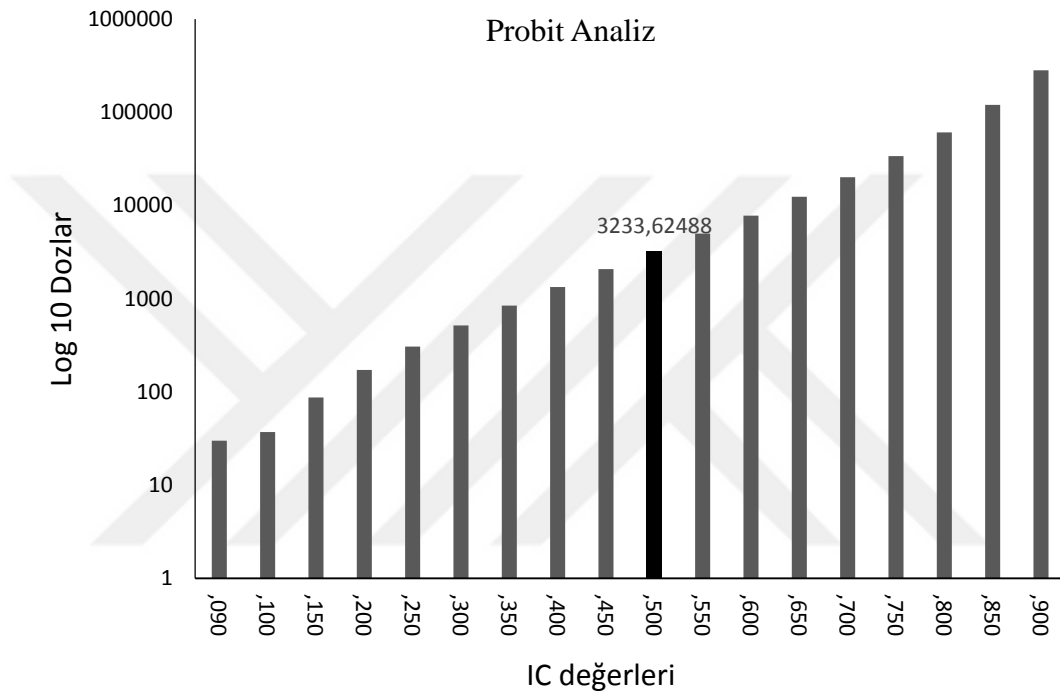
%97,03±7,09 olarak belirlenirken, 200 nM Doksetaksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda, ortamdaki hücrelerin sadece %75,77±4,45'i canlı kaldı (Şekil 54).





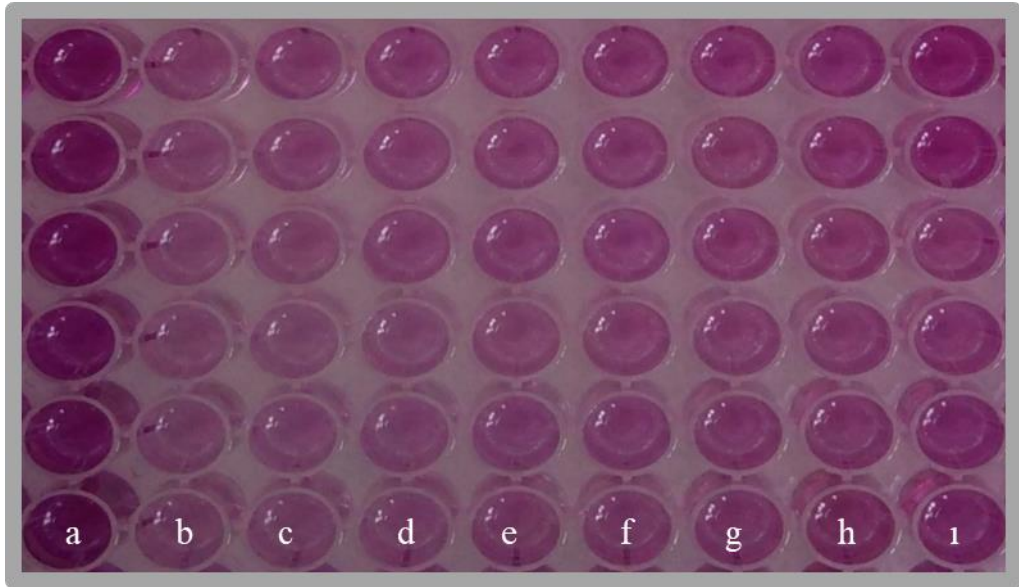
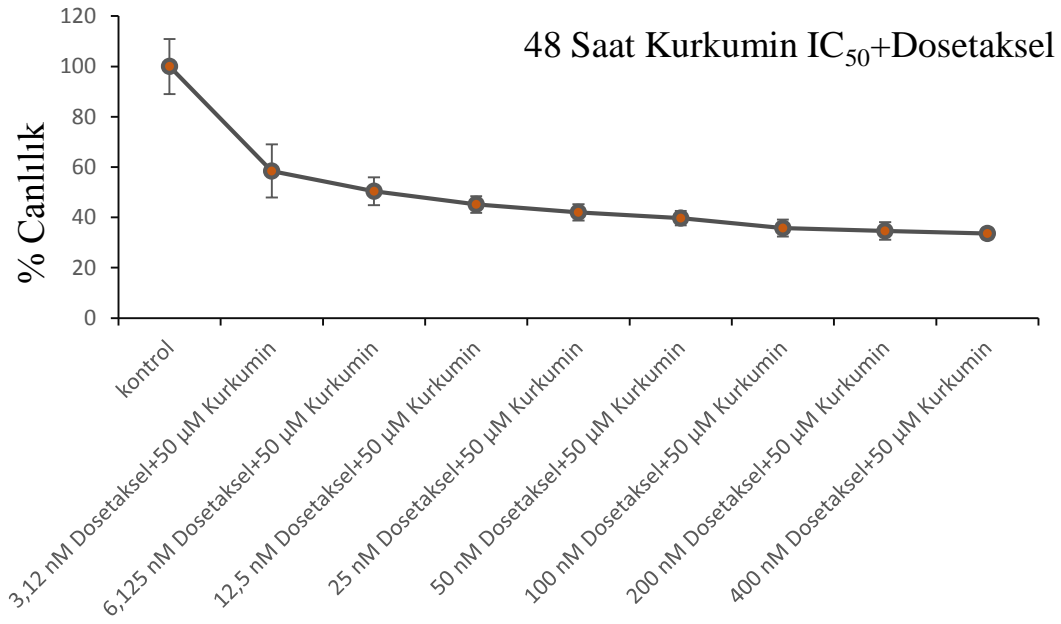
Şekil 54. a. Kontrol b. 400 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin c. 200 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin d. 100 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin e. 50 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin f. 25 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin g. 12,5 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin h. 6,25 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin i. 3,125 nM Doksetsel + 50µM Kurkumin. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile Doksetsel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

Çalışma kapsamında 24 saatlik, 50 μ M Kurkumin ile Doseksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanması sonucunda belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrası IC_{50} değeri 3233,62 nM olarak saptandı (Şekil 55).



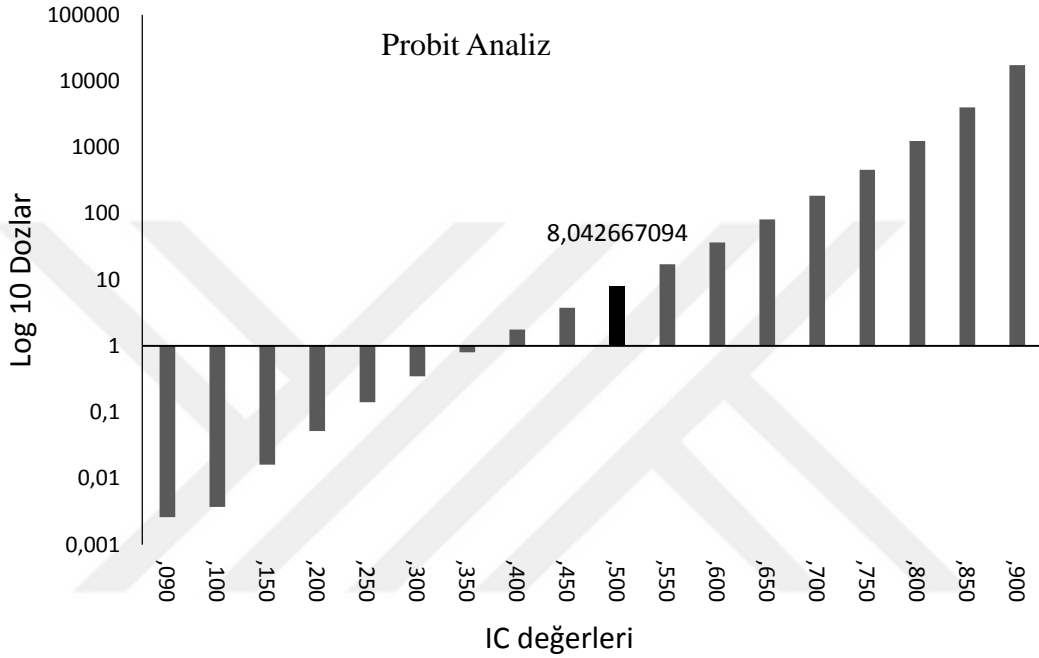
Şekil 55. Doseksel ve Kurkumin'in birlikte, DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulama sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC_{50} değeri.

DU 145 hücre hattında, 50 μ M Kurkumin ile Doseksel'in 3,125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanması, 48 saat sonunda hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{48 \text{ Saat}} = 72,86$; $sd=8-45$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 48 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı, 3,12 nM Doseksel ve 50 μ M Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda $\%58,46 \pm 10,61$ olarak belirlenirken, 400 nM Doseksel ve 50 μ M Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda, ortamdaki hücrelerin sadece $\%33,63 \pm 2,23$ 'ü canlı kaldı (Şekil 56).



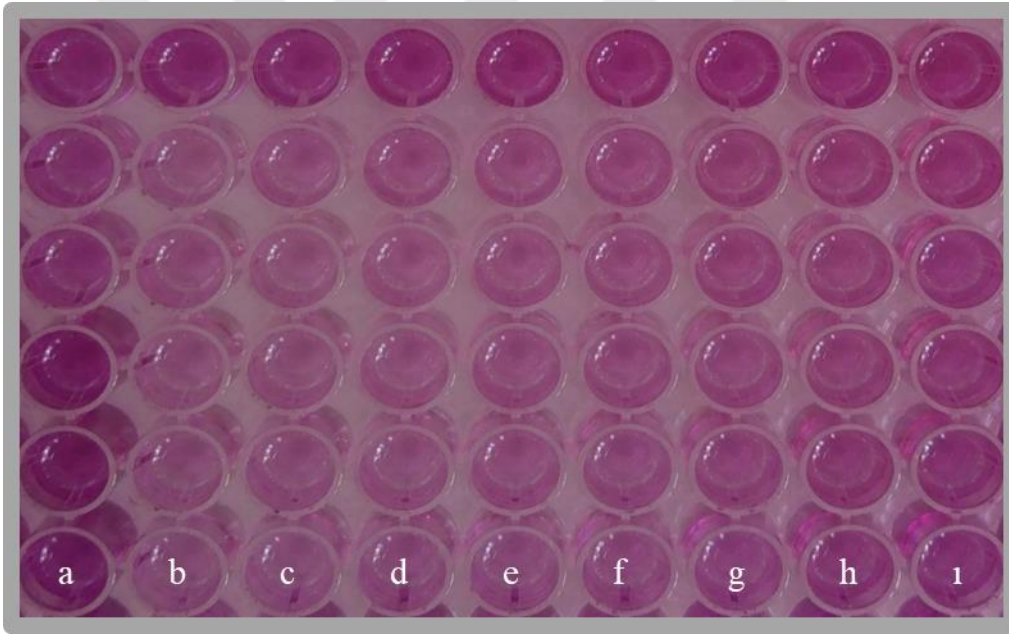
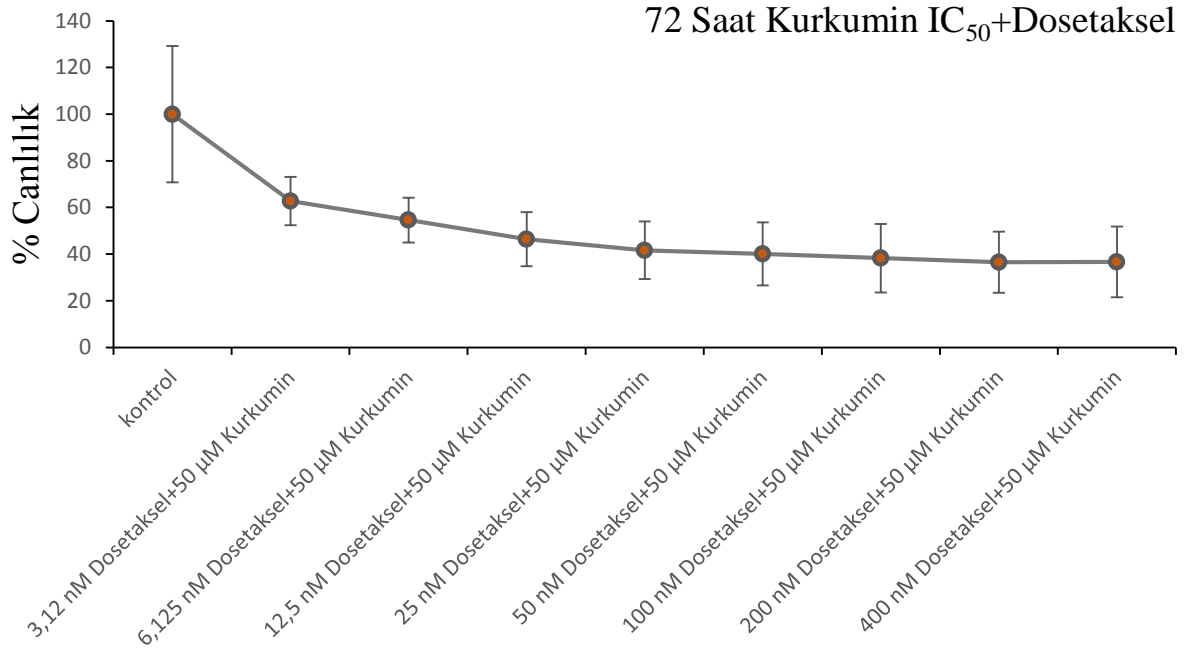
Şekil 56. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin i. 3,125 nM Dosetaksel + 50μM Kurkumin. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konstantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

Çalışma kapsamında 48 saatlik, 50 µM Kurkumin ile Dosetaksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanması sonucunda belirlenen yüzde canlılık değerleri kullanılarak, her bir doz için kontrole kıyasla oluşan ölüm oranları belirlendi. Bu oranlar kullanılarak probit analizi yapıldı ve DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 48 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 8,04 nM olarak saptandı (Şekil 57).



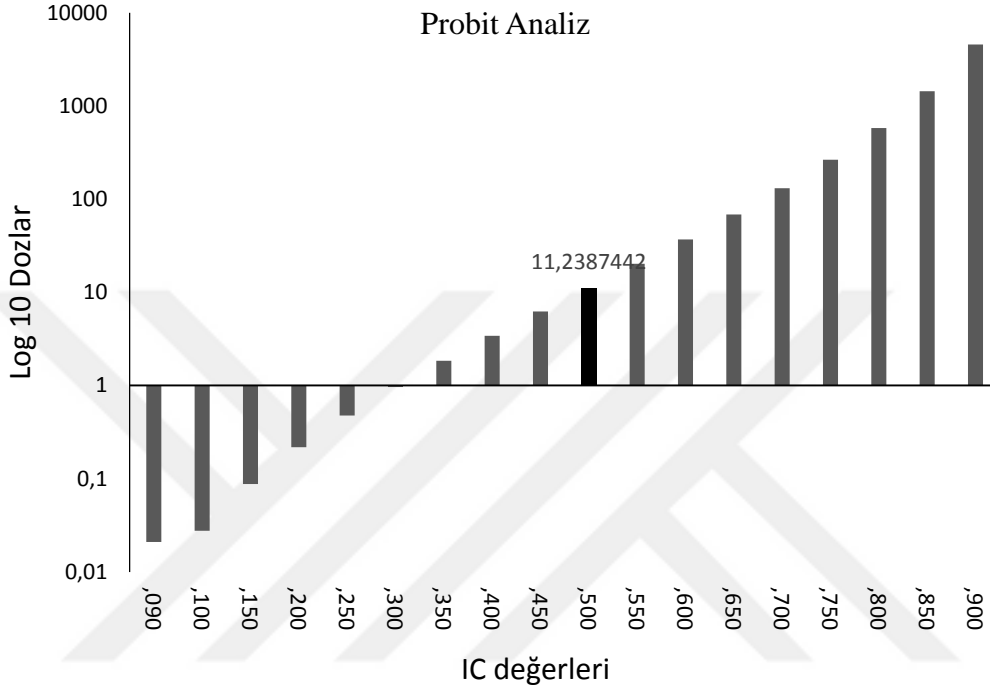
Şekil 57. Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte, DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulama sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

DU 145 hücre hattında, 50 µM Kurkumin ile Dosetaksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanması, 72 saat sonunda hücre canlılığını istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü ($F_{72 \text{ Saat}} = 10,57$; $sd=8-45$; $p<0,0001$). Yapılan çalışmada 72 saatlik uygulama sonrasında kontrole kıyasla en yüksek canlı hücre oranı, 3,12 nM Dosetaksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda $\%62,74 \pm 10,30$ olarak belirlenirken, 200 nM Dosetaksel ve 50 µM Kurkumin'in birlikte uygulanan konsantrasyonunda, ortamdaki hücrelerin sadece $\%36,49 \pm 13,12$ 'si canlı kaldı (Şekil 58).



Şekil 58. a. Kontrol b. 400 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin c. 200 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin d. 100 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin e. 50 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin f. 25 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin g. 12,5 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin h. 6,25 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin i. 3,125 nM Doksetsel + 50μM Kurkumin. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile Doksetsel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.

Çalışma kapsamında 72 saatlik, 50 µM Kurkumin ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanması sonucunda kontrole göre yüzde canlılık değerleri kullanılarak, probit analizi yapıldı ve DU 145 prostat kanseri hücre hattı üzerinde 72 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 11,23 nM olarak saptandı (Şekil 59).



Şekil 59. Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte, DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulama sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC₅₀ değeri.

DU-145 Prostat Kanseri Hücre Hattında Kurkumin ve Dosetaksel'in Birlikte Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Yapılan çalışmada, DU 145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM aralığında 8 farklı konsantrasyonunun her biri, Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile birlikte uygulanmıştır. Uygulamalarda elde edilen kontrole kıyasla belirlenen % canlılık oranları ve bu oranlar kullanılarak yapılan korelasyon analizi sonuçları Tablo 16 ve Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 16 genel olarak değerlendirildiğinde; DU 145 prostat kanseri hücre hattında, Dosetaksel dozlarının Kurkumin'in IC₅₀ dozu ile kombinasyonunda 24, 48 ve 72 saat sonrasında doza bağımlı bir düşüş görülmüştür.

Tablo 16. DU 145 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel konsantrasyonlarının 50µM Kurkumin ile birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi.

DOSETAKSEL+KURKUMİN Doz-% Canlı Hücre Tablosu				
Doz	N	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	6	100,00±5,72 ^a	100,00±4,46 ^a	100,00±11,94 ^a
3,12 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	96,55±1,98 ^a	58,46±4,33 ^b	62,74±4,20 ^b
6,125 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	97,03±2,89 ^a	50,36±2,25 ^c	54,60±3,91 ^{bc}
12,5 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	96,18±2,10 ^{ab}	45,11±1,33 ^{cd}	46,46±4,74 ^{bc}
25 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	91,18±1,93 ^{abc}	41,99±1,31 ^{de}	41,62±5,04 ^c
50 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	87,74±2,92 ^{bc}	39,69±1,17 ^{def}	40,08±5,54 ^c
100 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	83,03±2,16 ^{cd}	35,73±1,36 ^{ef}	38,25±5,99 ^c
200 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	75,77±1,82 ^d	34,59±1,43 ^{ef}	36,49±5,35 ^c
400 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin	6	79,07±1,77 ^d	33,63±0,91 ^f	36,65±6,19 ^c

Yapılan çalışmada Dosetaksel dozları, 400 nM konsantrasyondan başlanarak, seri sulandırım ile yarı yarıya azaltılmıştır. 50 µM Kurkumin dozu ise, sulandırılan her Dosetaksel dozuyla kombinlenerek uygulanmıştır.

Tablo 16 incelendiğinde, 24 saatlik uygulamada belirgin bir şekilde doz etkinliğinde azalma görüldü ve bunu 48 saatlik uygulama takip etti. Canlı hücre sayısındaki en belirgin düşüşün ise 72 saatlik uygulama sonrasında olduğu belirlendi.

Doza bağımlı düşüş ile ilgili yapılan korelasyon analizinde en yüksek korelasyon -0,642 korelasyon kat sayısı değeri ile 24 saatlik uygulamada belirlenirken, bunu -0,472 korelasyon kat sayısı değeri ile 48 saatlik uygulama ve -0,388 korelasyon kat sayısı ile 72 saatlik uygulama takip etti (Tablo 17).

Sonuç olarak veriler değerlendirildiğinde, Dosetaksel dozlarının IC₅₀ Kurkumin dozuyla kombinasyonu prostat kanseri hücre serisi olan DU 145 üzerinde doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi ise 72 saat olarak belirlendi.

Tablo 17. Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte uygulanmasının doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.

		Dosetaksel+Kurkumin Korelasyon Tablosu			
		24 Saat	48 Saat	72 Saat	Dozlar
24 Saat	Pearson Korelasyon	1	,559**	,527**	-,642**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000
	N	54	54	54	54
48 Saat	Pearson Korelasyon	,559**	1	,825**	-,472**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000
	N	54	54	54	54
72 Saat	Pearson Korelasyon	,527**	,825**	1	-,388**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,004
	N	54	54	54	54
Dozlar	Pearson Korelasyon	-,642**	-,472**	-,388**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,004	
	N	54	54	54	54

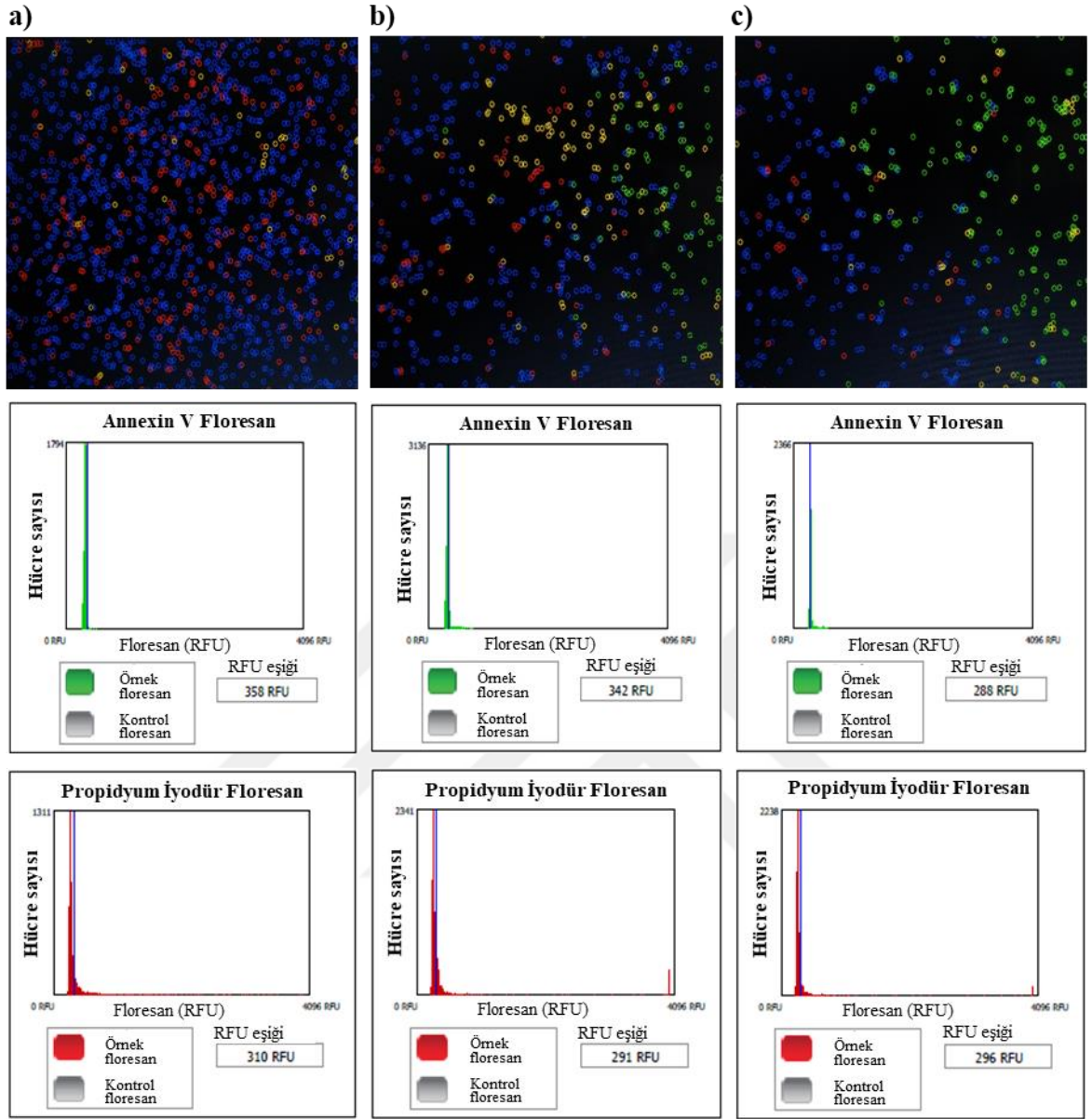
**Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (2-tailed)

TALİ GÖRÜNTÜ TABANLI SİTOMETRE ANALİZİ

Çalışma kapsamında, prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanı Dosetaksel ile biyoaktif bir bileşen olan Kurkumin'in, DU 145 ve PC3 hücre hatları üzerinde yapılan MTT testi sonucunda, sadece canlı ve ölü hücre oranları tespit edildi. Dosetaksel ve Kurkumin'in hücre hatları üzerinde neden olduğu ölümün apoptoz kaynaklı olup olmadığını anlamak amacıyla da TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi yapıldı.

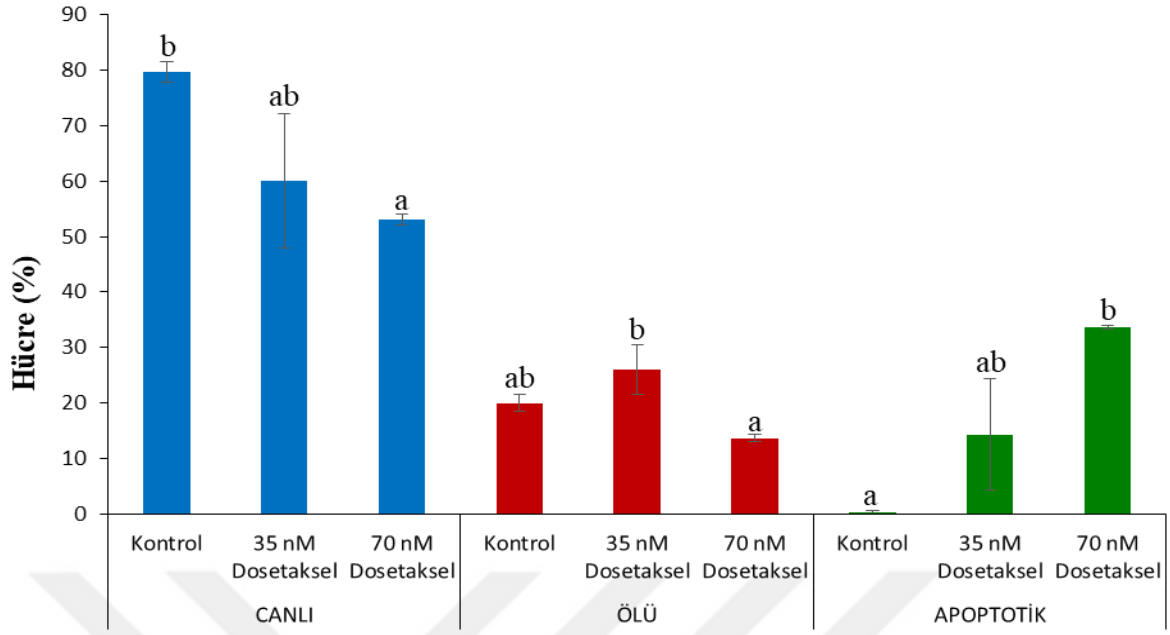
TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi için 25 cm²'lik flasklarda bulunan hücrelere MTT testi sonucunda elde edilen süre ve dozlar uygulandı ve 3 tekerrürlü çalışıldı. Gruplar 35 nM Dosetaksel, 70 nM Dosetaksel, 50 µM Kurkumin 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin, 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin şeklinde olup DU 145 ve PC3 hücre hatlarına uygulandı. 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Annexin V-Alexa Fluor® 488 ve Propidium Iodide ile Tali® Apoptosis Test Kiti kullanılarak boyanan hücre popülasyonunda, ölü veya geç apoptotik hücreler, kırmızı veya sarı, apoptotik hücreler yeşil floresan verdi.

35 nM Dosetaksel, 70 nM Dosetaksel dozu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, Annexin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları Şekil 60'da verilmiştir.



Şekil 60. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Doksetsel c) 70 nM Doksetsel.

Yapılan çalışmada DU 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 35 nM Doksetsel dozunda % 26 ölü, %14,33 apoptotik hücre görülürken, 70 nM Doksetsel dozunda % 13,66 ölü hücre, % 33,66 oranında ise apoptotik hücre saptandı (Şekil 61 ve Tablo 18).

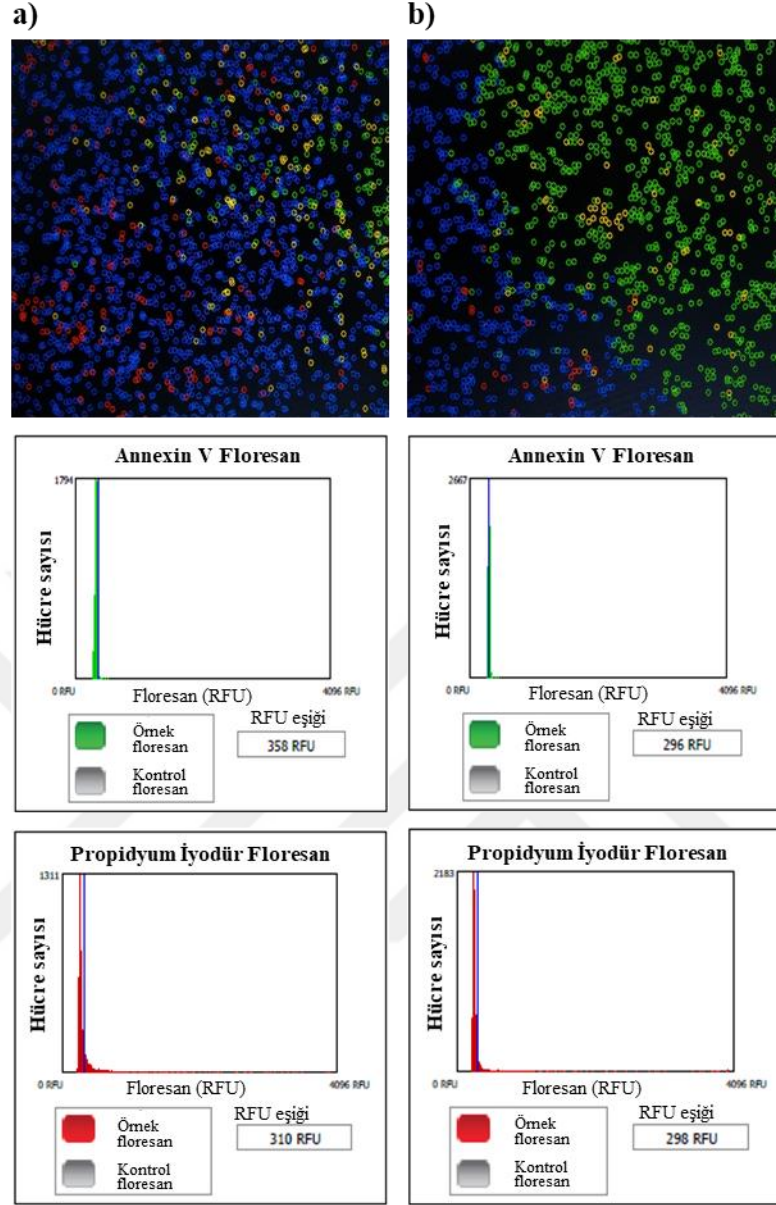


Şekil 61. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. $n=3$; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$

Tablo 18. DU-145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dozetaksel ve 70 nM Dozetaksel uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri

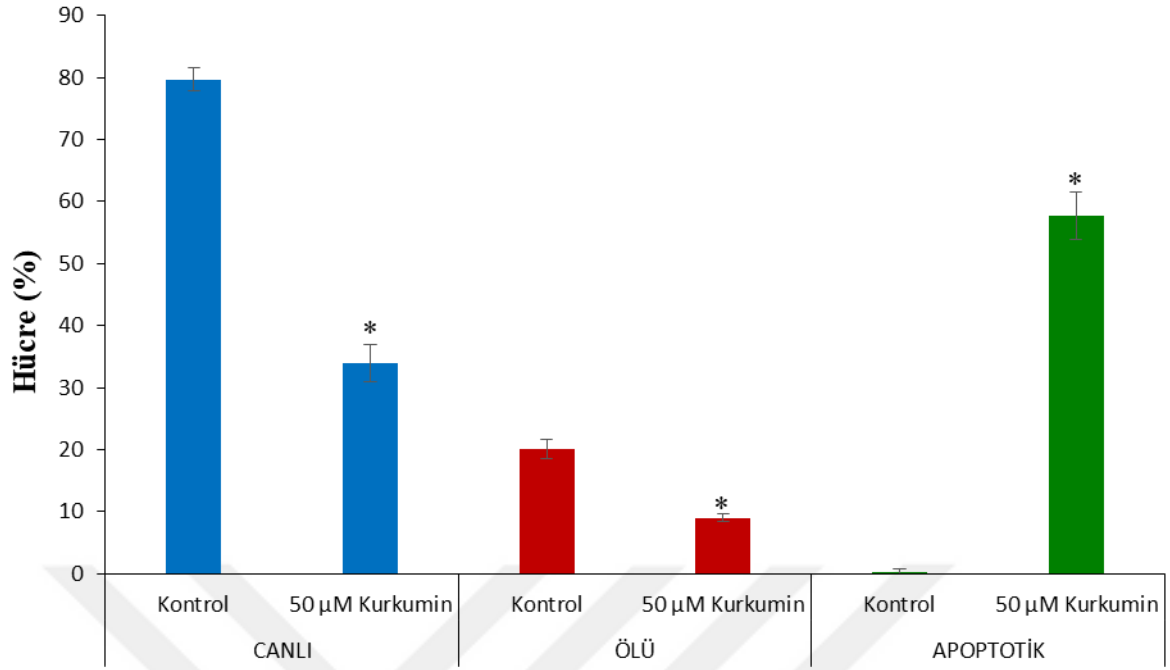
	n	Kontrol	35 nM Dozetaksel	70 nM Dozetaksel
Canlı (%)	3	79,66±1,85	60±12,12	53±1
Canlı hücre sayısı	3	15054	5387	5085
Ölü (%)	3	20±1,52	26±4,50	13,66±0,66
Ölü hücre sayısı	3	3915	2736	1364
Apoptotik (%)	3	0,33±0,33	14,33±10,03	33,66±0,33
Apoptotik hücre sayısı	3	135	1495	3307

50 μ M Kurkumin dozu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, Annexin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları Şekil 62’de verilmiştir.



Şekil 62. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 50 µM Kurkumin

Çalışmada, DU 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 50 µM Kurkumin dozunda, %9 oranında ölü hücre %57,66 oranında apoptotik hücre saptandı (Şekil 63 ve Tablo 19).

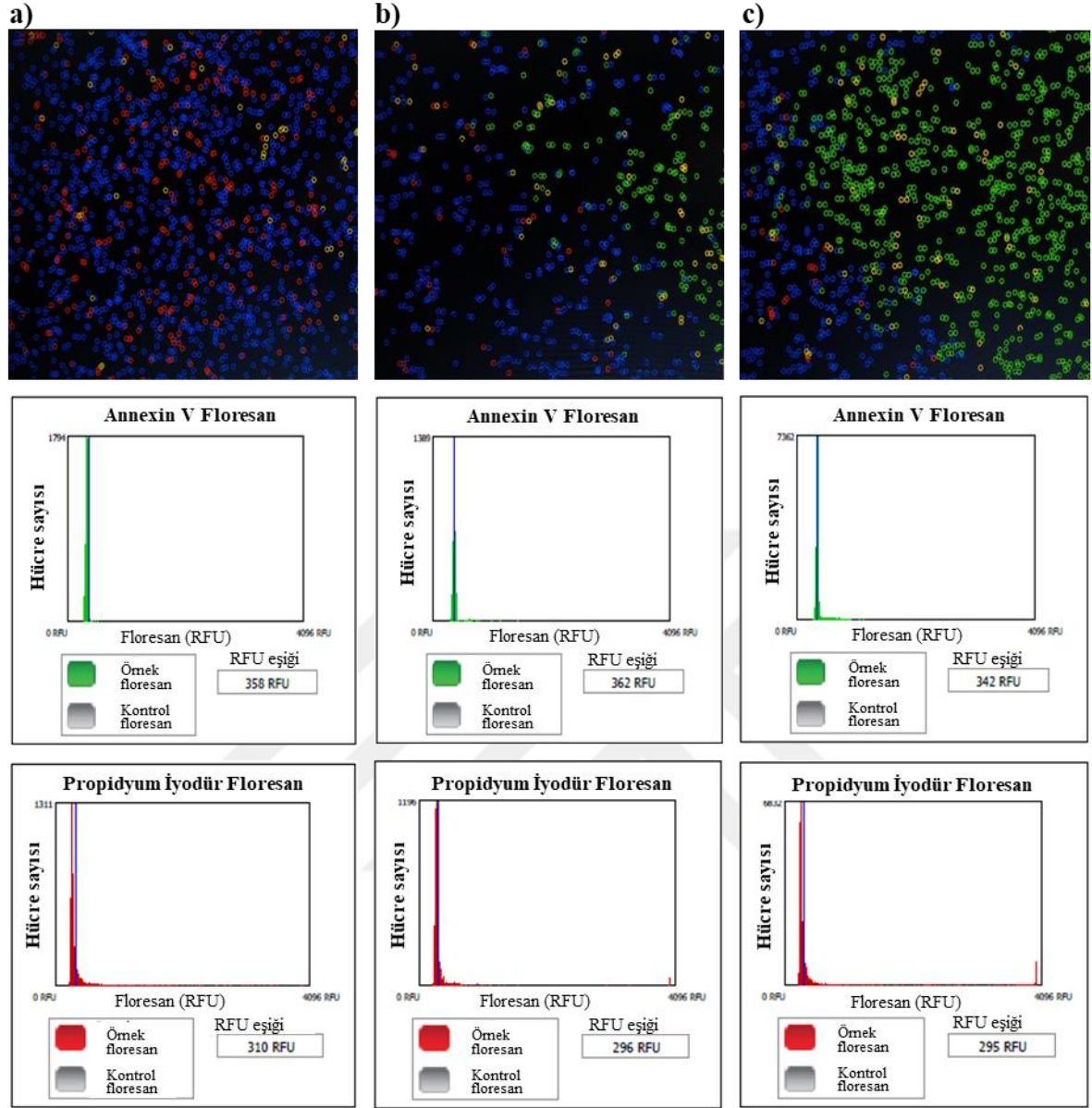


Şekil 63. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. *, kontrole kıyasla $n=3$; T-Test $P_{\text{canlı}} <0,0001$, $P_{\text{ölü}} =0,003$, $P_{\text{apoptotik}} <0,0001$.

Tablo 19. DU 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri

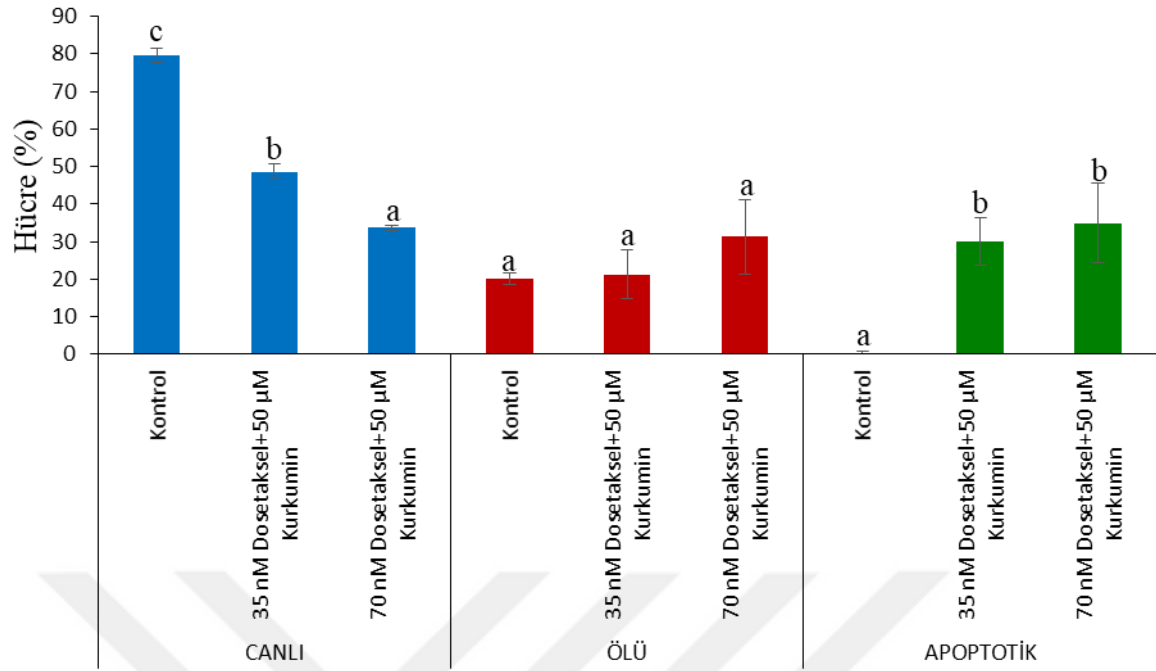
	n	Kontrol	50 µM Kurkumin
Canlı (%)	3	79,66 \pm 1,85	34 \pm 3
Canlı hücre sayısı	3	15054	9706
Ölü (%)	3	20 \pm 1,52	9 \pm 0,57
Ölü hücre sayısı	3	3915	2512
Apoptotik (%)	3	0,33 \pm 0,33	57,66 \pm 3,84
Apoptotik hücre sayısı	3	135	15427

35 nM Doksetaksel + 50 µM Kurkumin ve 70 nM Doksetaksel + 50 µM Kurkumin dozu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, Annexin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları Şekil 64'de verilmiştir.



Şekil 64. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin c) 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin

48 saat süreyle 35 nM Dosetaksel +50 µM Kurkumin kombinasyonu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattında, %21,33 oranında ölü hücre % 30 oranında apoptotik hücre saptandı. 48 saat süreyle 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin kombinasyonu uygulanan hücrelerde ise % 31,33 ölü hücre %35 apoptotik hücre görüldü (Şekil 65 ve Tablo 20).



Şekil 65. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. $n=3$; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$

Tablo 20. DU 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dosetakel + 50 µM Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri

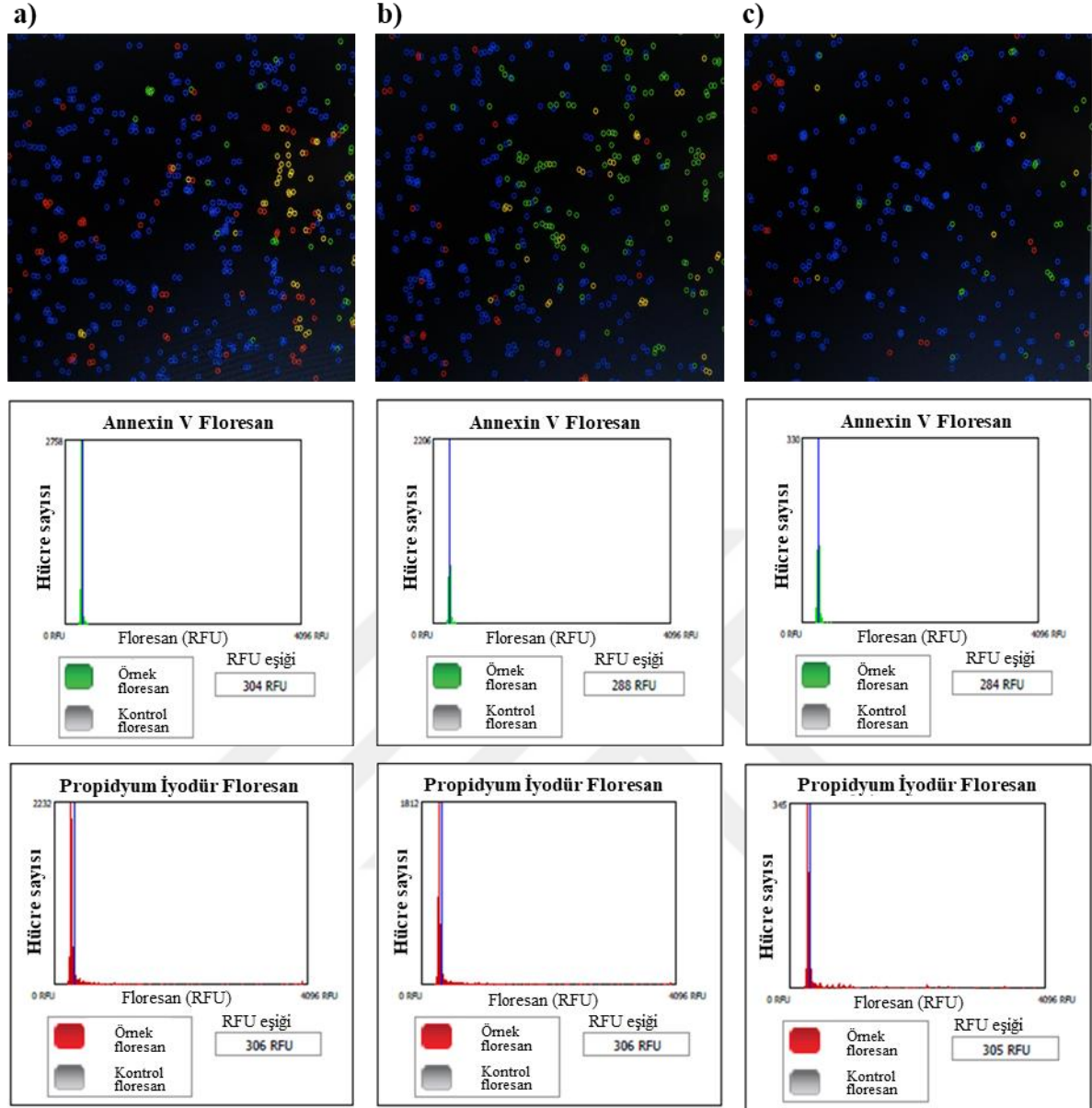
	n	Kontrol	35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin	70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin
Canlı (%)	3	79,66±1,85	48,66±2,02	33,66±0,66
Canlı hücre sayısı	3	15054	7126	9013
Ölü (%)	3	20±1,52	21,33±6,35	31,33±9,93
Ölü hücre sayısı	3	3915	2888	7300
Apoptotik (%)	3	0,33±0,33	30±6,24	35±10,59
Apoptotik hücre sayısı	3	135	4183	10784

Yapılan çalışmada, DU 145 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 35 nM Dosetaksel ve 70 nM Dosetaksel dozları istatistik olarak önemli bir seviyede, hücreler üzerinde apoptotik bir etki oluşturdu ($F_{48 \text{ Saat}} = 8,321$; $sd=2-8$; $p=0,019$). 50 µM Kurkumin dozu da hücreleri istatistik anlamda önemli ölçüde apoptoza götürdü ($F_{48 \text{ Saat}} = 220,76$; $sd=1-5$; $p < 0,0001$).

Kombinasyon dozlarımız olan 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkuminin de apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırdığı görüldü ($F_{48 \text{ Saat}} = 6,956$; $sd=2-8$ $p=0,027$).

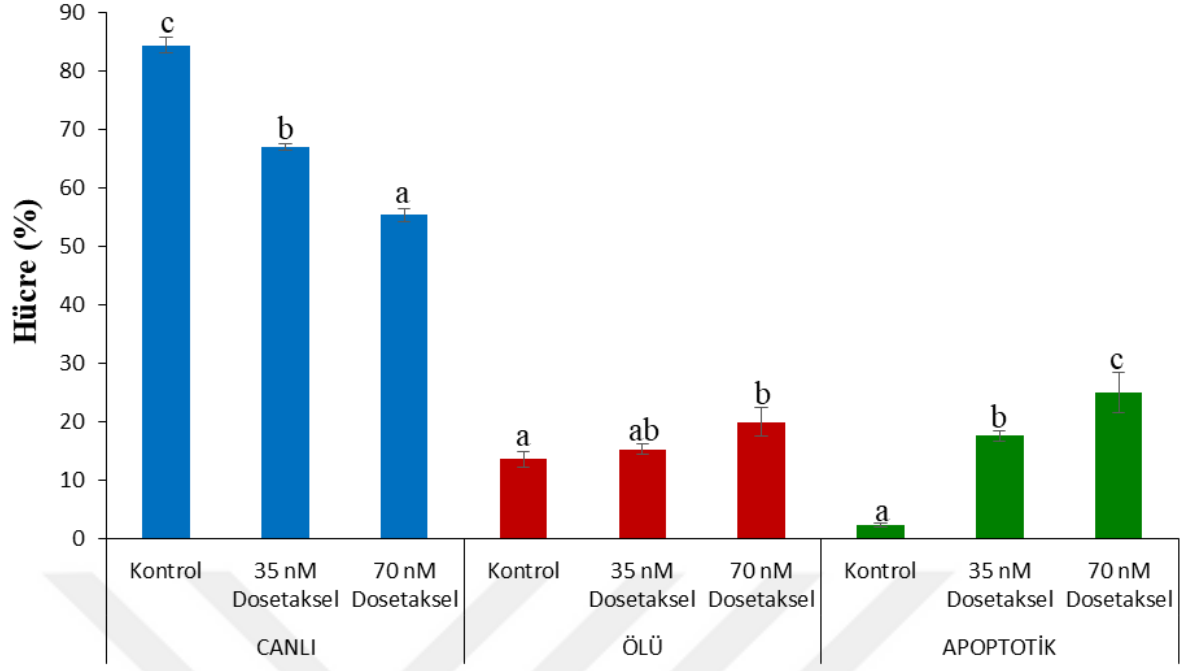
Sonuç olarak tali sitometre analizinde, hücreleri apoptoza götüren en etkili dozun 50 µM Kurkumin olduğu belirlendi. Bunu sırasıyla, 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin, 70 nM Dosetaksel, 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin, 35 nM Dosetaksel dozunun takip ettiği belirlendi.

35 nM Dosetaksel, 70 nM Dosetaksel dozu uygulanan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, Annexin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları Şekil 66'da verilmiştir.



Şekil 66. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde PC3 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Dozetaksel c) 70 nM Dozetaksel.

Çalışmada, PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 35 nM Dozetaksel dozunda %15,33 oranında ölü, %17,66 oranında apoptotik hücre görüldü. 70 nM Dozetaksel dozunda ise % 20 oranında ölü hücre, %25 oranında apoptotik hücre saptandı (Şekil 67 ve Tablo 21).

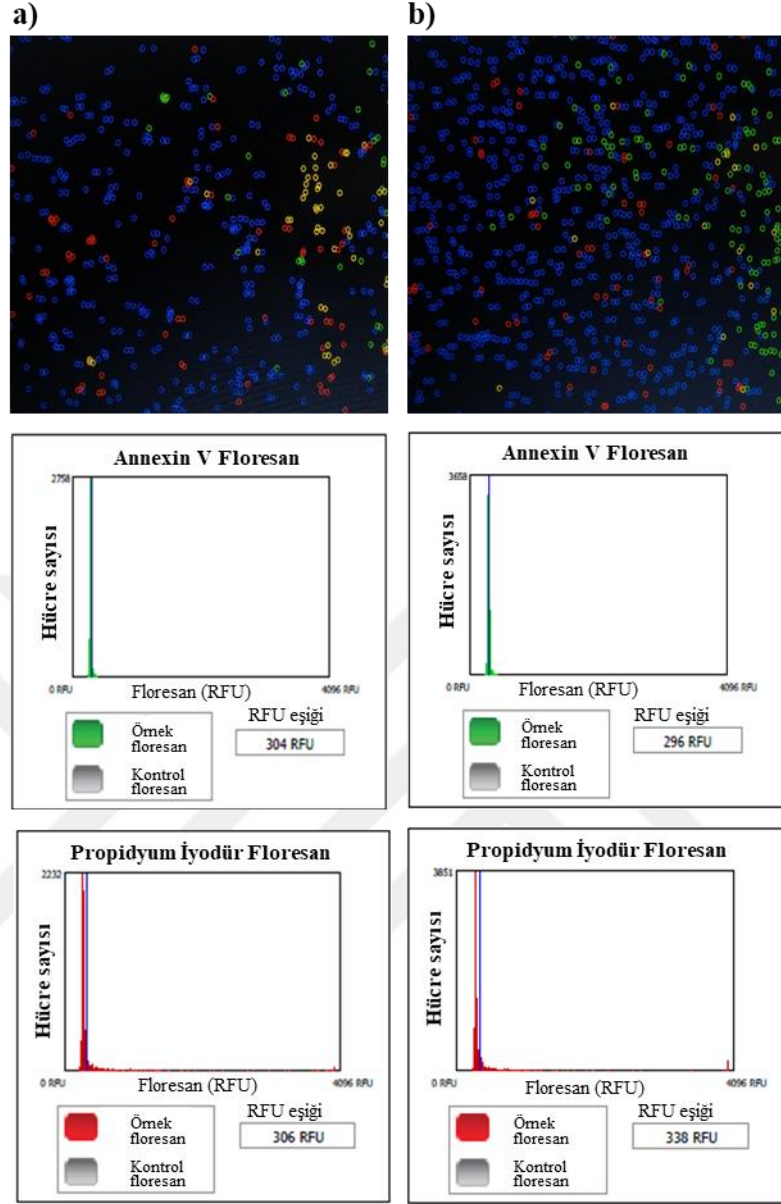


Şekil 67. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. $n=3$; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$

Tablo 21. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dosetaksel ve 70 nM Dosetaksel uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri

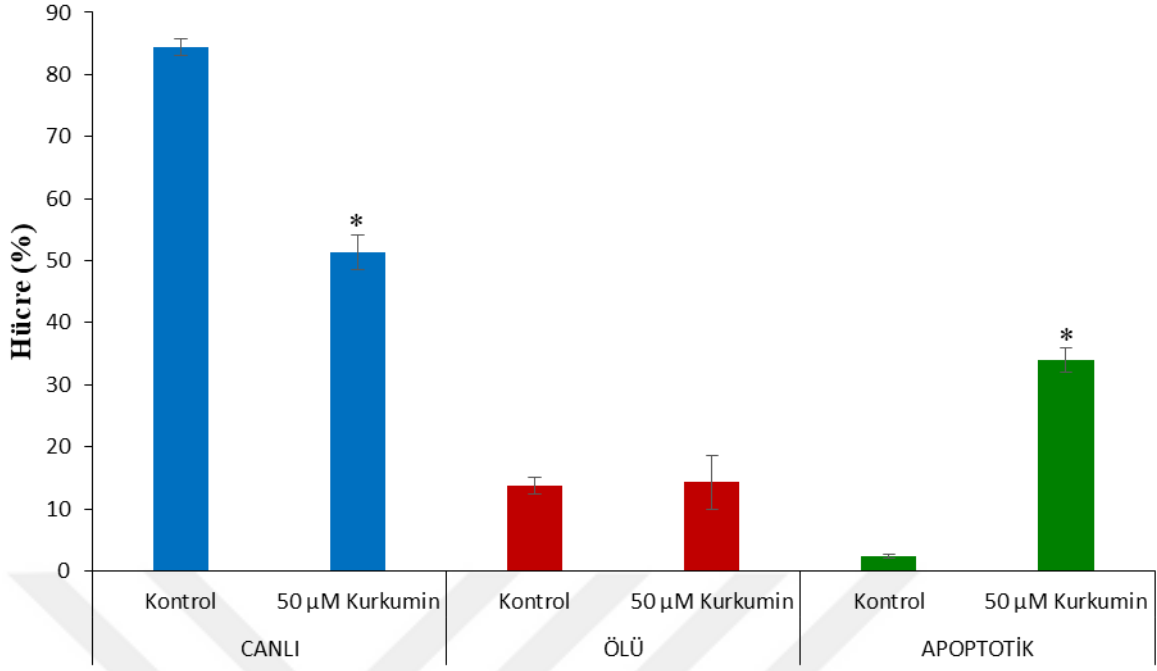
	n	Kontrol	35 nM Dosetaksel	70 nM Dosetaksel
Canlı (%)	3	84,33 \pm 1,33	67 \pm 0,57	55,33 \pm 1,20
Canlı hücre sayısı	3	8775	5612	2332
Ölü (%)	3	13,66 \pm 1,33	15,33 \pm 0,88	20 \pm 2,51
Ölü hücre sayısı	3	1513	1332	778
Apoptotik (%)	3	2,33 \pm 0,33	17,66 \pm 0,88	25 \pm 3,51
Apoptotik hücre sayısı	3	222	1492	1145

50 μ M Kurkumin dozu uygulanan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, Annexin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları Şekil 68’de verilmiştir.



Şekil 68. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde PC3 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 50 µM Kurkumin

Yapılan çalışmada PC3 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 50 µM Kurkumin dozunda, % 14,33 oranında ölü hücre, %34 oranında apoptotik hücre saptandı (Şekil 69 ve Tablo 22).

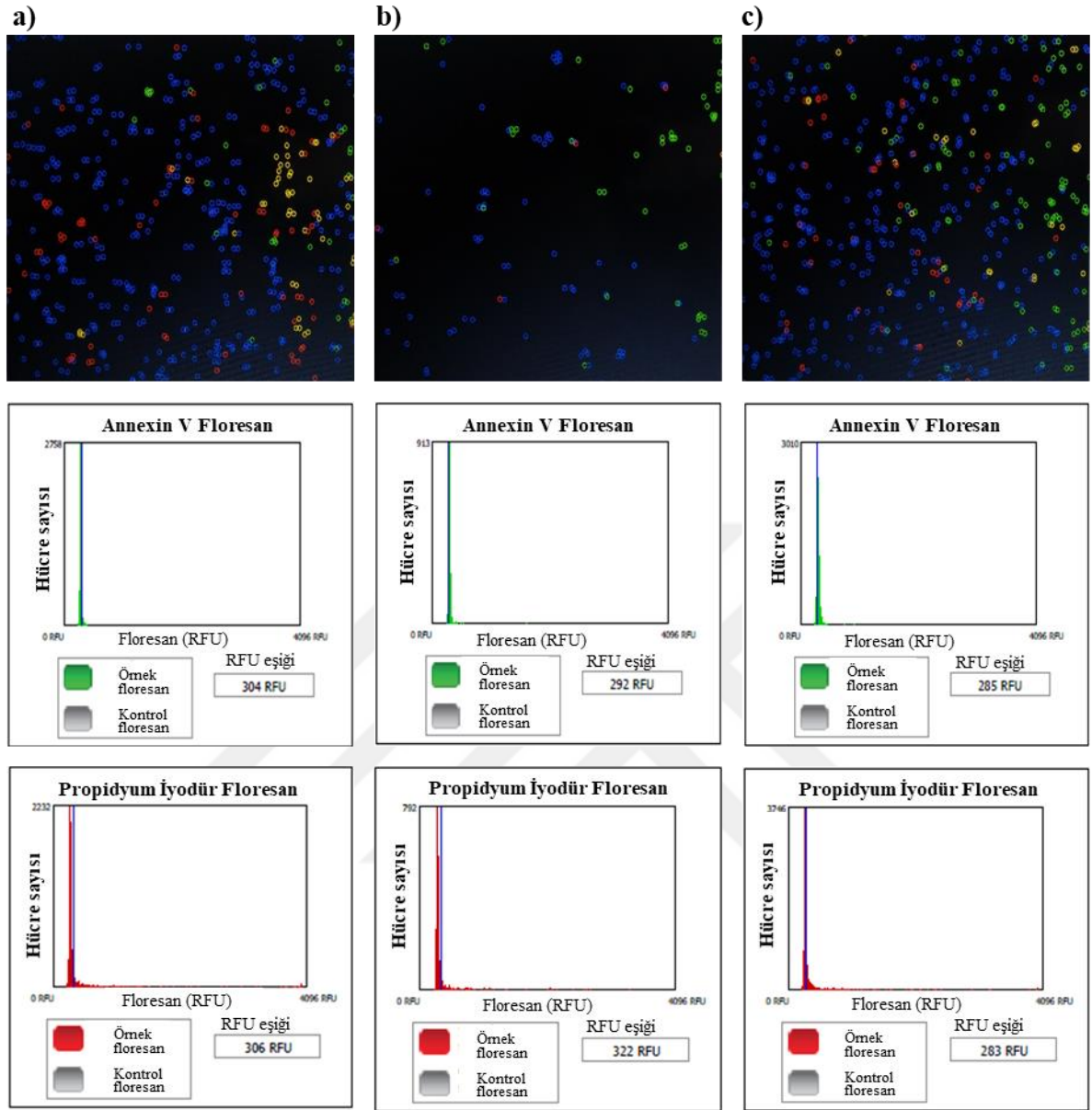


Şekil 69. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. *, kontrole kıyasla $n=3$; T-Test $P_{\text{canlı}} < 0,0001$, $P_{\text{apoptotik}} < 0,0001$

Tablo 22. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri

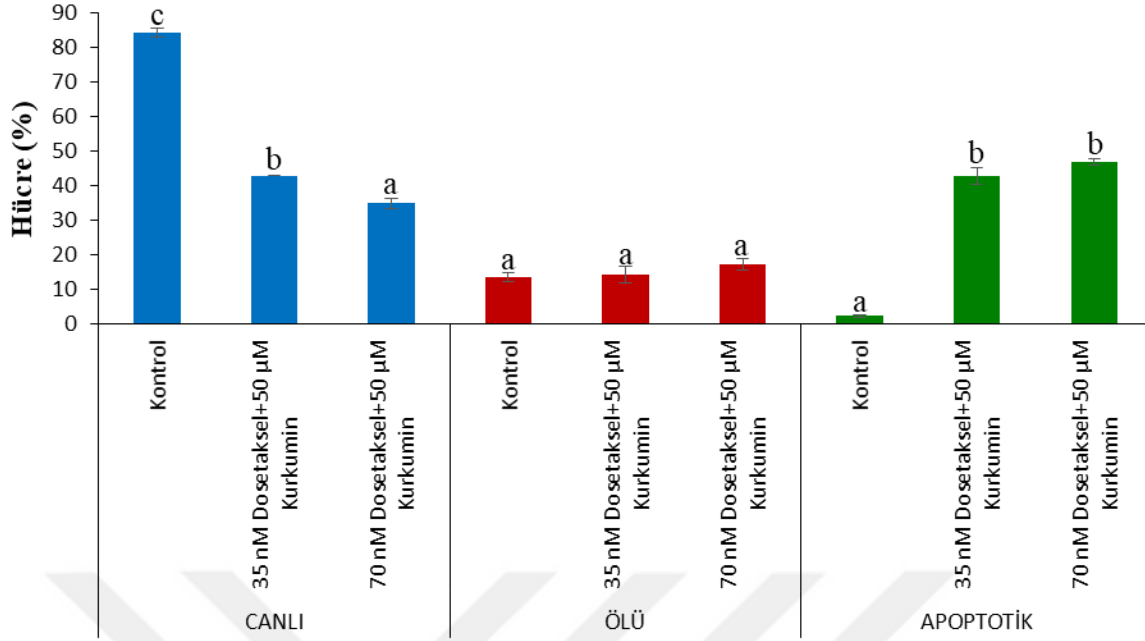
	n	Kontrol	50 µM Kurkumin
Canlı (%)	3	84,33 \pm 1,33	51,33 \pm 2,84
Canlı hücre sayısı	3	8775	9205
Ölü (%)	3	13,66 \pm 1,33	14,33 \pm 4,33
Ölü hücre sayısı	3	1513	3040
Apoptotik (%)	3	2,33 \pm 0,33	34 \pm 2
Apoptotik hücre sayısı	3	222	6068

35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin dozu uygulanan PC-3 prostat kanseri hücre hattına ait, Annexin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları Şekil 70’de verilmiştir.



Şekil 70. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde PC-3 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Doksetaksel + 50 µM Kurkumin c) 70 nM Doksetaksel + 50 µM Kurkumin

Yapılan çalışmada PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 35 nM Doksetaksel + 50 µM Kurkumin de %14,33 oranında ölü hücre %42,66 oranında apoptotik hücre görüldü. Diğer dozumuz olan 70 nM Doksetaksel + 50 µM Kurkumin uygulamasında ise %17,33 oranında ölü ve %47 oranında apoptotik hücre saptandı (Şekil 71 ve Tablo 23).



Şekil 71. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. $n=3$; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$

Tablo 23. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri

	n	Kontrol	35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin	70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin
Canlı (%)	3	84,33 \pm 1,33	43 \pm 0	35 \pm 1,52
Canlı hücre sayısı	3	8775	1336	3368
Ölü (%)	3	13,66 \pm 1,33	14,33 \pm 2,40	17,33 \pm 1,76
Ölü hücre sayısı	3	1513	467	1662
Apoptotik (%)	3	2,33 \pm 0,33	42,66 \pm 2,40	47 \pm 1
Apoptotik hücre sayısı	3	222	1307	4411

Yapılan çalışmada 48 saat süreyle PC3 prostat kanseri hücre hattına uygulanan dozların hücreler üzerinde ölüme neden olduğu, ölümün büyük çoğunluğunun ise apoptozdan kaynaklandığı görüldü. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 35 nM Dosetaksel ve 70 nM Dosetaksel dozlarının apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı bulundu ($F_{48 \text{ Saat}} = 30,353$; $sd=2-8$; $p=0,001$). Benzer şekilde 50 µM

Kurkumin kontrole kıyasla etkili bir apoptotik etki oluşturdu ($F_{48 \text{ Saat}} = 243,919$; $sd=1-5$; $p<0,0001$). Annexin V: PI boyama kombinasyon dozlarımız olan 35 nM Dosetaksel + 50 μ M Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel + 50 μ M Kurkumin uygulamaları güçlü bir yeşil sinyal oluşturdu ve PC3 hücrelerinde kontrole kıyasla apoptoz miktarını istatistik olarak anlamlı seviyede arttırdı ($F_{48 \text{ Saat}} = 264, 242$; $sd=2-8$; $p<0,0001$).

Yapılan tali, analiz sonucunda, hücreleri apoptoza götüren en etkili dozun 70 nM Dosetaksel + 50 μ M Kurkumin kombinasyon dozu olarak belirlendi. Bunu sırasıyla 35 nM Dosetaksel + 50 μ M Kurkumin kombinasyon dozu, 50 μ M Kurkumin, 70 nM Dosetaksel ve 35 nM Dosetaksel dozu takip etti.

Netice de, doza bağımlı olarak Kurkuminin apoptotik yollarla bağlantılı sinyal moleküllerini hedeflediği ve kemoterapötik bir ajan olan Dosetaksel ile kombine edildiğinde DU 145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatlarında apoptozu arttırdığı görülmüştür.

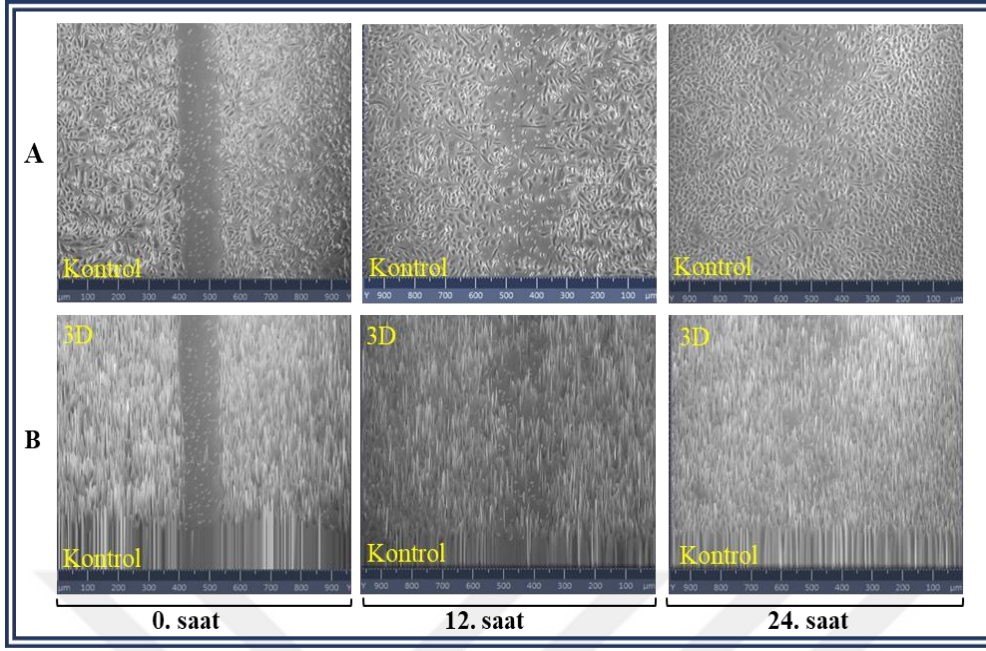
KURKUMİN UYGULAMASININ PROSTAT KANSER HÜCRE SERİLERİNDE ANJİYOGENEZ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Yara İyileştirme Deneyi

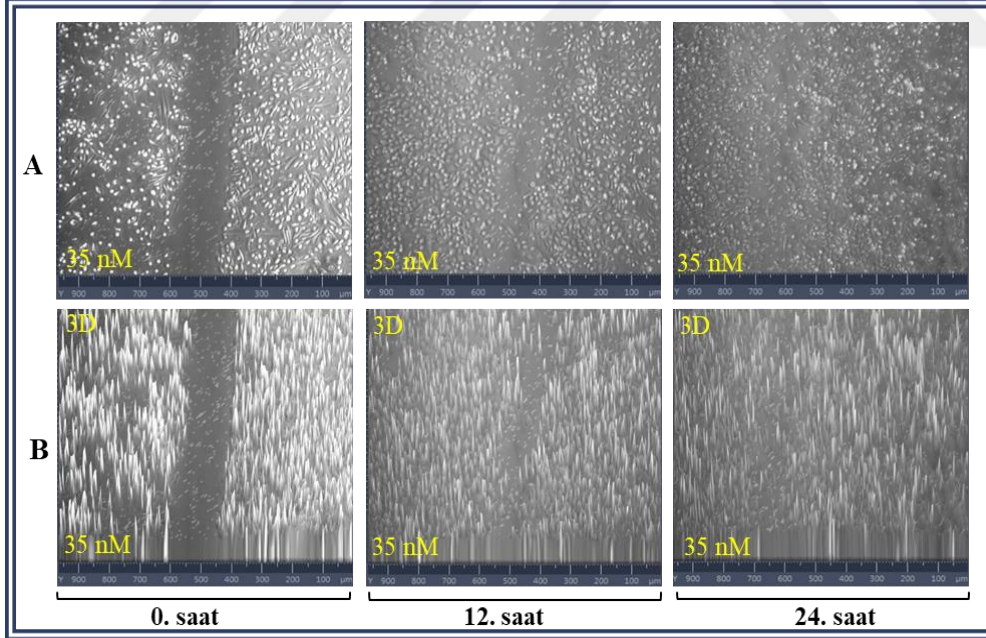
Yara iyileştirme deneyi, yetiştirildikleri kültür flasklarında %80-90 yayılım gösteren tek tabakalı hücreler üzerinde bir yara açılması ve açılan bu yaranın takibi esasına dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu yara üzerinde hücrelerin karşıdaki hücreler ile haberleşebildiği ve hücrelerin karşı yüzeye doğru hareket edebildiği belirlenmiştir. Oluşan bu hareketlilik, hareketli hücre sayısı, hareketin yönü ve harekete geçen hücre miktarı sırasıyla kanser hücrelerinin proliferasyon, anjiogenez, invazyon ve hücre göçü kapasiteleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

Bu sebeple yapılan çalışmada Kurkumin'in anjiogenez üzerine etkisi, standart olarak kabul edilebilen bu yöntem kullanılarak yapılmıştır.

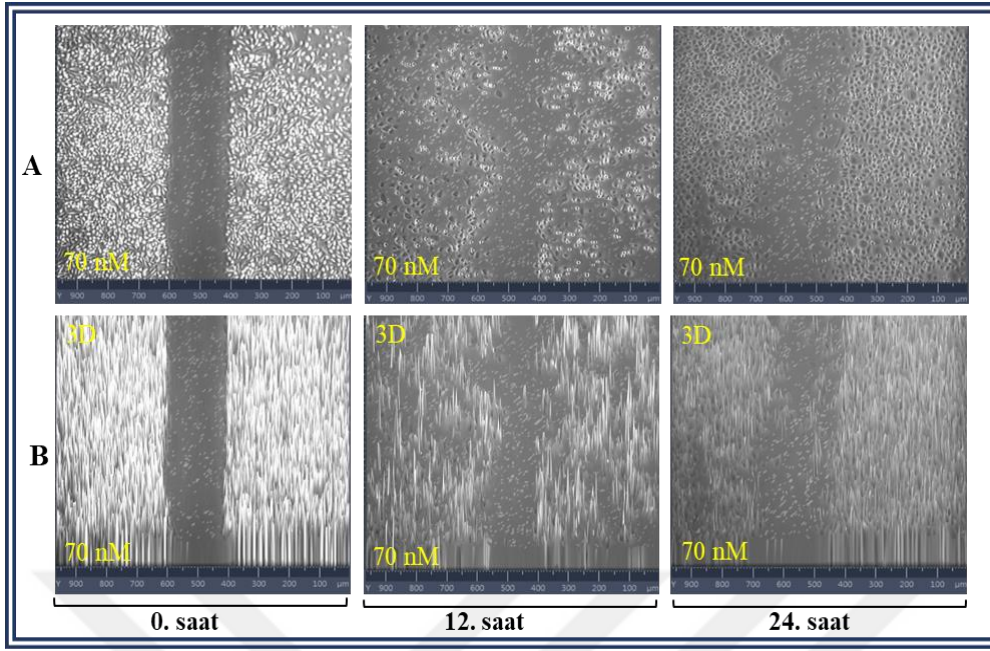
Yapılan çalışmada PC3 hücre hattına ait kontrol, 35 nM Dosetaksel, 70 nM Dosetaksel, 50 nM Kurkumin, 35 nM Dosetaksel+50 nM Kurkumin, 70 nM Dosetaksel+50 nM Kurkumin uygulamaları sonrası deney sonuçları Şekil 72-77'de verilmiştir.



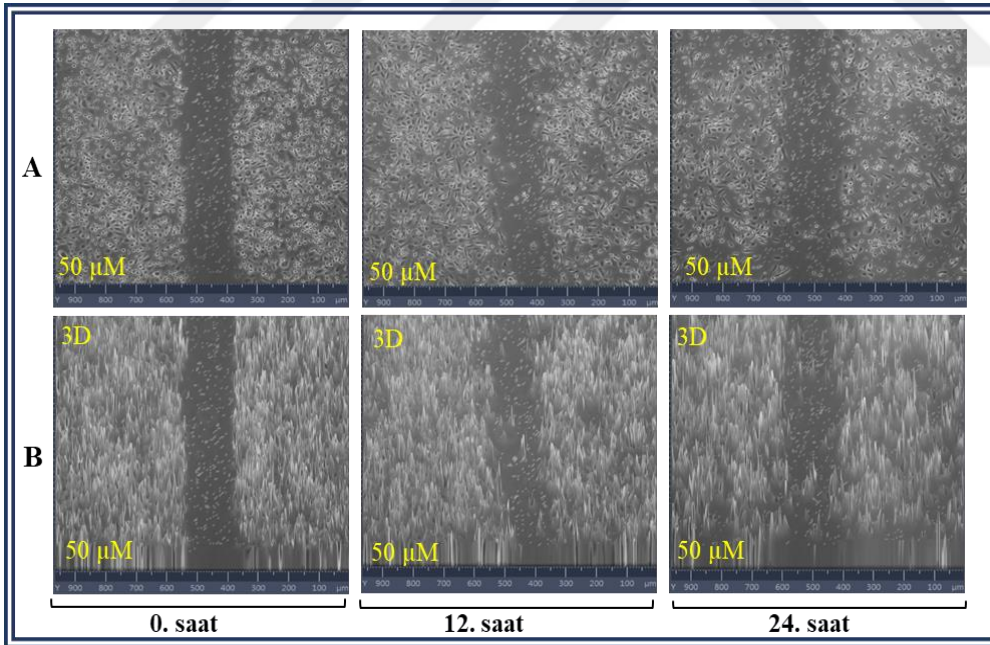
Şekil 72. Yara iyileştirme deneyinde PC3 prostat kanseri hücre hattına ait taşıt madde uygulanan grubun 0.-12. ve 24. saatlerde hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



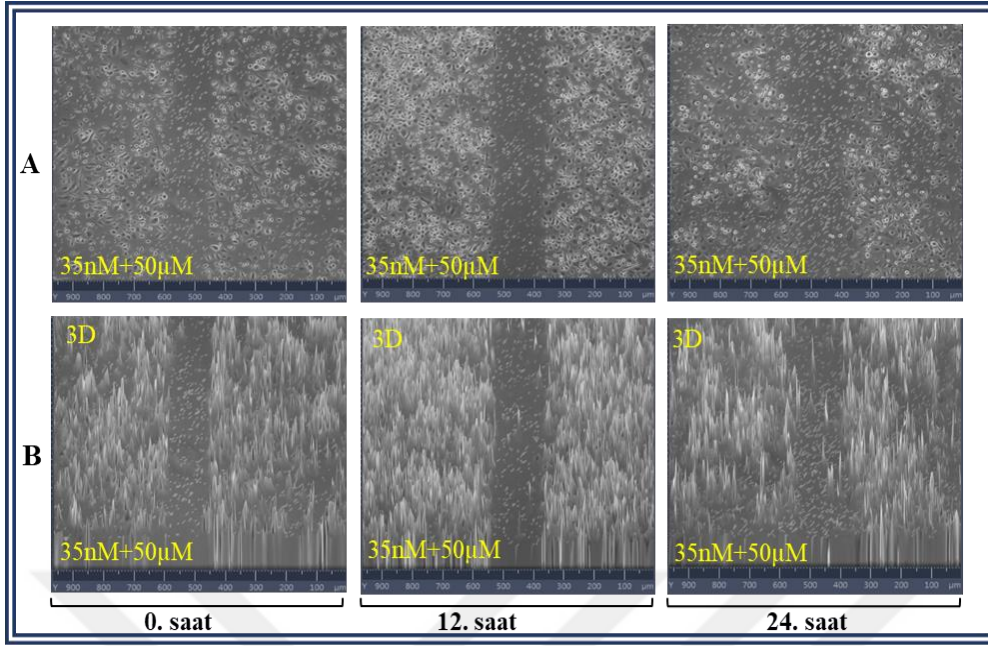
Şekil 73. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 35 nM Doksetaksel uygulaması yapılan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



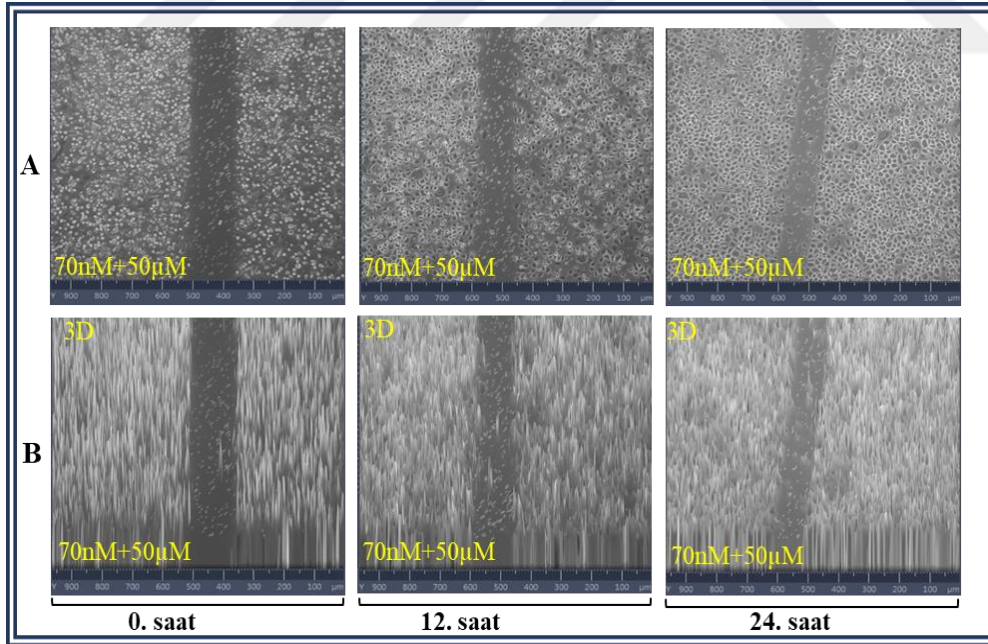
Şekil 74. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Doksetaksel uygulaması yapılan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



Şekil 75. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 50 µM Kurkumin uygulaması yapılan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu

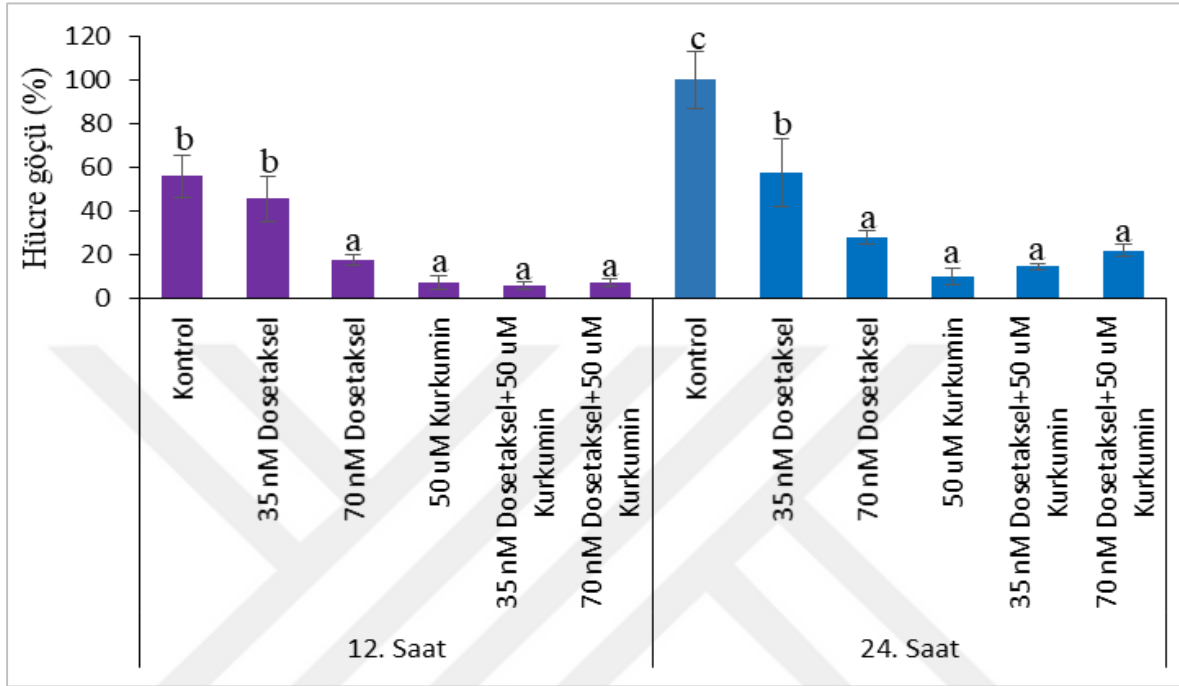


Şekil 76. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 35 nM Dosetaksel+50 μM Kurkumin kombinasyonu uygulanan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



Şekil 77. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Dosetaksel+50 μM Kurkumin kombinasyonu uygulanan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu

Yapılan çalışmada sırasıyla sadece taşıt madde uygulanan kontrol grubunda hücre göçü belirlenmiş, bu hücre göçüne ait değerler % 100 kabul edilerek, uygulama gruplarındaki hücre göçü miktarları kontrole kıyasla saptanmıştır (Şekil 78).



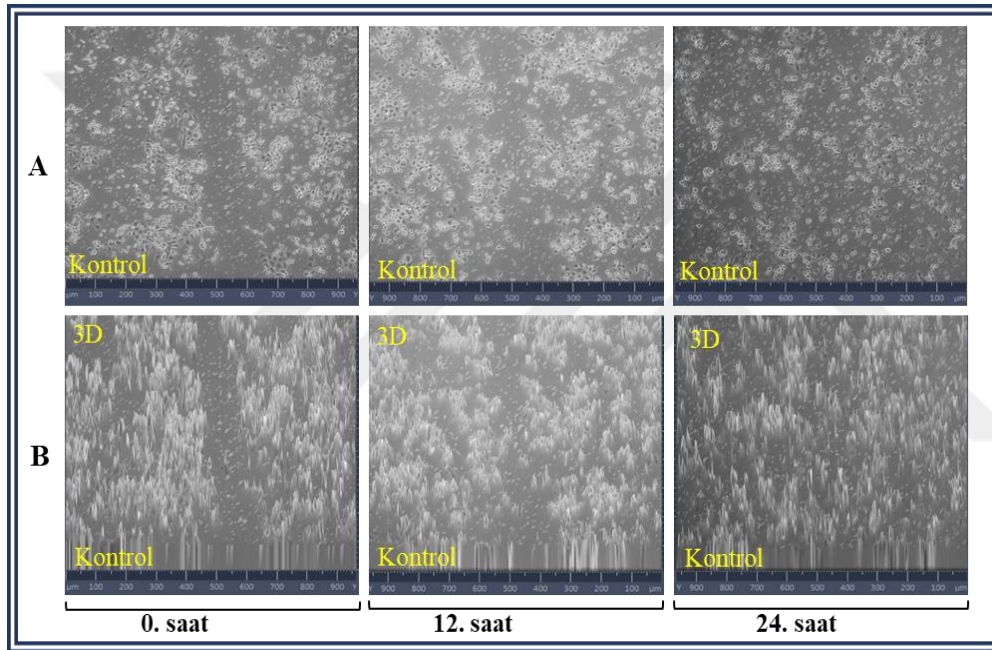
Şekil 78. Yara iyileştirme deneyinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında göç eden hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. N = 3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$

Yapılan çalışmada kontrol grubunda % hücre göçü 12 saat sürelik taşıt madde uygulaması sonrası $55,89 \pm 9,64$ olarak belirlenmiş, bu oran 35 nM Doseksel uygulamasında $45,60 \pm 10,29$ seviyelerine gerilemiş ancak yapılan istatistik analizde kontrol ile aynı grupta yer almış ve aralarında anlamlı bir fark oluşmamıştır ($F_{12\text{saat}} = 13,198$; $sd = 5-17$; $P < 0,0001$). Hücre göçü ancak yüksek doz Doseksel (70 nM) uygulandığında, kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede azalmış ve 12 saat sonrasında $17,65 \pm 2,54$ seviyelerine inmiştir. Aynı gruplarda 24 saatlik uygulama sonrasında % hücre göçü oranı 35 nM ve 70 nM Doseksel grupları için sırasıyla $57,36 \pm 15,28$ ve $27,94 \pm 2,94$ olarak belirlenmiş ve belirlenen bu fark kontrole kıyasla istatistik düzeyde önemli olarak bulunmuştur.

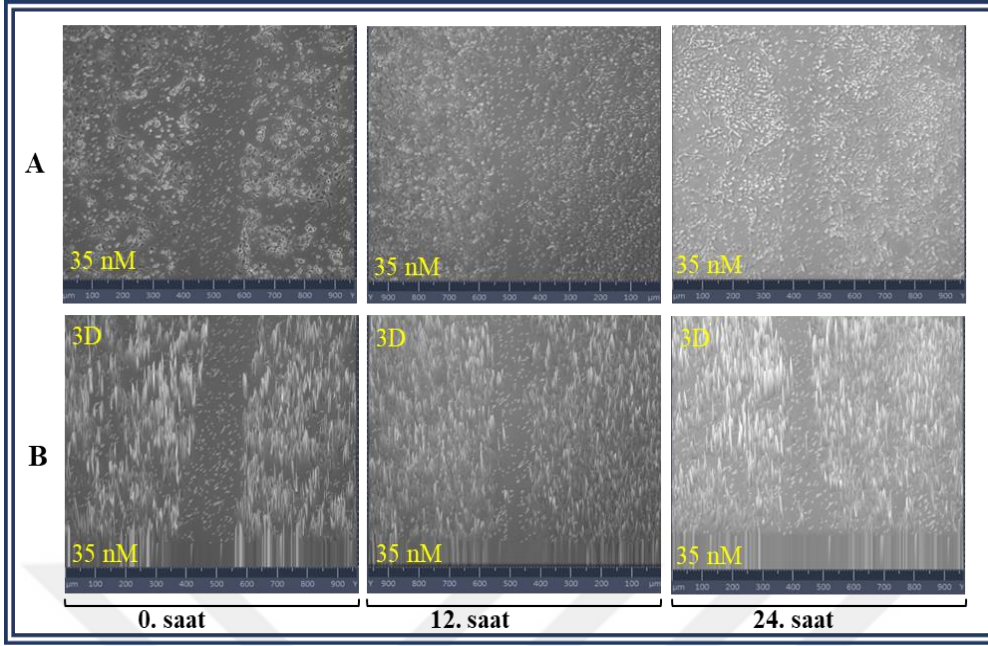
Yapılan çalışmada kurkumin uygulanan gruplarda PC3 kanser hücrelerinde hücre göçü ve anjiyogenez kapasitesi dramatik olarak azalmıştır. Her iki uygulama süresi ve gerek tek başına Kurkumin uygulama grubu (K12-24 saat: $7,35 \pm 2,94$ - $10,29 \pm 3,89$) ve gerekse Kurkumin

ile birlikte kombine 35 nM (12-24 saat: $5,88 \pm 1,47$ - $14,71 \pm 1,47$) ve 70 nM (12-24 saat: $7,35 \pm 1,47$ - $22,06 \pm 2,54$) Dosetaksel uygulama grupları, kontrol grubu ve tek başına Dosetaksel uygulanan gruplara kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede hücre göçünü engellemiştir. Yapılan analizde bu fark istatistik olarak da önemli seviyede bulunmuştur ($F_{24\text{saat}}=16,154$; $sd=5-17$; $P<0.0001$).

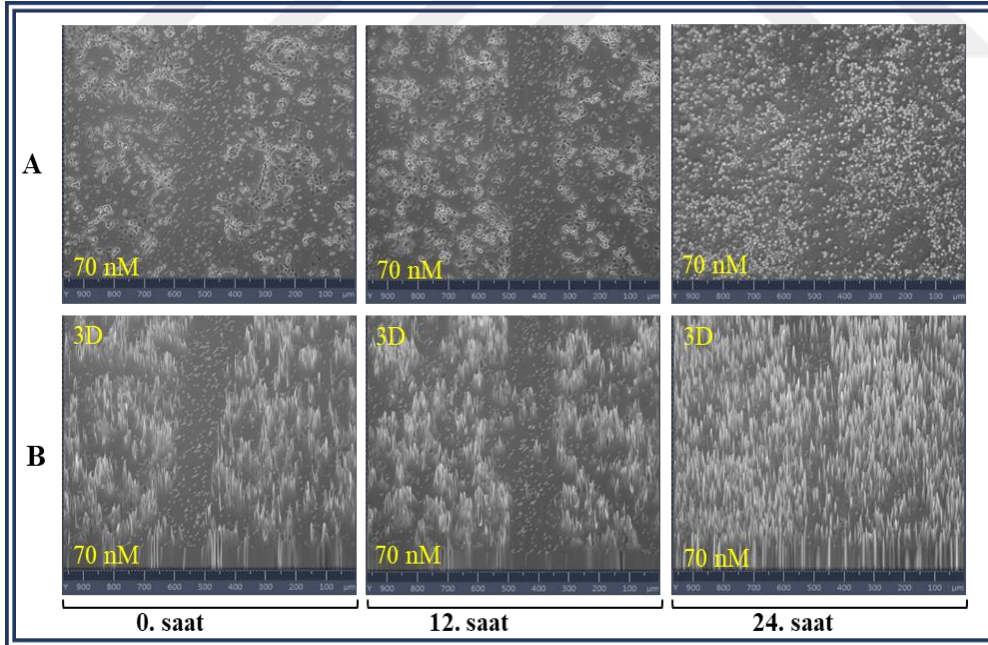
Yapılan çalışmada DU 145 hücre hattına ait kontrol, 35 nM Dosetaksel, 70 nM Dosetaksel, 50 nM Kurkumin, 35 nM Dosetaksel+50 nM Kurkumin, 70 nM Dosetaksel+50 nM Kurkumin uygulamaları sonrası deney sonuçları Şekil 79-84'de verilmiştir.



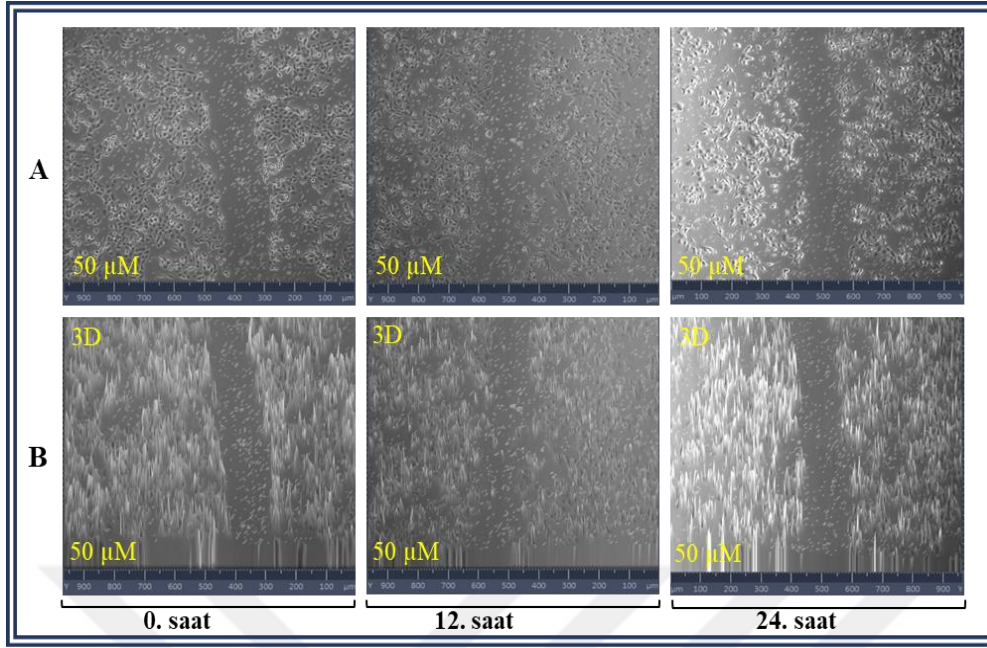
Şekil 79. Yara iyileştirme deneyinde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait taşıt madde uygulanan grubun 0.-12. ve 24. saatlerde hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



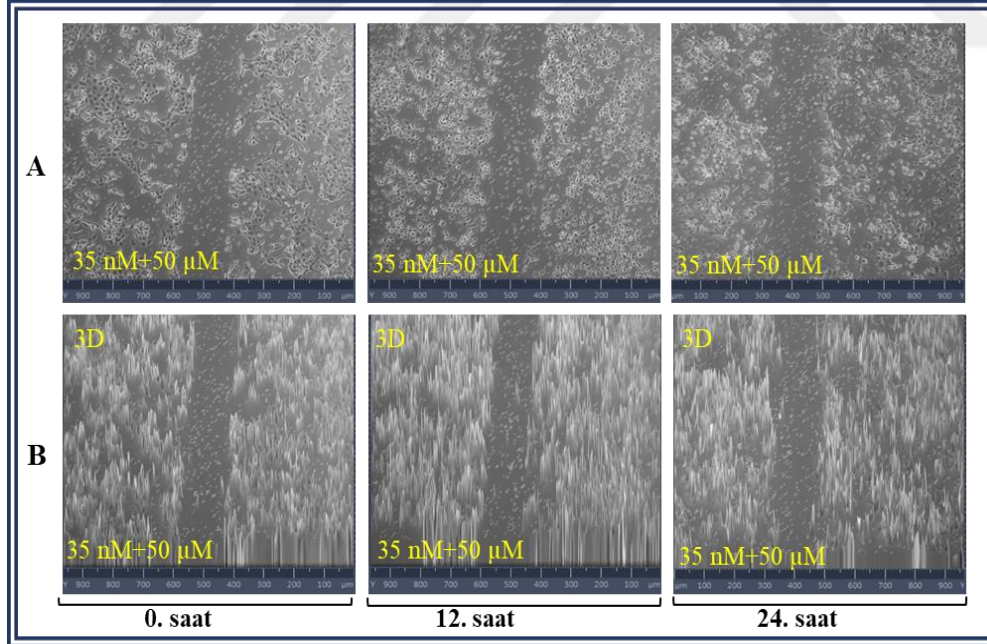
Şekil 80. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 35 nM Doksetaksel uygulaması yapılan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



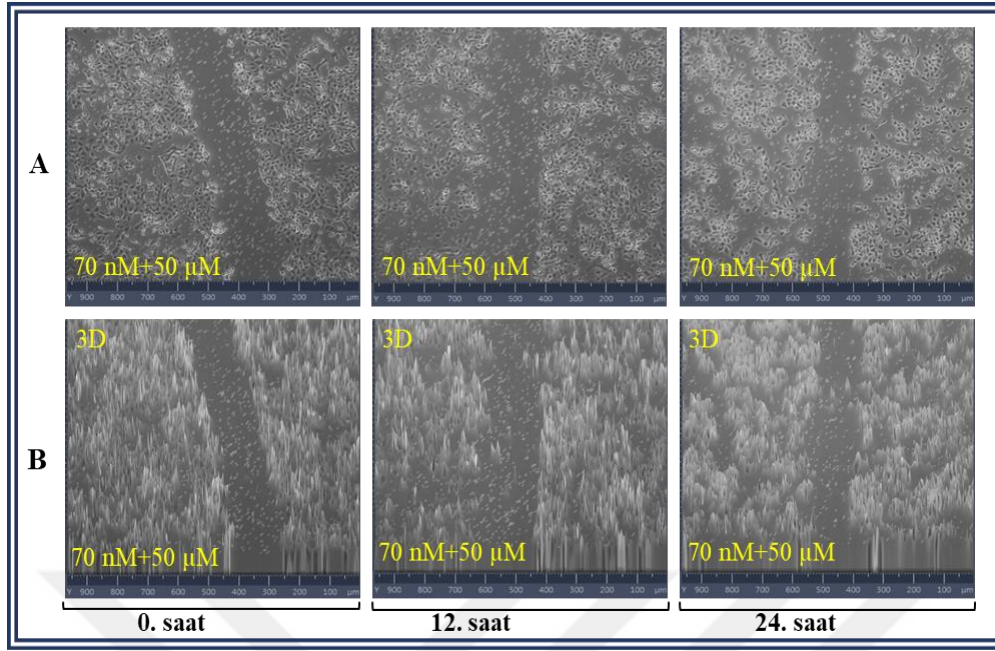
Şekil 81. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Doksetaksel uygulaması yapılan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



Şekil 82. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 50 μM Kurkumin uygulaması yapılan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu

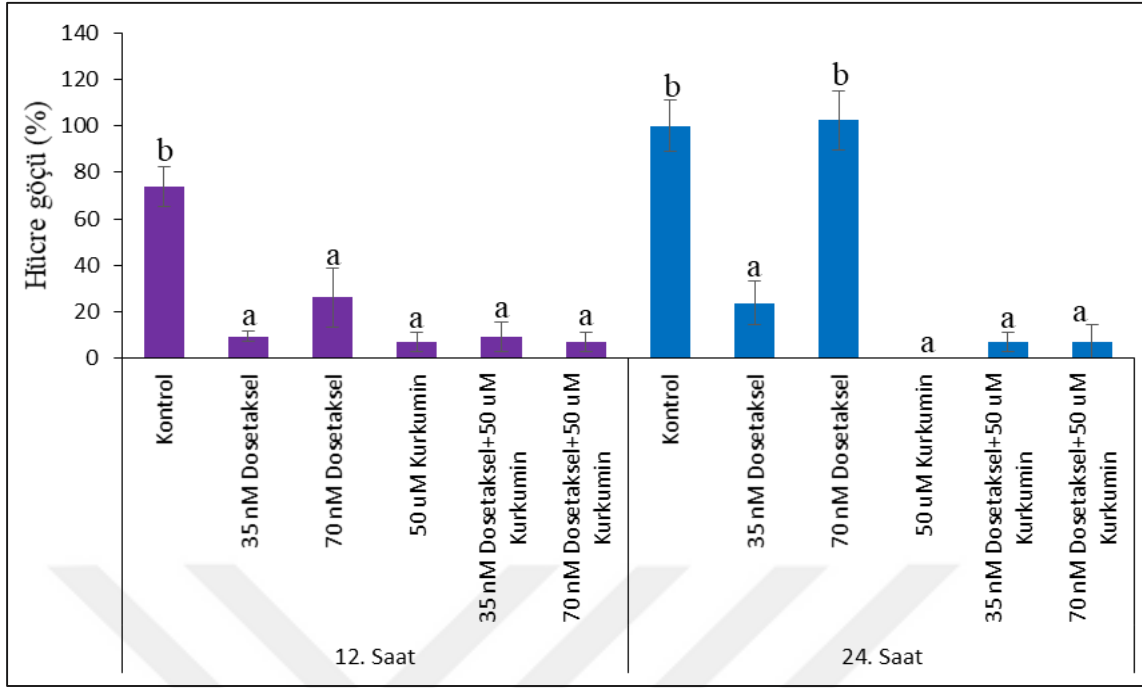


Şekil 83. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 35 nM Dozetaksel+50 μM Kurkumin kombinasyonu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu



Şekil 84. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Dosetaksel+50 μM Kurkumin kombinasyonu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu

Yapılan çalışmada uygulama gruplarındaki hücre göçü miktarları kontrole göre kıyaslanmış ve kontrol grubundaki hücre göçüne ait değerler % 100 kabul edilmiştir (Şekil 85).



Şekil 85. Yara iyileştirme deneyinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında göç eden hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. N = 3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$

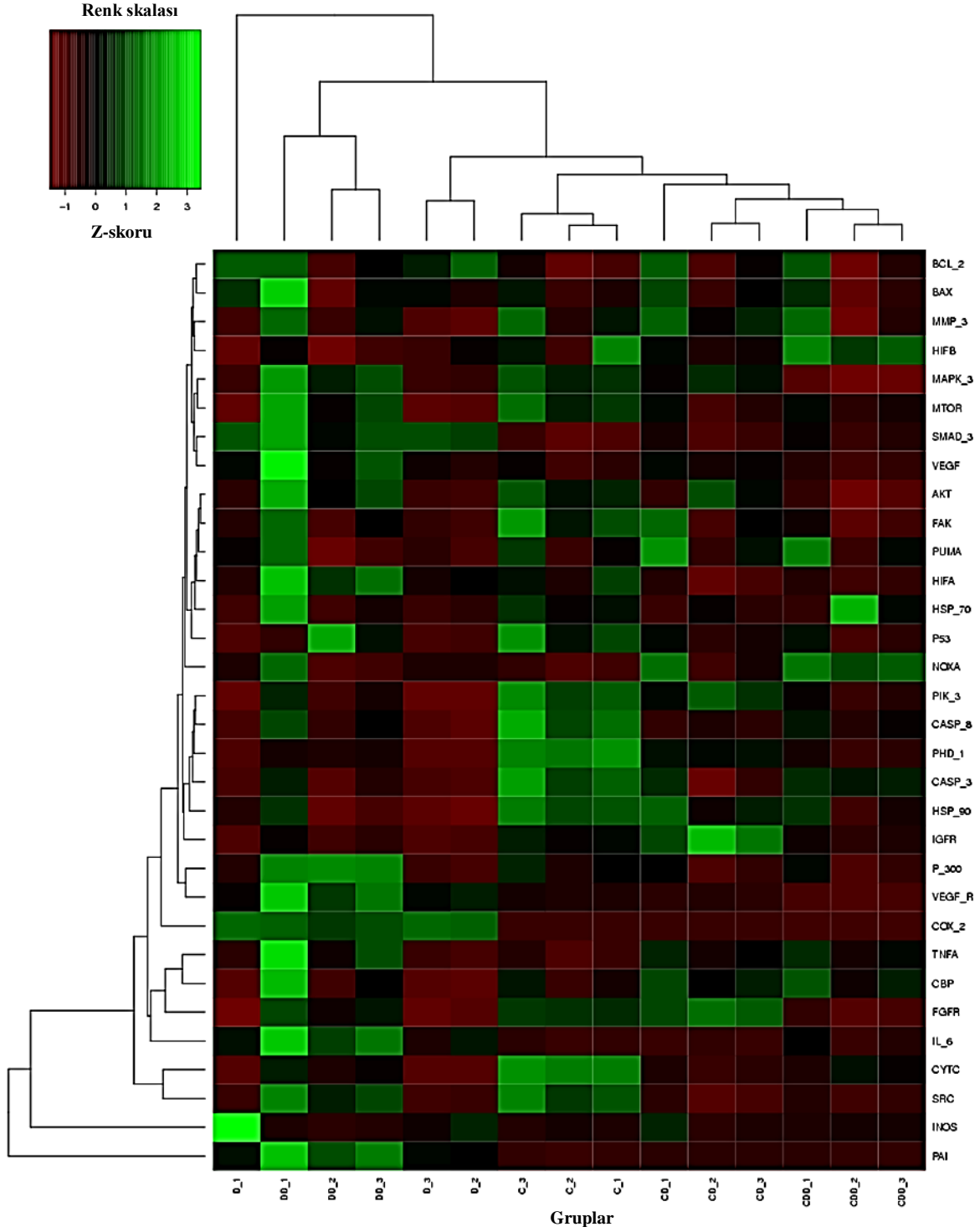
Yapılan çalışmada DU-145 hücre hattında 12 saatlik taşıt madde uygulaması yapılan kontrol grubunda % hücre göçü, $78,80 \pm 8,58$ olarak saptanırken 70 nM Dosectaxel uygulamasında $26,19 \pm 12,59$ seviyelerine gerilemiştir. 50 μ M Kurkumin dozunda ise % hücre göçünde kontrole kıyasla önemli seviyede ($7,14 \pm 4,12$) azalma görülürken, 35 nM ($9,52 \pm 6,29$) ve 70 nM ($7,14 \pm 4,12$) dosetaksel dozlarıyla kombinasyonunda, istatistiksel analizde anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($F_{12\text{Saat}}=13,29$; $sd=5-17$; $P < 0,0001$).

24 saat süreyle 70 nM Dosectaxel uygulaması yapılan grupta % hücre göçünün, kontrole kıyasla $102,38 \pm 12,59$ seviyelerinde arttığı görülmüş ancak istatistiksel analizde kontrol ile aynı grupta yer almıştır. 35 nM Dosectaxel uygulamasında ise % hücre göçünde ($23,80 \pm 9,52$) önemli seviyede azalma belirlenmiştir. 50 μ M Kurkumin uygulamasında kontrole kıyasla % hücre göçünde ($0,00 \pm 0,00$) azalma görülürken, 35 nM ($7,14 \pm 4,12$) ve 70 nM ($7,14 \pm 7,14$) Dosectaxel dozlarıyla kombinasyonunda istatistiksel analizde aynı grupta yer almış ve anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($F_{24\text{Saat}}=31,64$; $sd=5-17$; $P < 0,0001$).

Gen Ekspresyon Analizleri

Çalışma ile, sırasıyla Dasetaksel, Kurkumin ve kombine uygulamalarının PC3 ve DU 145 hücre serilerinde angiyojeniz yolağı üzerindeki hücreler ve moleküler etkileri, tümör içi hipoksi sinyalizasyonu, çekirdek RNA transkripsiyon bağımlı büyüme faktörleri, sitokinler, hücreler arası matriks yeniden programlanma ve EGFR, VEGF ve IGFR bağımlı proliferasyon ve migrasyon sinyalleri araştırıldı. Bu kapsamda, kapsamlı bir transkriptomik bir array oluşturuldu, anjiyojeniz yolağındaki genlerin, gen ekspresyonları belirlendi. Bu genler başlıca bileşen ve hiyerarşik sınıflandırma analizlerine tabi tutularak sıcaklık haritası oluşturuldu. Son olarak her bir gene ait ekspresyon değerleri, relatif kat artış değerleri olarak saptandı ve tüm bu sonuçlar Şekil 86-87 ve Tablo 24-25’de verildi.

Çalışmada öncelikle anjiyojeniz mekanizmasında anahtar rol oynayan hipoksi mekanizması incelendi. PC3 hücre hatlarında HIF-1 α ’nın düzenlenmesinden sorumlu PHD1 ekspresyonu 35 nM Dasetaksel uygulamasında kontrole kıyasla anlamlı seviyede azalmış (0,52 kat), yüksek konsantrasyon Dasetaksel uygulamasında istatistik olarak kontrol grubu ile aynı grupta yer aldı. Tek başına ve 35 nM Dasetaksel ile kombine olarak uygulanan Kurkumin grubunda ise PHD1 ekspresyonu kontrole kıyasla yüksek düzeyde belirlendi. HIF-1 α ve HIF-1 β genleri tüm uygulama gruplarında genellikle kontrol grubu seviyelerinde ya da daha düşük belirlendi, buna bağılı olarak HIF-1 α ile tetiklenen CBP ve P300 relatif ekspresyon seviyeleri 70 nM Dasetaksel uygulaması haricinde benzer bir seyir izledi. Bu iki genin ekspresyonu 70 nM Dasetaksel uygulama grubunda kontrole kıyasla anlamlı seviyede yüksek olarak bulundu. Benzer şekilde IL6 (5,94 kat) ve VEGF (1,31 kat) ekspresyonları yalnız bu uygulama grubunda kontrole göre istatistik olarak anlamlı seviyede yüksek olarak belirlendi (Şekil 86 ve Tablo 24). HIF-1 α ile indüklenen hipoksi yolağında, HIF-1 α +HIF-1 β + CBP+P300 kompleksi çekirdek DNA’sı üzerinde birleşerek aktif olduğunda, hipoksi ilişkili elementler olarak belirlenen bir grup proteinin ifadesini artırmaktadır. Bu yolla indüklenen COX2, SMAD 3 ve PAI genleri özellikle her iki konsantrasyonda Dasetaksel uygulaması yapılan gruplarda kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede yükseldi, Kurkumin ve Kurkumin ile kombine olan dasetaksel gruplarında ise önemli bir fark bulunmadı. Yapılan ilaç uygulamalarında tüm uygulama gruplarında PI3K/AKT/MTOR sinyalizasyonu genellikle kontrol seviyelerine kıyasla düşüş gösterirken, yalnız 70 nM Dasetaksel ve tek başına Kurkumin uygulamasında istatistik olarak önemli seviyede bir artış belirlendi.



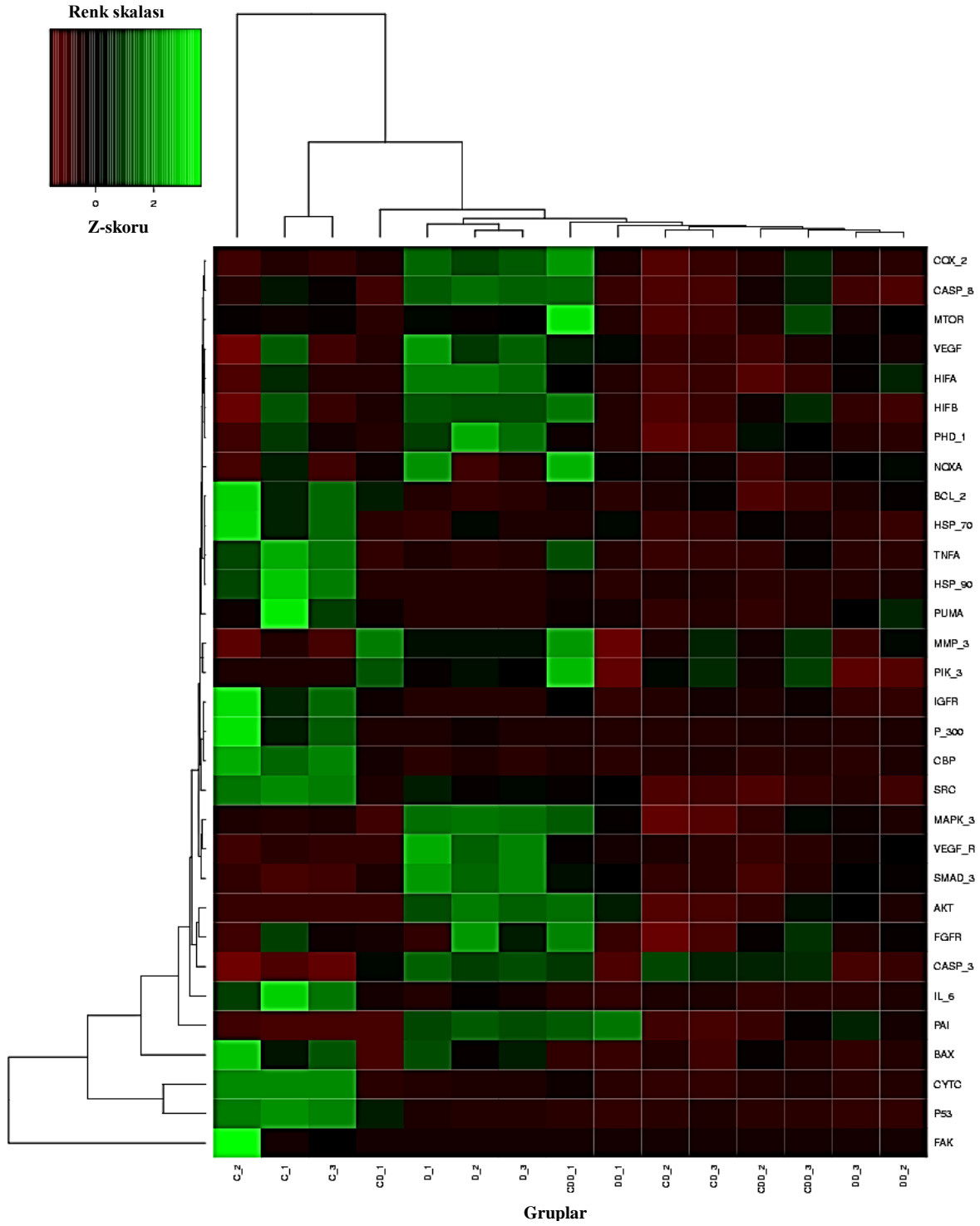
Şekil 86. PC 3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Doksetsel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri kullanılarak oluşturulan ekspresyon skorlarına ait başlıca bileşen analizi, hiyerarşik sınıflandırma analizi ve sıcaklık haritası. Gruplar D: 35 nM Doksetsel, DD:70 nM Doksetsel, C: 50 µM Kurkumin, CD:35 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin, CDD: 70 nM Doksetsel + 50 µM Kurkumin

Tablo 24. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Dosetaksel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri

Gen Adı	Kontrol	35 nM Dosetaksel	70 nM Dosetaksel	50 µm Kurkumin	35 nM Dosetaksel + 50 µm Kurkumin	70 nM Dosetaksel + 50 µm Kurkumin	P değeri
ANJİYOGENEZ GENLERİ							
PHD1	1,04 ± 0,21	0,52 ± 0,01 ↓	1,09 ± 0,01 →	2,63 ± 0,07 ↑	1,41 ± 0,02 ↑	0,94 ± 0,09 →	< 0,0001
HIF-α	1,02 ± 0,16	0,44 ± 0,04 ↓	0,99 ± 0,17 →	0,58 ± 0,10 ↓	0,24 ± 0,07 ↓	0,32 ± 0,03 ↓	0,001
HIF-β	1,03 ± 0,18	0,90 ± 0,08 ↓	0,88 ± 0,09 ↓	1,19 ± 0,19 →	1,04 ± 0,03 →	1,41 ± 0,07 ↑	0,093
CBP	1,00 ± 0,03	0,35 ± 0,03 ↓	3,07 ± 1,62 ↑	1,76 ± 0,49 →	2,87 ± 0,44 →	2,84 ± 0,59 →	0,12
P300	1,39 ± 0,73	0,79 ± 0,10 →	2,94 ± 0,02 ↑	1,42 ± 0,19 →	0,94 ± 0,24 →	0,93 ± 0,27 →	0,009
IL-6	1,03 ± 0,19	2,22 ± 0,42 →	5,94 ± 1,15 ↑	0,73 ± 0,08 →	0,63 ± 0,02 →	1,35 ± 0,45 →	< 0,0001
VEGF	1,01 ± 0,11	0,70 ± 0,05 ↓	1,31 ± 0,37 ↑	0,59 ± 0,08 ↓	0,74 ± 0,03 ↓	0,52 ± 0,03 ↓	0,049
VEGFR	1,00 ± 0,06	1,11 ± 0,10 →	2,47 ± 0,48 ↑	0,72 ± 0,03 ↓	0,55 ± 0,01 ↓	0,18 ± 0,02 ↓	< 0,0001
FGFR	1,00 ± 0,79	1,10 ± 0,12 →	2,91 ± 0,32 ↑	3,24 ± 0,06 ↑	3,84 ± 0,18 ↑	1,50 ± 0,14 →	< 0,0001
IGFR	1,01 ± 0,11	0,29 ± 0,00 ↓	0,61 ± 0,14 ↓	1,05 ± 0,09 →	2,09 ± 0,31 ↑	0,71 ± 0,06 ↓	< 0,0001
SRC	1,30 ± 0,63	1,11 ± 0,05 →	4,34 ± 0,71 ↑	4,68 ± 0,51 ↑	0,94 ± 0,25 →	1,33 ± 0,20 →	< 0,0001
INOS	2,87 ± 2,32	10,82 ± 6,61 ↑	0,60 ± 0,33 ↓	1,14 ± 0,25 →	2,39 ± 1,81 →	1,49 ± 0,14 →	0,22
FAK	1,00 ± 0,01	0,33 ± 0,02 ↓	0,50 ± 0,13 ↓	0,69 ± 0,10 ↓	0,49 ± 0,13 ↓	0,31 ± 0,06 ↓	0,002
SMAD3	1,00 ± 0,08	1,29 ± 0,02 ↑	1,34 ± 0,23 ↑	0,57 ± 0,05 ↓	0,68 ± 0,07 ↓	0,77 ± 0,06 ↓	0,001
COX-2	1,01 ± 0,12	3,24 ± 0,01 ↑	2,74 ± 0,26 ↑	0,14 ± 0,00 ↓	0,12 ± 0,00 ↓	0,08 ± 0,00 ↓	< 0,0001
PAI-1	1,02 ± 0,14	5,80 ± 0,28 ↑	16,24 ± 2,76 ↑	0,94 ± 0,09 →	1,75 ± 0,12 →	1,32 ± 0,13 →	< 0,0001
MMP3	1,00 ± 0,05	0,67 ± 0,03 →	1,21 ± 0,25 →	1,27 ± 0,21 →	1,32 ± 0,16 →	1,02 ± 0,34 →	0,322
PI3K	1,02 ± 0,15	0,56 ± 0,00 ↓	1,17 ± 0,21 ↑	2,01 ± 0,16 ↑	1,67 ± 0,17 ↑	1,05 ± 0,09 ↑	< 0,0001
AKT	1,00 ± 0,08	0,41 ± 0,01 ↓	0,67 ± 0,10 ↓	0,60 ± 0,04 ↓	0,54 ± 0,07 ↓	0,35 ± 0,03 ↓	< 0,0001
MAPK3	1,00 ± 0,06	0,59 ± 0,01 ↓	1,36 ± 0,20 ↑	1,18 ± 0,08 ↑	0,98 ± 0,07 →	0,33 ± 0,04 ↓	< 0,0001
MTOR	1,00 ± 0,07	0,46 ± 0,01 ↓	1,16 ± 0,21 ↑	1,11 ± 0,10 →	0,71 ± 0,08 ↓	0,76 ± 0,05 ↓	0,006
APOPTOZ GENLERİ							
P53	1,12 ± 0,37	0,15 ± 0,02 ↓	0,84 ± 0,38 ↓	1,04 ± 0,22 →	0,47 ± 0,08 ↓	0,38 ± 0,14 ↓	0,092
BCL-2	1,01 ± 0,11	1,58 ± 0,11 ↑	1,21 ± 0,26 →	0,82 ± 0,11 ↓	1,19 ± 0,27 →	1,06 ± 0,32 →	0,303
Cyt-C	1,03 ± 0,20	1,39 ± 0,00 →	3,32 ± 0,40 →	6,62 ± 0,17 ↑	2,44 ± 0,19 ↑	3,22 ± 0,28 ↑	< 0,0001
Kaspaz 3	1,00 ± 0,08	0,90 ± 0,00 →	1,22 ± 0,24 ↑	2,23 ± 0,20 ↑	1,18 ± 0,30 ↑	1,67 ± 0,04 ↑	0,002
BAX	1,07 ± 0,27	1,06 ± 0,11 →	1,22 ± 0,43 →	0,93 ± 0,11 →	1,05 ± 0,17 →	0,87 ± 0,19 →	0,931
TNF-α	1,01 ± 0,10	1,46 ± 0,13 →	4,26 ± 1,26 ↑	1,52 ± 0,23 →	2,62 ± 0,32 ↑	2,75 ± 0,32 ↑	0,015
Kaspaz 8	1,01 ± 0,11	0,66 ± 0,03 ↓	1,24 ± 0,23 ↑	2,00 ± 0,20 ↑	0,93 ± 0,05 →	1,13 ± 0,10 →	0,001
PUMA	1,03 ± 0,18	0,25 ± 0,05 ↓	0,32 ± 0,20 ↓	0,38 ± 0,09 ↓	0,50 ± 0,18 ↓	0,46 ± 0,17 ↓	0,052
NOXA	1,00 ± 0,09	0,44 ± 0,01 ↓	0,57 ± 0,50 →	0,15 ± 0,07 ↓	0,77 ± 0,46 →	1,50 ± 0,11 ↑	0,074
ISI ŞOK PROTEİNLERİ							
HSP70	1,29 ± 0,61	0,06 ± 0,01 ↓	0,28 ± 0,19 ↓	0,26 ± 0,04 ↓	0,11 ± 0,04 ↓	0,34 ± 0,19 ↓	0,074
HSP90	1,08 ± 0,30	0,29 ± 0,17 ↓	0,57 ± 0,36 →	1,65 ± 0,13 ↑	1,20 ± 0,26 →	0,81 ± 0,24 →	0,035
PC3 HÜCRE SERİSİ İSTATİSTİKSEL OLARAK ↑ARTAN ↓AZALAN →STABİL (İSTATİSTİK OLARAK FARK YOK)							

Yapılan çalışmada PC3 hücre hatlarında 35 nM Doseksel uygulamasının apoptoz ve Isı şok ailesi gen ekspresyonları üzerinde yalnız Bcl-2 ekspresyonunda bir artış oluşturduğu, Kaspaz 8 ve Puma ve Noxa gen ekspresyonlarını ise istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığı görüldü. Tüm uygulama gruplarında özellikle Cyt-C, Kaspaz 3 gen ekspresyonlarının kontrole kıyasla anlamlı bir seviyede arttığı, apoptoz mekanizmasının son ürünlerindeki bu artışın hücrelerde tek başına Kurkumin uygulama grubunda ve Kurkumin ile kombine edilerek uygulanan her iki Doseksel uygulamasında güçlü bir apoptoz sinyali oluşturduğu gözlemlendi. Çalışmada yapılan ısı haritası analizinde belirgin bir x aksisi farklılığı oluştu. Özellikle kombine uygulamalar ve tek başına Kurkumin uygulanan gruplar belirgin olarak kendi içlerinde kluster oluştururken, Doseksel uygulama grupları belirgin olarak kendi klusterına dahil oldu ve bu iki ana grup da yapılan hiyerarşik sınıflandırmada birbirinden net olarak ayrıldı.

Çalışmada DU 145 hücre hattı yapılan ilaç uygulamalarında, PC3 hücre hattından daha farklı bir yanıt oluşturdu. DU 145 hücre hatlarında 48 saat süreyle uygulanan 35 nM Doseksel, CBP (0,19 kat) ve P300 (0,42 kat) gen ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşürdü. Aynı doz uygulamasında IL-6, IGFR, FAK ve MTOR gen ekspresyonları kontrole aynı grupta yer aldı, bunun haricinde çalışılan anjiyogenez, hipoksi ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezinden sorumlu gen ekspresyonlarının tümü kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttı (Şekil 87 ve Tablo 25). Benzer durum tek başına Kurkumin uygulamasında gözlemlendi, ancak 70 nM Doseksel ve Doseksel + Kurkumin uygulamalarında diğer uygulamalardan farklı olarak özellikle hipoksi faktör genleri ve hipoksi ile tetiklenen hücre arası matriks gen ekspresyonlarında istatistik düzeyde anlamlı bir değişim göstermedi. Bununla birlikte PI3K/AKT/MTOR yolu ile birlikte özellikle endotel hücre anjiyogenezinden sorumlu PAI-1 ve MMP3 tüm uygulama gruplarında istatistiksel düzeyde anlamlı seviyede ifade oldu. DU 145 hücre hatlarında PC3 hücrelerinden farklı olarak güçlü bir mitokondriyal apoptoz sinyali belirlendi. 70 nM Doseksel uygulaması hariç tüm uygulama gruplarında P53 overekspresyonu tespit edildi, bununla birlikte düşen Bcl-2 gen ekspresyonu, tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış gösteren Cyt-C ve Kaspaz 3 gen ekspresyonları, DU 145 hücre serisinde güçlü bir apoptoz sinyali olduğunu gösterdi. Bununla birlikte yapılan analizde özellikle dışsal apoptoz yolunun kullanılan ilaçlar, dozlar ve 48 saatlik uygulama süresinde aktif olmadığı gözlemlendi. Yapılan ısı haritası analizinde Kurkumin ve 35 nM Doseksel uygulaması, kendi içlerinde ayrı bir hiyerarşik yerleşim gösterdi ve diğer tüm uygulama gruplarından net bir şekilde ayrıldı (Şekil 87).



Şekil 87. DU 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Dosetaksel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri kullanılarak oluşturulan ekspresyon skorlarına ait başlıca bileşen analizi, hiyerarşik sınıflandırma analizi ve sıcaklık haritası. Gruplar D: 35 nM Dosetaksel, DD:70 nM Dosetaksel, C: 50 µM Kurkumin, CD:35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin, CDD: 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin

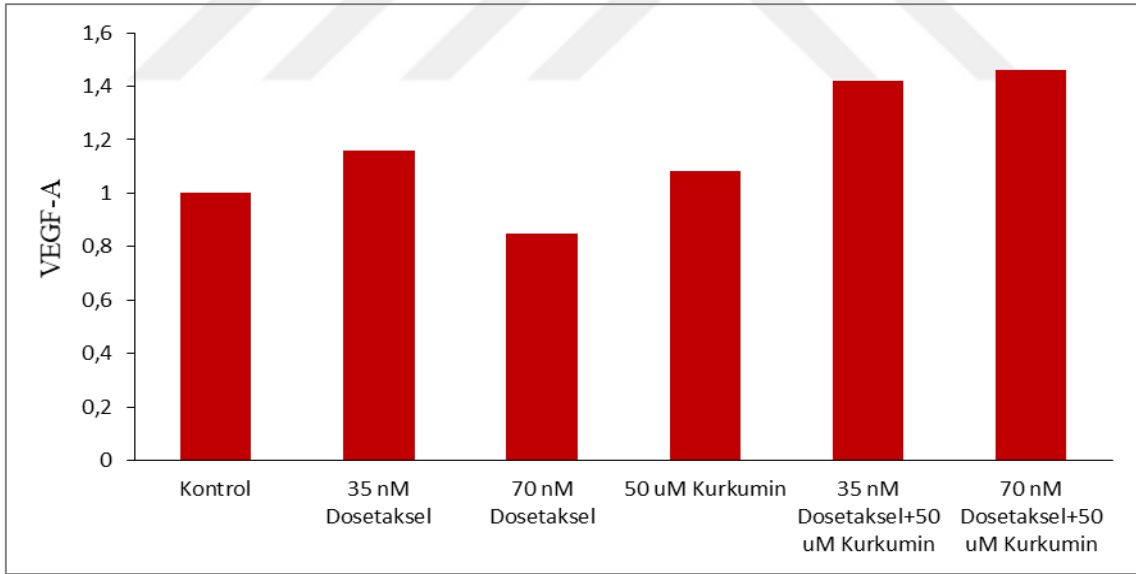
Tablo 25. Du-145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Doksetsel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri

Gen Adı	Kontrol	35 nM Doksetsel		70 nM Doksetsel		50 µm Kurkumin		35 nM Doksetsel + 50 µm Kurkumin		70 nM Doksetsel + 50 µm Kurkumin		P değeri
ANJİYOGENEZ GENLERİ												
PHD1	1,05 ± 0,23	1,85 ± 0,25	↑	0,63 ± 0,02	→	0,85 ± 0,28	→	0,41 ± 0,13	→	0,93 ± 0,06	→	0,004
HIF-α	1,00 ± 0,07	2,15 ± 0,05	↑	1,14 ± 0,15	→	0,97 ± 0,26	→	0,72 ± 0,07	→	0,77 ± 0,20	→	<0,0001
HIF-β	1,03 ± 0,18	1,49 ± 0,02	↑	0,63 ± 0,05	→	0,77 ± 0,38	→	0,57 ± 0,09	↓	1,29 ± 0,26	→	0,049
CBP	1,04 ± 0,21	0,19 ± 0,08	↓	0,16 ± 0,09	↓	4,60 ± 0,50	↑	0,42 ± 0,07	↓	0,28 ± 0,09	↓	<0,0001
P300	2,40 ± 1,83	0,42 ± 0,13	↓	0,16 ± 0,03	↓	4,35 ± 1,71	↑	0,17 ± 0,01	↓	0,24 ± 0,00	↓	0,065
IL-6	1,21 ± 0,51	2,58 ± 0,47	→	1,45 ± 0,36	→	13,22 ± 3,03	↑	2,29 ± 0,10	→	1,11 ± 0,13	→	<0,0001
VEGF	1,04 ± 0,22	2,40 ± 0,27	↑	1,28 ± 0,07	→	1,06 ± 0,63	→	0,89 ± 0,04	→	1,12 ± 0,27	→	0,053
VEGFR	1,01 ± 0,14	5,53 ± 0,60	↑	1,74 ± 0,11	→	0,70 ± 0,16	→	1,02 ± 0,15	→	1,16 ± 0,40	→	<0,0001
FGFR	1,00 ± 0,09	6,05 ± 1,56	↑	4,08 ± 0,38	↑	4,75 ± 0,96	↑	3,13 ± 0,68	↑	6,42 ± 1,09	↑	0,014
IGFR	1,07 ± 0,28	0,72 ± 0,02	→	0,34 ± 0,02	→	4,19 ± 1,24	↑	0,98 ± 0,14	→	1,17 ± 0,16	→	0,003
SRC	1,00 ± 0,02	2,79 ± 0,22	↑	1,89 ± 0,40	→	5,29 ± 0,13	↑	1,41 ± 0,30	→	1,66 ± 0,41	→	<0,0001
FAK	1,19 ± 0,48	1,41 ± 0,54	→	1,35 ± 0,35	→	105,21 ± 92,71	→	1,29 ± 0,34	→	2,10 ± 0,71	→	0,345
SMAD3	1,03 ± 0,19	7,73 ± 0,42	↑	3,49 ± 0,05	↑	1,65 ± 0,16	↑	2,31 ± 0,21	↑	2,58 ± 0,76	↑	<0,0001
COX-2	1,02 ± 0,15	3,09 ± 0,13	↑	1,53 ± 0,05	→	1,36 ± 0,09	→	1,28 ± 0,21	→	2,66 ± 0,67	↑	0,002
PAI-1	1,00 ± 0,06	16,96 ± 0,51	↑	13,88 ± 3,38	↑	4,24 ± 0,11	↑	4,36 ± 0,02	↑	10,95 ± 3,79	↑	0,001
MMP3	1,30 ± 0,62	3,23 ± 0,01	↑	2,22 ± 0,49	↑	1,99 ± 0,25	↑	3,75 ± 0,70	↑	3,97 ± 0,80	↑	0,029
PI3K	1,10 ± 0,34	2,19 ± 0,07	↑	1,02 ± 0,05	→	1,80 ± 0,01	↑	2,75 ± 0,27	↑	3,17 ± 0,79	↑	0,008
AKT	1,17 ± 0,44	10,04 ± 0,46	↑	6,22 ± 0,54	↑	4,12 ± 0,00	↑	3,57 ± 0,30	↑	7,27 ± 1,78	↑	<0,0001
MAPK3	1,00 ± 0,06	4,47 ± 0,03	↑	2,44 ± 0,11	↑	2,23 ± 0,02	↑	1,42 ± 0,18	↑	2,94 ± 0,65	↑	<0,0001
MTOR	1,13 ± 0,38	1,41 ± 0,02	→	1,28 ± 0,07	→	1,34 ± 0,02	→	0,93 ± 0,08	↓	2,11 ± 0,60	↑	0,179
APOPTOZ GENLERİ												
P53	1,00 ± 0,06	81,06 ± 11,14	↑	10,91 ± 1,35	→	871,31 ± 25,45	↑	166,81 ± 105,12	↑	36,34 ± 7,72	↑	<0,0001
BCL-2	1,11 ± 0,35	0,22 ± 0,00	↓	0,28 ± 0,03	↓	0,78 ± 0,17	↓	0,36 ± 0,05	↓	0,19 ± 0,05	↓	0,01
Cyt-C	1,00 ± 0,06	135,10 ± 4,89	↑	83,22 ± 16,76	↑	1112,86 ± 6,83	↑	44,16 ± 5,81	↑	169,26 ± 33,14	↑	<0,0001
Kaspaz 3	1,00 ± 0,06	10,02 ± 0,40	↑	4,14 ± 0,24	↑	2,93 ± 0,40	↑	8,36 ± 0,71	↑	8,58 ± 0,28	↑	<0,0001
BAX	2,05 ± 1,47	27,18 ± 6,37	↑	5,89 ± 1,72	→	43,71 ± 13,44	↑	3,80 ± 2,58	→	10,39 ± 3,57	↑	0,003
TNF-α	1,89 ± 1,29	0,08 ± 0,00	↓	0,07 ± 0,00	↓	0,35 ± 0,05	↓	0,05 ± 0,00	↓	0,15 ± 0,06	↓	0,178
Kaspaz 8	1,06 ± 0,25	2,89 ± 0,06	↑	1,14 ± 0,05	→	1,78 ± 0,17	↑	1,08 ± 0,03	→	2,26 ± 0,37	↑	<0,0001
PUMA	1,16 ± 0,44	0,48 ± 0,00	↓	1,31 ± 0,37	→	3,31 ± 1,60	↑	0,55 ± 0,20	↓	0,54 ± 0,22	↓	0,106
NOXA	1,00 ± 0,03	1,31 ± 1,03	→	1,07 ± 0,07	→	0,52 ± 0,48	→	0,83 ± 0,03	→	1,56 ± 1,17	→	0,907
ISI ŞOK PROTEİNLERİ												
HSP70	1,02 ± 0,15	0,22 ± 0,09	↓	0,19 ± 0,10	↓	1,03 ± 0,29	→	0,07 ± 0,01	↓	0,25 ± 0,04	↓	0,001
HSP90	1,00 ± 0,06	0,05 ± 0,00	↓	0,04 ± 0,03	↓	1,26 ± 0,26	→	0,08 ± 0,01	↓	0,07 ± 0,03	↓	<0,0001
DU 145 HÜCRE SERİSİ İSTATİSTİKSEL OLARAK ↑ARTAN ↓AZALAN →STABİL (İSTATİSTİK OLARAK FARK YOK)												

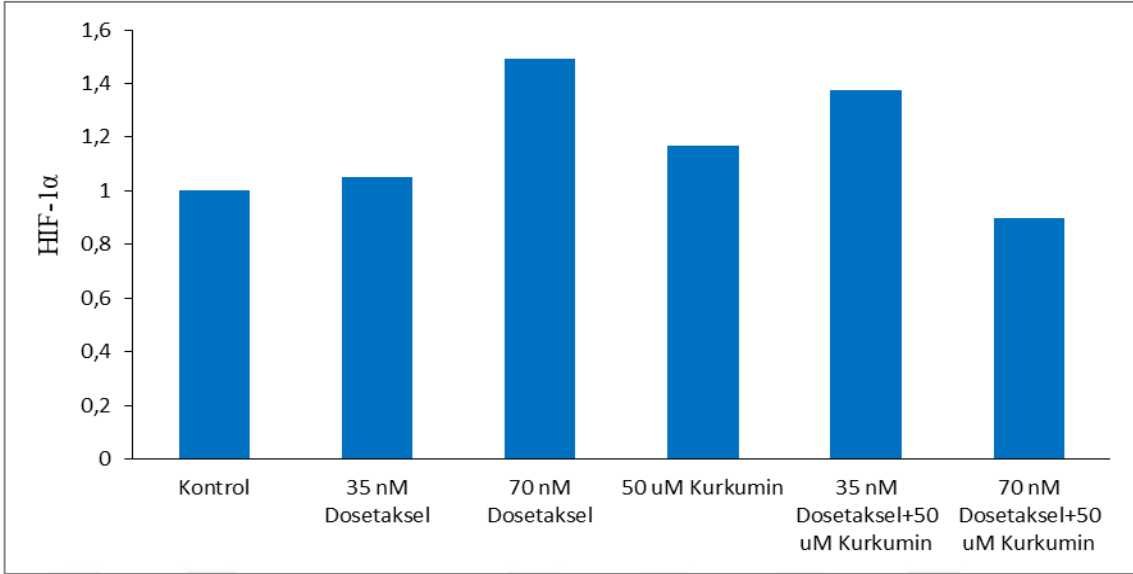
Elisa Analizi

Çalışma kapsamında prostat kanseri PC3 ve DU 145 hücre hatlarına, 48 saat süreyle 6 farklı dozda madde uygulaması yapıldı ve protein izole edildi. PC3 ve DU 145 hücre hatlarında, VEGF-A ve HIF-1 α ELİSA kiti kullanılarak enzime bağlı bir immünosorbent yöntem yardımıyla VEGF-A ve HIF-1 α 'nın, kantitatif tespiti yapıldı.

Prostat kanseri DU 145 hücre hattında VEGF-A protein miktarı, 48 saat süreyle taşıt madde uygulanan kontrol grubuna kıyasla, 70 nM Doseksel dozunda 0,84 kat azaldığı ve 35 nM Doseksel, 50 μ M Kurkumin, 35 nM Doseksel + 50 μ M Kurkumin ve 70 nM Doseksel + 50 μ M Kurkumin dozlarında sırasıyla 1,16, 1,08, 1,42 ve 1,46 kat arttığı belirlendi (Şekil 88). HIF-1 α protein miktarı ise kontrol grubuna kıyasla, 70 nM Doseksel + 50 μ M kombinasyon dozunda 0,9 kat azalırken, 35 nM Doseksel, 70 nM Doseksel, 50 μ M Kurkumin, 35 nM Doseksel + 50 μ M Kurkumin dozlarında sırasıyla 1,05, 1,49, 1,16, 1,37 kat artmaktadır (Şekil 89).

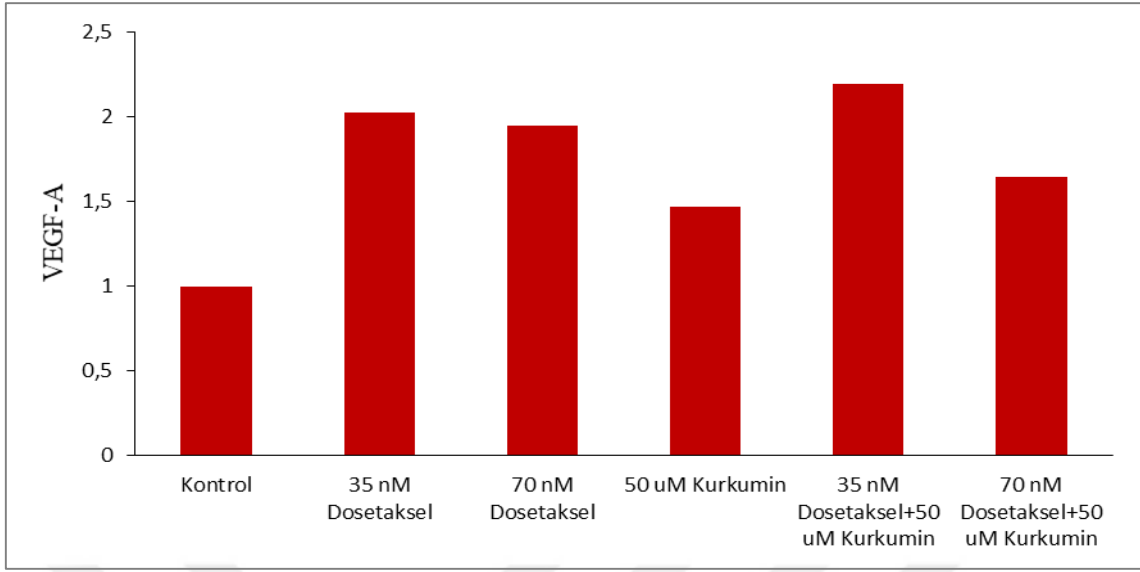


Şekil 88. DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait VEGF-A protein miktarlarının relatif kat artış grafiği.

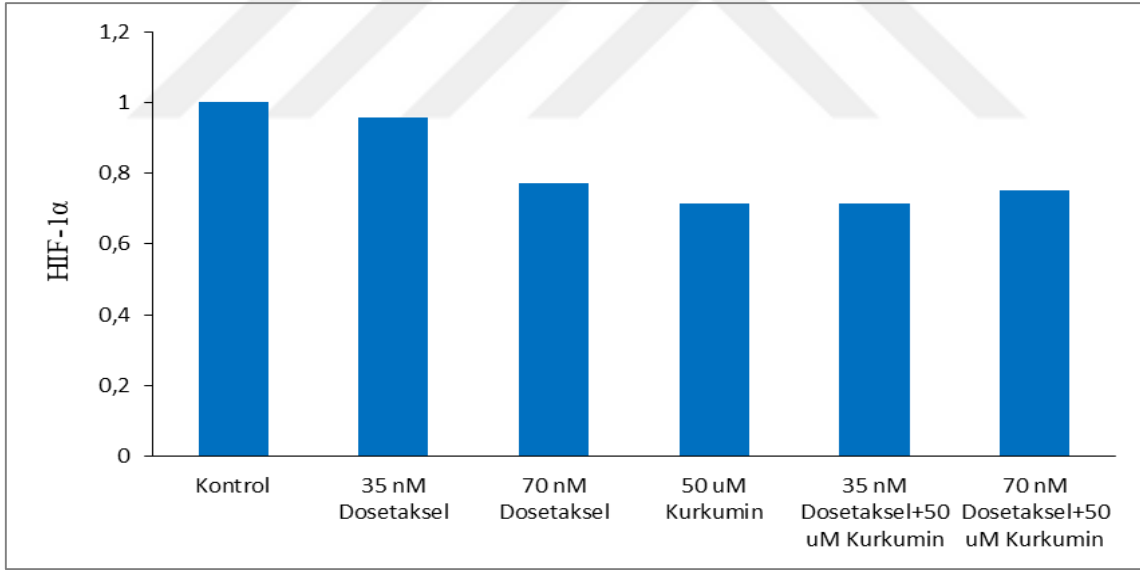


Şekil 89. DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait HIF-1 α protein miktarlarının relatif kat artış grafiği

Yapılan çalışmada diğer prostat kanseri hücre hattı olan PC3’de ise, kontrol grubuna kıyasla, 35 ve 70 nM Doksetaksel, 50 μ M Kurkumin, 35 nM Doksetaksel + 50 μ M Kurkumin ve 70 nM Doksetaksel + 50 μ M Kurkumin dozlarında VEGF-A protein miktarları sırasıyla, 2,02, 1,94, 1,46, 2,19 ve 1,64 kat artarken (Şekil 90), HIF-1 α protein miktarları sırasıyla 0,95, 0,77, 0,71, 0,71 ve 0,75 kat azalmaktadır (Şekil 91).



Şekil 90. PC3 prostat kanseri hücre hattına ait VEGF-A protein miktarlarının relatif kat artış grafiği



Şekil 91. PC3 prostat kanseri hücre hattına ait HIF-1α protein miktarlarının relatif kat artış grafiği

TARTIŞMA

Kurkumin, Zencefilgiller (*Zingiberaceae*) ailesine ait olan olan Zerdeçal (*Curcuma Longa*) bitkisinin rizomundan (*Rhizoma Curcumae*) elde edilen hidrofobik, sarı renkli biyoaktif bir bileşendir (136). Kurkumin, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-diyabetik, anti-koagulan, anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-alerjik olan birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (140). Düşük biyoyararlanıma sahip olmasına rağmen, sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermemesi, molekül ağırlığının düşük olması ve tümör hücrelerinin gelişimini engellemede yüksek aktiviteye sahip olması sebebiyle, kemoterapötik bileşiklerin geliştirilmesinde ideal bir moleküldür (11).

Tez kapsamında, ilk adımda Kurkumin'in insan prostat kanseri hücre hatları olan PC3 ve DU 145 üzerinde hücre canlılığına olan etkileri MTT testi yöntemiyle araştırıldı ve bu kapsamda PC3 ve DU 145 prostat kanseri hücre hatları üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile Kurkumin'in 1,5-50 μM doz aralıklarında değişen 6 farklı konsantrasyonu uygulandı. Yapılan çalışma sonucunda Kurkumin, PC3 hücre hattı üzerinde zamana bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu ve en etkili uygulama süresi 72 saat belirlendi. Bu süredeki IC_{50} değeri ise 20,73 μM olarak saptandı (Şekil 32). DU 145 prostat kanseri hücre hattında ise PC3'den farklı olarak, doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresinin 48 saat olduğu belirlendi. IC_{50} değerinin ise 11,03 μM olduğu saptandı (Şekil 45). İnsan kolon kanseri hücre hattı olan HT-29 üzerine Kurkumin uygulaması yapılan bir çalışmada, IC_{50} değerinin 15,98 \pm 1,96 μM olduğu bildirilmektedir (155). Diğer bir çalışmada ise Hela üzerine Kurkumin uygulaması yapılmış ve IC_{50} değerinin 16,52 μM olduğu tespit edilmiştir (156). PC3 hücrelerine 50 μM Kurkumin dozunun 24 saat süreyle uygulandığı bir çalışmada ise, hücrelerin % 34,8' inin inhibe edildiği bildirilmektedir (157). Yapılan bir diğer çalışmada Kurkumin'in 72 saat süreyle

uygulandığı A2780, SKOV-3, H1299, DU-145 ve MCF-7 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri sırasıyla 10,5±3,2, 11,1±3,0, 14,7±3,0, 12,4±1,6 ve 12,0±1,2 µM olarak belirlenmiştir (158). Son yıllarda yapılan bir çalışmada HCT 116 insan kolon kanseri hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan Kurkumin'in IC₅₀ değeri 17,22 µM olarak saptanırken, NIH 3T3 hücrelerinde IC₅₀ değeri 27,59 µM olarak tespit edilmiştir (159).

Çalışmanın ilk aşamasında MTT testi yöntemiyle sadece canlı ve ölü hücre oranları tespit edildi. İkinci aşamasında ise hücrelerde meydana gelen ölümün apoptoz kaynaklı olup olmadığını anlamak amacıyla TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi yapıldı ve yapılan analizde 48 saat süre ile PC3 ve DU 145 prostat kanseri hücre hatlarına Kurkumin'in 50 µM dozu uygulanarak canlı, nekrotik ve apoptotik hücre oranları belirlendi.

PC3 hücre hattında ölü hücre oranı, 50 µM'lık Kurkumin dozunda %14,33±4,33, kontrolde ise 13,66±1,33 olarak gözlemlenirken apoptotik hücre oranı sırasıyla 34±2 ve 2,33±0,33 olarak gözlemlendi (Tablo 22). Apoptotik hücre oranının artması sebebiyle PC3 hücre hattında ölümün nekroza bağlı olmadığı, apoptotik yolla gerçekleştiği düşünüldü. Benzer şekilde DU 145 hücre hattında ölü hücreler 50 µM'lık Kurkumin dozunda % 9±0,57, kontrolde ise % 20±1,52 olarak belirlendi, apoptotik hücre oranı sırasıyla % 57,66±3,84 ve 0,33±0,33 oldu (Tablo 19). 50 µM'lık Kurkumin dozu uygulanan DU 145 hücresinde apoptotik hücre sayısının kontrole kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede artış sergilemesi, bu uygulamada ölümün apoptotik yolla gerçekleştiğini düşündürdü.

Çalışma kapsamında, DU 145 ve PC3 hücre hatları üzerinde kemoterapötik bir ajan olan Dosetaksel'in hücre canlılığına olan etkisi araştırıldı. Bu kapsamda PC3 ve DU 145 prostat kanseri hücre hatları üzerinde 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyonu uygulandı. Çalışmada Dosetaksel, PC3 ve DU 145 hücre hattı üzerinde doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi iki hücre hattı için de 72 saat olarak belirlendi. 72 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri, PC3 hücre hattında 11,66 nM, DU 145 hücre hattında ise 23,31 nM olarak saptandı (Şekil 38 ve Şekil 53). Kullandığımız hücre hatlarından farklı olarak A549, HepG2 ve HeLa hücre hatlarına Dosetaksel uygulaması sonunda IC₅₀ dozları sırasıyla 3,1, 9,2 ve 16,7 µM olarak tespit edilmiştir (160). Çalışma bulgularımızı destekler şekilde Dosetaksel'in DU 145 ve PC3 hücre hatlarına 72 saat süreyle uygulandığı bir çalışmada ise IC₅₀ değerleri sırasıyla 30 ve 30,8 nM olarak belirlenmiştir (161). Prostat kanseri hücre hatları olan C4-2B ve DU 145 üzerine Dosetaksel uygulamasının yapıldığı çalışmada ise IC₅₀ değerleri sırasıyla 10 nM ve 31 nM olarak saptanmıştır (162).

Çalışmada, canlı ve ölü oranları MTT testi ile belirlendikten sonra, meydana gelen ölümlerin apoptoz aracılı olup olmadığını tayin etmek amacıyla TALİ analizi yapıldı. Canlı, ölü ve apoptotik hücre oranlarını belirlemek amacıyla, belirlenen 35 nM ve 70 nM Dosetaksel dozları PC3 ve DU 145 hücre hatlarına 48 saat süreyle uygulandı.

PC3 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan Dosetaksel'in 35 nM ve 70 nM dozunda sırasıyla %15,33±0,88 ve %20±2,51 PI pozitif nekrotik ölüm gösteren hücre belirlendi. Annexin V pozitif apoptotik hücre ise sırasıyla %17,66±0,88 ve %25±3,51 olarak gözlemlendi (Tablo 21). Sonuçlar göz önüne alındığında Dosetaksel'in PC3 hücre serisinde hem apoptotik hem de nekrotik yolla ölüm oluşturabildiği ve bu şekilde bir etkinlik gösterebildiği düşünüldü. DU 145 hücre hattında ise 48 saat süreyle uygulanan Dosetaksel 35 nM ve 70 nM dozunda sırasıyla %26±4,50 ve %13,66±0,66 ölü hücre oranı verdi. Apoptotik hücreler ise sırasıyla %14,33±10,03 ve %33,66±0,33 oranında belirlendi ve belirlenen bu oran istatistik olarak anlamlı bulundu (Tablo 18). Dosetaksel'in yüksek dozunun hücreyi apoptoza bağlı bir şekilde ölüme götürdüğü ve bu nedenle apoptotik hücre oranını arttırdığı düşünüldü.

Çalışmada Kurkumin'in Dosetaksel ile kombinasyonunun PC3 ve DU 145 prostat kanseri hücre hatlarında, hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenebilmesi için, MTT testi yapıldı. Bu kapsamda 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile 50 µM'lık Kurkumin dozu, Dosetaksel'in 3.125-400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozuyla kombinlenerek uygulandı. Çalışmada Dosetaksel dozlarının 50 µM Kurkumin dozuyla kombinasyonu PC3 hücre hattı üzerinde zamana bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi 72 saat olarak belirlendi (

Tablo 10). DU 145 hücre hattı üzerinde doza bağımlı olarak bir ölüm oluşturdu. En etkili uygulama süresi ise 72 saat olarak belirlendi. 72 saatlik uygulama sonrası IC₅₀ değeri 11,23 nM olarak saptandı (Şekil 59). Yapılan bir çalışmada 48 saat süreyle uygulanan Dosetaksel ve Kurkumin'in DU 145 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 19,2 nM ve 32,3 µM olarak belirlenirken, PC3 hücre hattında 46 nM ve 36,1 µM olarak tespit edildi. Çalışma bulgularımızı destekler şekilde PC3 ve DU 145 hücre hattına 48 saat süreyle 10 nM Dosetaksel ve 20 µM Kurkumin kombinasyonu uygulanan bir çalışmada, tek başına Dosetaksel ve Kurkumin uygulamalarıyla karşılaştırıldığında kombinasyon uygulamalarının hücre proliferasyonunu önemli seviyede azalttığı rapor edilmiştir (163).

TALİ analizinde 48 saat süreyle, 35 nM ve 70 nM Dosetaksel dozları 50 µM Kurkumin dozuyla kombinlenerek uygulandı. PC3 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan 35 nM

Dosetaksel+50 µM Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin dozunda ölü hücre oranı sırasıyla, % 14,33±2,40 ve % 17,33±1,76 belirlenirken, DU 145 hücre hattında % 21,33±6,35 ve %31,33±9,93 olarak belirlendi. Aynı uygulamalarda. PC3 hücre hattında apoptotik hücre oranı sırasıyla % 42,66±2,40 ve %47±1,0 oldu (Tablo 23), DU 145 hattında ise % 30±6,24 ve % 35±10,59 apoptotik hücre oranı belirlendi (Tablo 20). Kurkumin'in Dosetaksel dozlarıyla kombinasyonunun her iki hücre hattındaki ölüm oranını önemli seviyede arttırdığı, bu ölümün apoptotik yolla olduğu düşünüldü.

Kurkumin ve Dosetaksel kombinasyonlarının antitümör ve antiproliferatif etkileri son yıllarda üzerinde çokça çalışılan konulardan birisidir. Metastatik meme kanserli gönüllüler üzerinde yapılan faz 1 çalışmasında 100 mg / m² dozunda 1 saat intra venöz olarak uygulanan Dosetaksel 500-8000 mg doz aralığında Kurkumin ile kombine edilmiş ve çalışma sonucunda, Dosetakselin metastatik tümör hücrelerinde belirlenen en yüksek etkisi olan % 40-68 oranından daha iyi bir sonuç alındığı, ancak asıl başarının kemoterapinin sebep olduğu yan etkilerde istatistik anlamda önemli miktarda azalma olduğu belirtilmiştir (164). *İn-vitro* koşullarda insan anaplastik tiroid karsinoma hücre hatları olan 8505C, CAL62, ATC ve KTC hücre serilerinde 1, 2, 5, 10, ve 20 nM Dosetaksel ve 1, 5, 10, 25 ve 50 µM Kurkumin uygulamaları ile kombine ilaç uygulamaları sonucu, tüm hücre serilerinde hücre proliferasyonunun kontrole kıyasla anlamlı seviyede azaldığı belirtilmiştir (165), yine çalışma sonuçlarımızı destekler nitelikte insan akciğer kanser hücre hattı A549 hücrelerinde, 0.5-32 nM Dosetaksel ve 0.5-32 µM Kurkumin uygulamalarının tek başına Dosetaksel uygulamasına kıyasla hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığı belirlenmiştir (166). Yapılan çalışmalarda hücre hatları, çalışmamızda kullandığımız hücrelerden farklı olmasına karşın, tüm hücre serileri ve insan çalışmalarında Dosetaksel, Kurkumin kombinasyonunun birbirine çok yakın sonuçlar içermesi ve antitümör kapasitesinin, Dosetakselin tek başına uygulamasına kıyasla anlamlı seviyede artmasının çalışma bulgularımızı desteklediği düşünüldü. Sonuç olarak 35 ve 70 nM Dosetaksel dozları ile kombine edilen 50 µM Kurkuminin, her iki prostat kanser hücre serisi olan Du 145 ve PC3 hücrelerinde güçlü bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlendi.

Çalışmada özellikle Dosetaksel ve Kurkuminin kombine uygulandığı gruplarda, kontrol ve Dosetakselin tek başına uygulandığı gruplara kıyasla güçlü bir mitokondriyal apoptozis sinyali olduğu belirlendi. Bu etkinin özellikle düşen Bcl-2/Bax oranı, yüksek düzeyde belirlenen Cyt-C mRNA seviyesi ve Kaspaz 3 aktivasyonu ile olduğu görüldü. Dışsal apoptozis yolu genlerinin ise uygulanan ilaç süreleri ve dozlarda önemli düzeyde bir artış oluşturmadığı görüldü. Mitokondriyal apoptozis yolu içsel yolak olarak da bilinir. Kanser hücrelerinde

programlanmış bir hücre ölümü oluşturan bu yolda, en önemli protein mitokondriyal membran yapısının geçirgenliğinden sorumlu Bcl gen ailesidir (167). Bcl büyük bir gen tarafından kodlanır ve baş kısmı Bcl-2 proteinin kodlanmasından sorumludur bu protein apoptoz inhibitör olarak görev yapar. Bu protein kanser hücrelerinde özellikle letal olmayan ancak tamir edilemeyen bir DNA hasarı olduğunda ve hücreler kontrolsüz olarak çoğalmaya başladığında overeksprese olan tümör süpresör P53 geni ile yakın ilişkilidir (168). Kanser hücrelerinde p53 aktivitesi içsel ve dışsal apoptoz yollarının her ikisinin de tetikleyebilmektedir. Ancak mitokondriyal yolda apoptoz gereksiniminde Bcl-2 geninin aktivitesini baskılanır. Bu baskılama sonrası Bcl geninin son kısmında yer alan Bax geninin ekspresyonu artmaya başlar. Bax proapoptotik bir proteindir ve artan yoğunluğu mitokondriyal membran potansiyelinin ve permeabilitesinin bozulmasına yol açar (167, 169). Bu durum apoptoz mekanizmasını tetikler ve mitokondri içinde bulunan Sitokrom-C bozulan membran potansiyeli nedeniyle hücre sitozolüne akmaya başlar (170). Hücre sitozolünde miktarı hızla artan Sitokrom-C, hücre sitozolünde var olan ve apoptoz durumunda ekspresyonu artan APAF-1 proteini ile birleşir. Bu protein yapıya daha sonra Kaspaz 9 katılır ve apoptozom adı verilen apoptoz yapıcılarını oluşturur (171, 172). Bu aşamada apoptozomlar Kaspaz 3 proteinini tetikler ve Kaspaz 3 ekspresyonundaki artış sonucu hücre ölümüne gider. Bu şekilde mitokondriyal apoptoz çemberi tamamlanmış olur. Yapılan çalışmada gerek TALİ hücre sitometresi analizi, gerekse gen ekspresyon analizi sonuçları Kurkuminin tek başına ve aynı zamanda Doksetal ile birlikte uygulandığı gruplarda mitokondriyal apoptoz yolağı üzerinden güçlü bir apoptotik etkiye sahip olduğu belirlendi. Çalışma bulgularımızı destekler şekilde Kurkumin'in apoptotik rolü HPV pozitif servikal kanser hücre serileri, HeLa, SiHa ve CaSki'de araştırılmış, yapılan kurkumin uygulamalarının Bax ekspresyonunu yükselttiğini, Sitokrom C salınımını artırdığını ve Bcl-2 ve Bcl-xL'yi aşağı yönde düzenlediğini göstermiştir. Kurkumin tedavisi ayrıca Kaspaz-3 ve 9'u tüm servikal hücre serilerinde güçlü bir şekilde aktive etmiştir (173). Benzer bir çalışma akciğer kanser hücre serileri olan A549 and H1299 hücre serilerinde yapılmış ve Kurkumin uygulaması bu hücre serilerinde Bcl-2 ve Bcl-xL gen ekspresyonlarını baskımlarken, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 ekspresyonlarını istatistik olarak anlamlı seviyede arttırmıştır (174). Kurkuminin apoptotik etkisi beyin tümörleri, ösefal kanser, kemik kanseri, prostat kanserlerinde in vitro ve in vivo deney modellerinde gösterilmiştir (175). Literatür bilgileri çalışma bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Prostat kanseri başta olmak üzere kanser tümörlerinin asıl öldürücü etkisi anjiyogenez oluşumu ve sonrasında görülen metastazdır. Anjiyogenez, tümör proliferasyonu, genişlemesi

ve metastazında pro-anjiyojenik hem de anti-anjiyojenik faktörlerin ekspresyon dengesinin bozulması ile ortaya çıkar. Denge malignitede bozulur, bu bozulma sonucu en başta hipoksi ortam ve bu ortamla ilgili HIF ailesi genleri aktif olur, bu aktivasyon genellikle VEGF, VEGF reseptörleri FLT-1 ve FLK-1, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), anjiyopietinler (ANG-1 ve -2), platelet dahil olmak üzere bir dizi pro-anjiyojenik faktörün ekspresyonunu doğrudan aktive eder (176). Bu aktivasyon sonucu artan TIE-2 reseptörü ve matriks metalloproteinazları MMP-2 ve 9 (177), HIF ile indüklenen tüm proanjiyojenik faktörlerden VEGF'nin anjiyojenik süreçte merkezi bir rolü olduğu bilinmektedir (174). Çalışmamızda 48 saat süreyle, 35 nM ve 70 nM Doseksel doz uygulaması yapılan PC3 hücre serisinde PHD1, HIF-1 α ve HIF-1 β genlerinde düşük konsantrasyonda istatistik olarak anlamlı seviyede bir düşüş gösterirken, 70 nM uygulamasında bu gruptaki ekspresyon seviyeleri kontrolle aynı seviyede kaldı (Tablo 24). DU 145 hücre serisinde ise düşük konsantrasyon Doseksel uygulamaları PC3 hücre hattının aksine PHD1, HIF-1 α ve HIF-1 β genlerinde kontrole kıyasla 1,49-2,15 katlık bir artış oluşturdu (Tablo 25). 48 saat süreyle, 35 nM ve 70 nM Doseksel dozları 50 μ M Kurkumin uygulaması PC3 hücre serisinde PHD1 gen ekspresyon trendini tersine çevirdi ve Kurkuminin yer aldığı tüm gruplarda anlamlı düzeyde bir gen ekspresyonu belirlendi. Aynı koşullarda Du 145 hücre serisinde bu genlerin ifadesi kontrole kıyasla anlamlı bir değişim göstermedi. HIF-1 ailesi hipoksi koşullarında aktif olan protein grubunu içermektedir. Hipoksi sırasında HIF-1 α stabilize olur ve sitoplazmadan nükleusa translokasyon yapar, burada HIF-1 β ile dimerizlenir ve HIF hedef genlerinin düzenleyici elemanları içinde yer alan HRE'lere bağlanır. Bu bağlanma transkripsiyon aktivatörleri p300 ve CBP ile gerçekleştiği birçok *in vitro* kanser hücre hatlarında gösterilmiştir. Tüm bu süreç birlikte aktif olduğunda hipoksi ile indüklenen faktörlerle ilgili genler aktive olduğu ve başta VEGF, MMP ailesi, COX-2 ve IL-6 da olmak üzere birçok sitokininin sentezinin gerçekleştiği yapılan *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur (174, 178). Bunun yanında PHD gen ailesinin, ürettiği ürünler ile oksijen sensörü olarak görev yaptığı ve doğrudan HIF-1 α ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir (179, 180).

Çalışmamızda PC3 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan Doseksel'in 35 nM dozunda HIF-1 α yolağını tetiklemediği, 70 nM dozunda ise HIF1 ailesi genlerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış oluşturmazken başta CBP ve P300 kofaktörlerinin ekspresyonunu tetiklediği ayrıca özellikle hipoksi ile indüklenen elementler olarak belirtilen VEGF, SMAD3 ve COX-2 ekspresyonunda anlamlı düzeyde bir artış oluşturduğu belirlendi. Ayrıca özellikle PI3K/MTOR aksisinde istatistik düzeyde önemli bir artış saptandı. Yine aynı hücre serisinde

50 µM Kurkumin uygulaması HIF-1α yolağı genlerinin tümünü Dosetaksel uygulamalarına kıyasla istatistik olarak anlamlı seviyede düşürdü. Bununla birlikte çalışmada PC3 hücre serilerinde yapılan hücre göçü denemesinde Dosetaksel uygulamalarında Kurkumin kombinasyonlarına kıyasla hücre göçünün daha yüksek olduğunu belirlendi (Şekil 78). Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde PC3 hücre serisinde tek başına 48 saat süreyle uygulanan Dosetaksel'in 35 nM ve 70 nM dozlarında anjiyogenez mekanizmasını kontrole kıyasla nispeten baskılayabildiği, ancak Kurkumin uygulamasında gerek HIF-1α/HIF-1β/CBP-P300 aksisindeki gen ekspresyonlarında belirlenen anlamlı seviyedeki azalma, gerekse hipoksi ile indüklenen FAK, SMAD3, IL6, COX-2 ve MMP2 ekspresyonundaki Dosetaksel uygulamasına kıyasla aşağı yönde düzenlenen ekspresyon seviyeleri nedeniyle güçlü bir anti-anjiyogenik etki oluştuğu düşünüldü.

Çalışmada DU 145 hücre hatlarında Dosetakselin tek başına 35 nM uygulandığı gruplarda güçlü bir HIF-1α sinyalizasyonu belirlendi, bu sinyalizasyon HIF-1α/HIF-1β/CBP-P300 aksisi ile birlikte tüm hipoksi ile indüklenen element ekspresyonlarına yansdı. Yapılan hücre göçü analizinde özellikle 35 ve 70 nM tek başına uygulanan Dosetakselin hücre göçünü ,kombine uygulanan ilaç gruplarına kıyasla istatistik düzeyde anlamlı bir şekilde daha az önlediği belirlendi (Şekil 85). Bununla birlikte DU 145 hücre hatlarında PC3 hücre hatlarına kıyasla anjiyogenez yolağı genlerinin ilaç uygulaması yapılmasına rağmen kontrole kıyasla aynı düzeyde kaldığı, özellikle COX-2, PAI-1, MMP3 genleri ve PI3K/AKT/ MTOR yolağı genlerine ait ekspresyon değerlerinin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. Bu bilgiler ışığında DU 145 hücrelerinde tek başına yapılan Dosetaksel uygulamalarında invazyon deneyinde belirlenen yüksek düzeydeki hücre göçünün HIF-1α yolağı ile ilgili olduğu düşünüldü. Bununla birlikte Kurkumin uygulaması ve Kurkumin+Dosetaksel kombine gruplarında görülen hücre göçü inhibisyonunun, istatistiksel düzeyde artan hipoksi ile indüklenen elementler olarak bilinen hücrelerarası matriks proteinleri COX2, MMP3 bunun yanında aktif olan PI3K/AKT/MTOR aksisi sebebiyle HIF-1α yolağının baskılanması ile oluşmadığı, başka bir mekanizma üzerinden hücre migrasyonunun baskılanmış olabileceği bu konuda yapılacak yeni çalışmaların mekanizmanın aydınlatılması için gerekli olduğu düşünüldü.

SONUÇLAR

- 1) Dosetakselin hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı, 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saat süreyle hücelere uygulandığı MTT testi sonucunda, PC3 ve DU 145 hücre hatlarında 24 ve 48 saatlik uygulamalarla kıyaslandığında, hücre sayısının düşüşünde en etkili olan uygulamanın 72 saatlik süre sonunda oluştuğu belirlendi. PC3 ve DU 145 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri sırasıyla 11,66 ve 23,31 nM olarak saptandı. MTT sonuçları değerlendirildiğinde, çalışma için belirlenen 48 saatlik 35 nM ve 70 nM Dosetaksel uygulamasının, hücrelerde meydana getirdiği ölümün apoptoz veya nekroz kaynaklı olup olmadığını anlamak amacıyla yapılan TALİ analizi sonucunda, 35 nM ve 70 nM dozlarının PC3 hücrelerini hem apoptotik hem de nekrotik yollarla ölüme götürdüğü, DU 145 hücrelerinde ise sadece yüksek Dosetaksel dozunun apoptotik yolla hücreleri ölüme götürdüğü saptandı.
- 2) PC3 hücre hattına 35 nM ve 70 nM dozlarında uygulanan Dosetakselin; RT-qPCR gen ekspresyonu analizi sonuçları ile TALİ analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, Sitokrom C ve Kaspaz 3 gen ifadesini arttırması hücreleri apoptotoza götürürken, aynı zamanda 35 nM Dosetaksel uygulamasında, Bcl-2'yi arttırması ve Puma, Noxa genlerinin gen ekspresyon seviyelerini azaltmasının hücreleri nekroza götürdüğü düşünüldü. PC3 hücrelerinde 35 nM Dosetaksel uygulaması, HIF1 gen ailesine ait genlerde gen ifadesini ve hipoksi ile indüklenen pro-anjiyogenik faktörler olan VEGF, IGFR'nün de gen ekspresyon seviyesini azaltmaktadır. 70 nM Dosetaksel uygulaması ise PC3 hücrelerinde PI3K/MTOR sinyalizasyonunu, CBP ve P300 kofaktörlerini de etkileyerek indüklenen VEGF, IL6, SMAD3, COX2 gen ifadesini arttırmaktadır. Gen ekspresyonu sonuçları,

değerlendirildiğinde, PC3 hücre hattında Dosetaksel dozlarının kontrole kıyasla anjiyogenez mekanizmasını nispeten engellediği düşünüldü. İnvazyon analiz sonuçlarında ise, PC3 hücre hattına uygulanan Dosetaksel dozlarında hücre göçünün, Dosetaksel'in Kurkuminle olan kombinasyon dozlarıyla kıyaslandığında daha yüksek olduğu saptandı. DU 145 hücre hattına uygulanan 35 nM Dosetaksel dozunun, mitokondriyal apoptoz yolağı genlerinin ifadesini arttırması sebebiyle hücreleri içsel apoptoz yolağıyla, apoptoza götürdüğü belirlendi. DU 145 hücre hattına uygulanan 35 nM Dosetaksel dozunda HIF1 gen ailesine ait genlerin gen ekspresyonu seviyelerindeki artışın, hipoksik koşullar sonucunda gerçekleşmeyip PI3K/AKT/MTOR sinyalizasyonundaki artışa bağlı olduğu düşünüldü. DU 145 hücre hattında gerçekleşen hücre göçünün; Dosetaksel uygulanan gruplarda anjiyogenezi tetikleyen, yüksek seviyede eksprese olan HIF-1 α gen ekspresyonu ile ELİSA analizinde artan HIF-1 α protein miktarı sonucunda gerçekleştiği düşünüldü.

- 3) Kurkuminin 1,5-50 μ M arasında değişen 6 farklı konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saat süreyle hücrelere uygulandığı MTT testi sonucunda, PC-3 hücre hattında dozlar arasındaki en belirgin fark 72 saatlik uygulama sonrasında oluştu. Doza bağımlı olarak hücre sayısında düşüş görüldü ve 72 saatlik uygulamada IC₅₀ değeri 20,73 μ M olarak saptandı. PC3 hücre hattıyla aynı konsantrasyon ve sürelerde uygulama yapılan DU 145 hücre hattında ise, doz-zaman ilişkisine bağımlı olarak en yüksek hücre ölümü 48 saatlik uygulamada gerçekleşti ve IC₅₀ değeri 11,03 μ M olarak belirlendi. MTT'i verileri bir bütün olarak değerlendirildiğinde çalışma için belirlenen 48 saatlik 50 μ M Kurkumin uygulamasının, hücreleri ölüme ne şekilde götürdüğünün belirlenebilmesi için TALİ analizi yapıldı. TALİ analizi sonuçlarına göre her iki hücre hattında hücre ölümünün apoptotik yolla gerçekleştirildiği saptandı.
- 4) RT-qPCR çalışması sonucunda, 50 μ M Kurkumin uygulaması yapılan DU 145 hücrelerinde, azalan Bcl-2 ve artan p53, Sitokrom-C, Kaspaz 3 gen ekspresyonu seviyeleri ile PC3 hücrelerinde belirlenen Sitokrom-C, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 gen ekspresyonu seviyelerindeki artışın, TALİ analizinde her iki hücre hattında da saptanan apoptotik sinyalle ilişkili olduğu ve bu artışı mitokondriyal apoptoz yolağı üzerinden gerçekleştirdiği düşünüldü. Anti-anjiyogenik etki oluşturduğu düşünülen tek başına Kurkumin uygulamasının PC3 hücre hattında Dosetaksel uygulamalarına kıyasla HIF-1 α yolağı genleri ile birlikte FAK, SMAD3, IL6, MMP2 genlerinin gen ekspresyon seviyelerini düşürdüğü, ve bu şekilde anjiyogenezi engellediği belirlendi.
- 5) 50 μ M Kurkumin dozunun Dosetaksel'in 3,125- 400 nM arasında değişen 8 farklı konsantrasyonuyla kombinasyonunun 24, 48 ve 72 saat süreyle hücreler üzerinde

oluşturduğu etkinin belirlenebilmesi için yapılan MTT testi sonucuna göre, PC3 hücrelerinde kombinasyon dozlar zamana bağlı bir ölüm oluştururken, DU 145 hücrelerinde doza bağımlı ölüm oluşturdu. En etkili süre her iki hücre hattı için de 72 saat olarak belirlendi. DU 145 hücre hattına ait Doseksel+Kurkumin kombinasyon dozunun IC₅₀ değeri 11,23 olarak saptandı. Yapılan MTT testi sonuçları değerlendirildiğinde, çalışma için ideal dozlar olarak; 35 nM Doseksel+50 µM Kurkumin ve 70 nM Doseksel+50 µM kombinasyon dozları belirlendi. Kombinasyon dozlarının 48 saat süreyle uygulandığı PC3 ve DU 145 hücre hatlarına yapılan TALİ analizi sonucunda, her iki hücre hattında da hücre ölümünün apoptotik yolla gerçekleştiği saptandı.

- 6) RT-qPCR sonucunda, 35 nM Doseksel+50 µM Kurkumin ve 70 nM Doseksel+50 µM Kurkumin uygulaması yapılan PC3 ve DU 145 hücre hatlarında, artan içsel apoptoz yolağı genleri, güçlü apoptotik sinyal verdi. HIF-1 gen ailesinin ekspresyonunda değişim görülmemesi ancak PI3K/AKT/MTOR aksisindeki gen ifadelerinde artış saptanması üzerine, hücre göçünün HIF-1 gen ailesinin inhibe edilmesiyle oluşmadığı başka bir mekanizma üzerinden gerçekleştirildiği düşünüldü
- 7) Sonuç olarak, Kurkumin PC3 ve DU 145 hücre hatlarında hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve apoptozisi indükleyerek, Dosekselin terapötik etkinliğini arttırdı. PC3 hücre hattına yapılan tek başına Doseksel uygulaması anjiyogenezi nispeten baskımlarken Kurkuminle olan kombine tedavisinde önemli seviyede anti-anjiyogenik etki gösterdi. DU 145 hücre hattında ise Dosekselin 35 ve 70 nM dozlarının 50 µM Kurkumin dozuyla olan kombinasyonları invazyonu önemli seviyede engelledi. Ancak DU 145 hücre hattında RT-qPCR analizi sonucunda, anjiyogenezi tetikleyen HIF-1α yolağı ve PI3K/AKT/MTOR genlerinin artan gen ekspresyon seviyeleri, hücre göçünün başka bir mekanizma üzerinden baskılanmış olabileceğini düşündürdü. Bu sebeple, mekanizmanın aydınlatılması için anjiyogenez mekanizmasında etkili olduğu bilinen Jak/Stat, Notch ve TGF-β gibi sinyal yollarının üzerinde yapılacak olan yeni çalışmalara, ihtiyaç duyulduğu düşünüldü.

ÖZET

Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra ölümlerle sonuçlanan kanser vakalarında ikinci sırada yer almaktadır. Doksetal prostat kanserinde kullanılan mikrotübül stabilize edici kemoterapötik bir ajandır. Halen kanserle savaşta en etkili yol kemoterapidir. Doğal bileşiklerle kemoterapi ajanlarının kombinasyonu, ilaç etkinliğini artırıcı ve sağlıklı hücrelerde yan etkileri azaltıcı potansiyeli sebebiyle önemli bir seçenektir. Bu amaçla tezde, antikanser doğal bir bileşik olan Kurkumin ile Doksetalin kombine terapide kullanılabilirliği ve PC3 ve DU 145 hücre hatlarında anjiyogenez üzerine olan etkisi araştırıldı.

Tez kapsamında, PC3 ve DU 145 prostat kanseri hücre hattına uygulanan Doksetal ve Kurkuminin tek başına ve kombinasyon dozlarının hücre proliferasyonu üzerine etkisi ve bileşiklerin IC50 değerleri MTT testi ile, apoptotik ve nekrotik ölüm Annexin V:PI tili apoptoz kiti ile Tali İmage sitometresi ile, invazyon yara iyileştirme deneyi ile, gen ekspresyonları qRT_PCR yöntemi ile ve protein miktarları ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi. Doksetal'ın IC50 değeri, PC3 ve DU 145 hücre hattında sırasıyla 11,66 ve 23,31 nM olarak belirlendi. Kurkumin uygulamasında ise PC3 ve DU 145 hücre hattında IC50 değerleri sırasıyla 20,73 ve 11,03 µM olarak saptandı. Doksetal+Kurkumin uygulamalarında PC3 hücre hattında zamana bağlı ölüm oluşurken, DU 145 hücre hattında doza bağımlı ölüm oluştu. Tali analizi sonucunda PC3 hücre hattında 35 ve 70 nM Doksetal dozlarının hücreleri hem apoptotik hemde nekrotik yolla ölüme götürdüğü DU 145 hücre hattında ise sadece yüksek Doksetal dozunun hücreleri apoptotik yolla ölüme götürdüğü saptandı. PC3 ve DU 145 hücre hattına tek başına ve Doksetal ile kombinasyon halinde uygulanan Kurkumin dozları

hücrelerde apoptotik sinyal verdi. PC3 hücre hattına uygulanan 35 nM Doksetaksel+50 µM Kurkumin ve 70 nM Doksetaksel+50 µM Kurkumin kombinasyonları, VEGF (0,74-0,52 kat), VEGFR (0,55-0,18 kat), FAK (0,49-0,31 kat), SMAD3 (0,68-0,77 kat), COX-2 (0,12-0,08 kat) gen ekspresyonu seviyelerini azaltarak anjiyogenezi engelledi. DU 145 hücre hattına uygulanan 35 nM Doksetaksel+50 µM Kurkumin ve 70 nM Doksetaksel+50 µM Kurkumin kombinasyonları invazyon deneyinde hücre göçünü engelledi. Ancak PAI-1 (4,36-10,95 kat) MMP3 (3,75-3,97 kat), PI3K (2,75-3,17 kat), AKT (3,57-7,27 kat) gen ekspresyon seviyeleri arttı. Bu sebeple Du 145 hücre serisinde anjiyogenezin başka bir mekanizma üzerinden engellendiği düşünüldü. Sonuç olarak, Doksetaksel Kurkumin kombine terapisinin prostat kanseri hücre hatlarında anjiyogenezi engellemekte etkili olduğu ve prostat kanserinde Kurkuminin aday bir molekül olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu sonucu desteklemek için in-vivo yapılacak olan daha ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Doksetaksel, kurkumin, DU 145, PC3, kanser, anjiyogenez

THE EFFECT OF DOCETAXEL AND CURCUMIN ON PC3 AND DU 145 PROSTATE CANCER CELL LINE ANGIOGENESIS

SUMMARY

Prostate cancer is the second most common cause of cancer death behind lung cancer in male. Docetaxel is a microtubule stabilizing chemotherapeutic agent, is mostly used in prostate cancer. Chemotherapy is still the most effective way of fighting with cancer. Because of its potential to increase drug efficacy and reduce side effects in healthy cells, the combination of natural compounds and chemotherapy agents is an important choice. For this purpose in this thesis, properties of combination therapy of Curcumin and Docetaxel and the effect on angiogenesis in PC3 and DU 145 cell lines were investigated.

The effect on cell proliferation and IC₅₀ value of, both individually and combination treatment of Docetaxel and Curcumin were determined by MTT assay, apoptosis and necrosis were investigated by TALI image cytometer with Annexin V:PI staining, invasion assay were performed with wound healing assay, gen and protein expressions were detected qRt-PCR and ELISA assay in PC3 and DU145 cells. The IC₅₀ values of Docetaxel were 11.66 and 23.31 nM in PC3 and DU 145 cell lines, respectively. And also the IC₅₀ value of Curcumin were 20.73 μ M and 11.03 μ M in PC3 and DU 145 cell lines, respectively. In combination treatment, while time depended death was determined in PC3 cells, the dose dependent death occurred in DU 145 cell line. The result of TALI analysis showed that 35 and 70 nM doses of Docetaxel in the PC3 cell line resulted in both apoptotic and necrotic deaths, whereas in DU 145 cell line only high doses of docetaxel caused cell death via apoptotic pathway.

Both individual and combination application with curcumin significantly induced apoptotic signals in PC3 and DU 145 cell lines. The combination of 35 nM Docetaxel+50 μ M Curcumin and 70 nM Docetaxel+50 μ M Curcumin applications inhibited angiogenesis by decreasing VEGF (0.74-0.52-fold), VEGFR (0.55-0.18-fold), FAK(0.49-0.31-fold), SMAD3 (0.68-0.77-fold), COX-2 (0.12-0.08-fold) gene expression levels. In the wound healing assay 35 nM Docetaxel+50 μ M Curcumin and 70 nM Docetaxel+50 μ M Curcumin combinations inhibited cell migration. But gene expression levels of angiogenesis members PAI-1 (4.36-10.95 fold), MMP3 (3.75- 3.97-fold), PI3K (2.75-3.17-fold), ACT (3.57-7.27-fold) significantly increased. For this reason, it may be thought that, the angiogenesis inhibited by another signalling mechanisms in DU 145 cell lines. In conclusion, it is thought that Docetaxel and Curcumin combination is effective agent in inhibiting angiogenesis of prostate cancer cell lines, and Curcumin may be a candidate molecule for combination chemotherapy regimes. However, further in-vivo studies are needed to support our results.

Key words: Docetaxel, curcumin, DU 145, PC3, cancer, angiogenesis

KAYNAKLAR

1. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The global burden of cancer 2013. *JAMA oncology*. 2015;1(4):505-27.
2. Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I. Human cancer databases. *Oncology reports*. 2015;33(1):3-18.
3. Szliszka E, Krol W. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
4. Sundararajan S, Vogelzang N. Chemotherapy in the Treatment of Prostate Cancer--The Past, the Present, and the Future. *American Journal of Hematology/Oncology®*. 2014;10(6).
5. Baykara O. Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bil Derg* 2016;154-165.
6. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical pharmacology*. 2001;61(3):253-70.
7. Rosen L. Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. *The Oncologist*. 2000;5(Supplement 1):20-7.
8. Keum C-G, Noh Y-W, Baek J-S, Lim J-H, Hwang C-J, Na Y-G, et al. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:2225.
9. Herbst RS, Khuri FR. Mode of action of docetaxel—a basis for combination with novel anticancer agents. *Cancer treatment reviews*. 2003;29(5):407-15.

10. Sweeney CJ, Miller KD, Sissons SE, Nozaki S, Heilman DK, Shen J, et al. The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors. *Cancer Research*. 2001;61(8):3369-72.
11. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*. 2003;23(1/A):363-98.
12. Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. *Campbell-Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007. p.226-29.
13. Arıncı K, Ersoy M. Uygulamalı Anatomi. Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara. 1993.
14. Prostat Kanserinin Evreleri. <http://stlurology.com/conditions-treatments/prostate-cancer/stages/>. Erişim tarihi: 05.09.2017.
15. Schulz W, Burchardt M, Cronauer M. Molecular biology of prostate cancer. *Molecular human reproduction*. 2003;9(8):437-48.
16. Stamey TA, McNeal, J.E. Adenocarcinoma of the prostate. In *Campbell's Urology*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1159-221.
17. Simmons S. Biochemical and functional analysis of homeoprotein Nkx3. 1. Raleigh: North Carolina State University; 2006.
18. Kufe DW, Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E. *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. p. 1431-5.
19. Kanser tipleri. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>. Erişim tarihi: 16.09.2017.
20. Prostat Kanseri İçin Temel İstatistikler. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html>. Erişim tarihi: 18.09.2017.
21. Ülkelerin Kanser Profili. http://www.who.int/cancer/country-profiles/tur_en.pdf. Erişim tarihi:19.09.2017.
22. Kanser İstatistikleri. <https://www.saglik.gov.tr/TR,11587/kanser-istatistikleri-2003-2004-2005.html>. Erişim tarihi: 19.09.2017.
23. Prostat Kanseri Risk Faktörleri. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>. Erişim tarihi: 20.09.2017

24. Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, et al. Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *American journal of epidemiology*. 1995;141(8):732-40.
25. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *The Journal of urology*. 1993;150(3):797-802.
26. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *The Journal of urology*. 2002;168(3):906-13.
27. Moorthy HK, Venugopal P. Strategies for prostate cancer prevention: Review of the literature. *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*. 2008;24(3):295.
28. Schut HA, Snyderwine EG. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1999;20(3):353-68.
29. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*. 2003;361(9360):859-64.
30. Shirai T, Asamoto M, Takahashi S, Imaida K. Diet and prostate cancer. *Toxicology*. 2002;181:89-94.
31. Miller EC, Giovannucci E, Erdman Jr JW, Bahnson R, Schwartz SJ, Clinton SK. Tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Urologic Clinics of North America*. 2002;29(1):83-93.
32. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science*. 1998;279(5350):563-6.
33. Kristal AR. Vitamin A, retinoids and carotenoids as chemopreventive agents for prostate cancer. *The Journal of urology*. 2004;171(2):S54-S8.
34. Anuurad E, Shiwaku K, Nogi A, Kitajima K, Enkhmaa B, Shimono K, et al. The new BMI criteria for asians by the regional office for the western pacific region of WHO are suitable for screening of overweight to prevent metabolic syndrome in elder Japanese workers. *Journal of occupational health*. 2003;45(6):335-43.
35. Hsing AW, Deng J, Sesterhenn IA, Mostofi F, Stanczyk FZ, Benichou J, et al. Body size and prostate cancer: a population-based case-control study in China. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2000;9(12):1335-41.

36. Reiter RE dJ, Patrick C, Walsh MD. Campbells Urology. 8. baskı ed: Güneş Tıp Kitabevi, Ankara; 2005.
37. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho Sm, Landolph J, et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 2004;101(S10):2371-490.
38. Gong Z, Kristal AR, Schenk JM, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM. Alcohol consumption, finasteride, and prostate cancer risk. *Cancer*. 2009;115(16):3661-9.
39. Breslow RA, Wideroff L, Graubard BI, Erwin D, Reichman ME, Ziegler RG, et al. Alcohol and prostate cancer in the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Annals of epidemiology*. 1999;9(4):254-61.
40. Prostat Kanserinin Belirti ve Semptomları. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-symptoms.html>. Erişim tarihi: 12.10.2017
41. Değirmenci M. Prostat Kanseri Hücre Hattında Oktreoid ve(-)- Gossypol (AT-101) Uygulamasının sitotoksik ve Apoptotik Etkileri (tez) İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi 2010.
42. Erken Teşhis. www.turkkanserderneği.org/cancer_types_submenu.php?id=12. Erişim tarihi: 13.10.2017.
43. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):184-204.
44. Balk SP, Ko Y-J, Bublely GJ. Biology of prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(2):383-91.
45. Hernández J, Thompson IM. Prostate- specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer*. 2004;101(5):894-904.
46. Brawer M, Benson M, Bostwick D, Djavan B, Lilja H, Semjonow A, et al. Prostate-specific antigen and other serum markers: current concepts from the World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Seminars in urologic oncology*; 1999.
47. Catalona WJ, Beiser JA, Smith DS. Serum free prostate specific antigen and prostate specific antigen density measurements for predicting cancer in men with prior negative prostatic biopsies. *The Journal of urology*. 1997;158(6):2162-7.

48. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery-what we have learned and where we are going. *The Journal of urology*. 1999;162(2):293-306.
49. Prostat Kanseri Testleri. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>. Erişim tarihi: 15.09.2017.
50. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *The Journal of urology*. 1993;150(1):110-4.
51. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A contemporary prostate cancer grading system: a validated alternative to the Gleason score. *European urology*. 2016;69(3):428-35.
52. Epstein JI. Pathology of prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate: prognostic influences of stage, tumour volume, grade, and margins of resection. *Sem Oncol*. 1994;21:527-41.
53. Meadows GG, Zhang H. Effects of alcohol on tumor growth, metastasis, immune response, and host survival. *Alcohol research: current reviews*. 2015;37(2):311.
54. Bielenberg DR, Zetter BR. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2015;21(4):267.
55. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of internal medicine*. 2004;255(5):538-61.
56. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6.
57. Aktaş S H, Akbulut H. Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2014;29(2).
58. Kalluri R. Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(6):422.
59. Andreasen PA, Kjølner L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase- type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *International journal of cancer*. 1997;72(1):1-22.
60. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669.

61. Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS, Dewhirst MW. Angiogenesis and oxygen transport in solid tumors. In: *Antiangiogenic agents in cancer therapy*. Humana Press, Totowa, NJ; 1999. p. 3-21.
62. Konukoğlu D, Turhan Ms. Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2005;36(1):42-8.
63. Erdem F, Gündoğdu M. Anjiogenesis ve anti-anjiogenik tedavi. *AÜTD*. 2005;37(1):1-6.
64. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. 1994;265(5178):1582-4.
65. Folkman J. Opinion: Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(4):273.
66. Sakurai T, Kudo M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology*. 2011;81(Suppl. 1):24-9.
67. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(8):a005090
68. Anjiyogenez Yolağı. <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-angiogenesis-resources/angiogenesis-signaling-interactive-pathway/pathways> angiogenesis. Erişim tarihi: 08.09.2017.
69. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4-25.
70. Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling? In control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):359.
71. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Seminars in thrombosis and hemostasis*; 2000: Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
72. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer research*. 2000;60(2):203-12.
73. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(19):7282-91.

74. Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene*. 2000;19(53):6122.
75. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The oncologist*. 2004;9(Supplement 1):2-10.
76. Fong G-H, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376(6535):66.
77. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra-and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine*. 2003;9(7):936.
78. Lee SH, Jeong D, Han Y-S, Baek MJ. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of surgical treatment and research*. 2015;89(1):1-8.
79. Grothey A, Ellis LM. Targeting angiogenesis driven by vascular endothelial growth factors using antibody-based therapies. *The Cancer Journal*. 2008;14(3):170-7.
80. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996;122(12):3829-37.
81. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling*. 2007;19(10):2003-12.
82. Delongchamps NB, Peyromaure M, Dinh-Xuan AT. Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Urology*. 2006;68(2):244-8.
83. Sato Y, Shimada T, Takaki R. Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;180(2):1098-102.
84. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of cell biology*. 1998;141(7):1659-73.
85. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):26-45.
86. Cao Y, Pettersson RF. Human acidic fibroblast growth factor overexpressed in insect cells is not secreted into the medium. *Growth factors*. 1990;3(1):1-13.

87. Cao Y, Cao R, Hedlund E-M. R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *Journal of molecular medicine*. 2008;86(7):785-9.
88. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
89. Kwabi-Addo B, Ozen M, Ittmann M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):709-24.
90. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(4):197-204.
91. Homsy J, Daud AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control*. 2007;14(3):285-94.
92. Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in the treatment of non-malignant diseases. *Journal of neuroimmune pharmacology*. 2014;9(2):69-79.
93. Wang D, Huang HS, Kazlauskas A, Cavenee WK. Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Research*. 1999;59(7):1464-72.
94. Henriksen R, Funa K, Wilander E, Bäckström T, Ridderheim M, Öberg K. Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Research*. 1993;53(19):4550-4.
95. Yu J, Ustach C, Kim H-RC. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2003;36(1):49-59.
96. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2004;59(2):S21-S6.
97. Coffey RJ, Goustin AS, Soderquist AM, Shipley GD, Wolfshohl J, Carpenter G, et al. Transforming growth factor α and β expression in human colon cancer lines: implications for an autocrine model. *Cancer research*. 1987;47(17):4590-4.
98. Roberts RB, Min L, Washington MK, Olsen SJ, Settle SH, Coffey RJ, et al. Importance of epidermal growth factor receptor signaling in establishment of adenomas and maintenance of carcinomas during intestinal tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(3):1521-6.

99. Carla C, Daris F, Cecilia B, Francesca B, Francesca C, Paolo F. Angiogenesis in head and neck cancer: a review of the literature. *Journal of oncology*. 2012;2012.
100. Govinden R, Bhoola K. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacology & therapeutics*. 2003;98(2):257-65.
101. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003;9(6):653.
102. Gupta MK, Qin R-Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2003;9(6):1144.
103. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(18):1350-8.
104. Kambhampati S, Ray G, Sengupta K, Reddy VP, Banerjee SK, Van Veldhuizen PJ. Growth factors involved in prostate carcinogenesis. *Front Biosci*. 2005;10:1355-67.
105. Krizkova S, Zitka O, Masarik M, Adam V, Stiborova M, Eckschlager T, et al. Clinical importance of matrix metalloproteinases. *Bratislavske lekarske listy*. 2011;112(8):435-40.
106. Yoon S-O, Park S-J, Yun C-H, Chung A-S. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2003;36(1):128-37.
107. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(3):178-93.
108. Fingleton B. MMPs 53. *Cancer Therapeutic Targets*. Springer; 2017. p.591-95.
109. Rundhaug JE. Matrix Metalloproteinases, Angiogenesis, and Cancer: Commentary re: AC Lockhart et al., Reduction of Wound Angiogenesis in Patients Treated with BMS-275291, a Broad Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(2):551-4.
110. Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P. Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *Journal of Experimental Medicine*. 1990;172(4):1019-23.
111. Wu Y-d, Zhou B. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer*. 2010;102(4):639.
112. Idriss HT, Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure- function relationship (s). *Microscopy research and technique*. 2000;50(3):184-95.

113. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2015;9(6):XE01.
114. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(3):165.
115. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1995;92(12):5510-4.
116. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Do Jung Y, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(41):38205-11.
117. Wei L-H, Kuo M-L, Chen C-A, Chou C-H, Lai K-B, Lee C-N, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 2003;22(10):1517.
118. Adams TE, Epa V, Garrett T, Ward C. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2000;57(7):1050-93.
119. Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*. 2000;19(49):5606.
120. Heldin C-H, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390(6659):465.
121. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer research*. 2000;60(5):1306-11.
122. Sigurdardottir O, Wiman B. Identification of a PAI-1 binding site in vitronectin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1994;1208(1):104-10.
123. Humbert L, Lebrun J-J. TGF-beta inhibits human cutaneous melanoma cell migration and invasion through regulation of the plasminogen activator system. *Cellular signalling*. 2013;25(2):490-500.
124. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental cell research*. 2001;264(1):29-41.

125. Bacus SS, Altomare DA, Lyass L, Chin DM, Farrell MP, Gurova K, et al. AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival. *Oncogene*. 2002;21(22):3532.
126. Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Current opinion in pharmacology*. 2003;3(4):371-7.
127. Freeman RS, Hasbani DM, Lipscomb EA, Straub JA, Xie L. SM-20, EGL-9 and the EGLN Family of Hypoxia-inducible Factor Prolyl Hydroxylases. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*. 2003;16(1).
128. Taxotere. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2004/020449s0281bl.pdf. Erişim tarihi: 20.10.2017.
129. Figgitt DP, Wiseman LR. Docetaxel. *Drugs*. 2000;59(3):621-51.
130. Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of cell science*. 2009;122(15):2579-85.
131. Miller ML, Ojima I. Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *The Chemical Record*. 2001;1(3):195-211.
132. Schimming R, Mason KA, Hunter N, Weil M, Kishi K, Milas L. Lack of correlation between mitotic arrest or apoptosis and antitumor effect of docetaxel. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1999;43(2):165-72.
133. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, et al. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *The Lancet*. 2000;356(9243):1728-33.
134. Vacca A, Ribatti D, Iurlaro M, Merchionne F, Nico B, Ria R, et al. Docetaxel versus paclitaxel for antiangiogenesis. *Journal of hematotherapy & stem cell research*. 2002;11(1):103-18.
135. Meng Z, Mitsutake N, Nakashima M, Starenki D, Matsuse M, Takakura S, et al. Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor- κ B inhibitor, enhances antitumor activity of taxanes in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology*. 2008;149(11):5357-65.
136. Zlotogorski A, Dayan A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer–I: Curcumin. *Oral oncology*. 2013;49(3):187-91.
137. Köhler FE. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte. 1887; p.17.

138. Kurkumin. <http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/searchcontent/all/curcumin/>.
Erişim tarihi: 18.10.2017.
139. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti F, Torti S. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(11):1631-52.
140. Zhou H, S Beevers C, Huang S. The targets of curcumin. *Current drug targets*. 2011;12(3):332-47.
141. Kurzrock R, Li L. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(16_suppl):4091-4091.
142. Prasad K, Mantha SV, Kalra J, Lee P. Prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis by garlic, an antioxidant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 1997;2(4):309-19.
143. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1765-73.
144. Talero E, Avila-Roman J, Motilva V. Chemoprevention with phytonutrients and microalgae products in chronic inflammation and colon cancer. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(26):3939-65.
145. Chendil D, Ranga RS, Meigooni D, Sathishkumar S, Ahmed MM. Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene*. 2004;23(8):1599
146. Narayan S. Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cells by targeting β -catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways. *Journal of molecular histology*. 2004;35(3):301-7.
147. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, Van Leeuwen R, Huang M-T, Fisher C, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Molecular Medicine*. 1998;4(6):376.
148. Chen H-W, Yu S-L, Chen J-J, Li H-N, Lin Y-C, Yao P-L, et al. Anti-invasive gene expression profile of curcumin in lung adenocarcinoma based on a high throughput microarray analysis. *Molecular pharmacology*. 2004;65(1):99-110.
149. Hong J, Ahn K, Bae E, Jeon S, Choi H. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2006;9(2):147.

- 150.Sundram V, Chauhan SC, Ebeling M, Jaggi M. Curcumin attenuates β -catenin signaling in prostate cancer cells through activation of protein kinase D1. *PloS one*. 2012;7(4):e35368.
- 151.Lin L, Shi Q, Nyarko AK, Bastow KF, Wu C-C, Su C-Y, et al. Antitumor agents. 250. Design and synthesis of new curcumin analogues as potential anti-prostate cancer agents. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49(13):3963-72.
- 152.Food and Drug Administration (FDA): Food for Human Consumption <http://accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.10>. Erişim tarihi: 25.10.2017.
- 153.ATCC Cell Lines. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx?geo_country=tr. Erişim tarihi: 10.08.2017.
- 154.Tali™ Apoptosis Kit. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10788>. Erişim tarihi: 15.07.2017.
- 155.Du B, Jiang L, Xia Q, Zhong L. Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*. 2006;52(1):23-8.
- 156.Hong J. Curcumin-induced growth inhibitory effects on HeLa cells altered by antioxidant modulators. *Food Science and Biotechnology*. 2007;16(6):1029-34.
- 157.Eom D-W, Lee JH, Kim Y-J, Hwang GS, Kim S-N, Kwak JH, et al. Synergistic effect of curcumin on epigallocatechin gallate-induced anticancer action in PC3 prostate cancer cells. *BMB reports*. 2015;48(8):461.
- 158.Boztas AO, Karakuzu O, Galante G, Ugur Z, Kocabas F, Altuntas CZ, et al. Synergistic interaction of paclitaxel and curcumin with cyclodextrin polymer complexation in human cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(7):2676-83.
- 159.Waghela BN, Sharma A, Dhumale S, Pandey SM, Pathak C. Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells. *PloS one*. 2015;10(2):e0117526.
- 160.Tong N, Zhang J, Chen Y, Li Z, Luo Y, Zuo H, et al. Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of doxorubicin in vitro. *Oncology letters*. 2012;3(6):1263-7.

161. Bassoy EY, Baran Y. Bioactive sphingolipids in docetaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2012;66(2):103-10.
162. Singh SK, Banerjee S, Acosta EP, Lillard JW, Singh R. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget*. 2017;8(10):17216.
163. Banerjee S, Singh SK, Chowdhury I, Lillard Jr JW, Singh R. Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. *Frontiers in bioscience*. 2017;9:235.
164. Bayet-Robert M, Kwiatowski F, Leheurteur M, Gachon F, Planchat E, Abrial C, et al. Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer. *Cancer biology & therapy*. 2010;9(1):8-14.
165. Hong JM, Park CS, Nam-Goong IS, Kim YS, Lee JC, Han MW, et al. Curcumin enhances docetaxel-induced apoptosis of 8505C anaplastic thyroid carcinoma cells. *Endocrinology and Metabolism*. 2014;29(1):54-61.
166. Yin H, Guo R, Xu Y, Zheng Y, Hou Z, Dai X, et al. Synergistic antitumor efficiency of docetaxel and curcumin against lung cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011;44(2):147-53.
167. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004;305(5684):626-9.
168. Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798.
169. Decaudin D, Marzo I, Brenner C, Kroemer G. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy. *International journal of oncology*. 1998;12(1):141-93.
170. Waterhouse NJ, Goldstein JC, Von Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD, Green DR. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *The Journal of cell biology*. 2001;153(2):319-28.
171. Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun X-M, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active 700-kDa and inactive 1.4-MDa apoptosome complexes. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(9):6067-70.

172. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, et al. Recruitment, activation and retention of caspases- 9 and- 3 by Apaf- 1 apoptosome and associated XIAP complexes. *The EMBO journal*. 2001;20(5):998-1009.
173. Singh M, Singh N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2009;325(1-2):107-19
174. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(5):967-74.
175. Shehzad A, Lee J, Lee YS. Curcumin in various cancers. *Biofactors*. 2013;39(1):56-68.
176. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*. 1996;86(3):353-64.
177. Hickey MM, Simon MC. Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia- inducible factors. *Current topics in developmental biology*. 2006;76:217-57.
178. Jones DT, Harris AL. Identification of novel small-molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 transactivation and DNA binding. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(9):2193-202.
179. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of cell science*. 2003;116(7):1319-26.
180. Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady- state levels of HIF- 1 α in normoxia. *The EMBO journal*. 2003;22(16):4082-90.

ŞEKİLLER VE TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ	SAYFA
Şekil 1. Prostat bezinin anatomisi	3
Şekil 2. Prostat bezinin zonal anatomisi.....	5
Şekil 3. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2014 yılındaki Türkiye verileri.....	5
Şekil 4. 2005 yılına ait T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan istatistik verileri.....	6
Şekil 5. Gleason derecelendirme sistemi.....	11
Şekil 6. Metastatik süreç	12
Şekil 7. Anjiyogenez basamakları	14
Şekil 8. Damarsal bileşenler latent haldeyken, aktivatör (pro-anjiyogenik faktörler) ve inhibitörler (anti-anjiyogenik faktörler) arasındaki denge. (b) Anjiyogenik uyarıların artışı ve inhibitörlerin azalışıyla anjiyogenezin başlatılması	15
Şekil 9. Anjiyogenez yolağı	17
Şekil 10. VEGF ailesinin vaskülogenez, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezdeki moleküller	19
Şekil 11. PCa progresyonunda VEGF'in rolü	20
Şekil 12. PDGF ve reseptör etkileşimleri	21
Şekil 13. Dositaksel' in yapısal formülü.....	27
Şekil 14. <i>Curcuma longa</i>	28
Şekil 15. <i>Curcuma longa</i> rizomunun toz hali.....	29
Şekil 16. Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı	29
Şekil 17. Kurkuminin kanser gelişimini ve progresyonu inhibe etmesi ve maligniteye giden yolda birden fazla adımı hedeflemesi	30

Şekil 18. Anjiyogenez yolağının kurkumin tarafından bastırılması.....	31
Şekil 19. (a) PC-3 (ATCC ®CRL-1435) ve (b) DU-145 (ATCC ® HTB-81) hücre hatlarının ışık mikroskopundaki görüntüleri (X20)	33
Şekil 20. (a) İnvirt mikroskop, (b) 37°C’de %5 CO ₂ içeren inkübatör.....	36
Şekil 21. (a) 96 kuyucuklu plakaya hücre ekimi, (b) Enzimatik boyanın DMSO ile çözdürülmesi.....	39
Şekil 22. TALİ cihazı	41
Şekil 23. (a) Soğutmalı santrifüj, (b) Nanodrop cihazı	43
Şekil 24. PCR cihazı.....	44
Şekil 25. VEGF-A Human ELİSA, standart eğri grafiği	49
Şekil 26. Standardın seri sulandırılması	50
Şekil 27. HIF-1 α ELİSA, standart eğri grafiği	51
Şekil 28. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 1,5-50 μ M doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	53
Şekil 29. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 1,5-50 μ M doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	54
Şekil 30. Kurkumin’in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması.....	55
Şekil 31. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 1,5-50 μ M doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	56
Şekil 32. Kurkumin’in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	57
Şekil 33. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dostaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	60
Şekil 34. Dostaksel’in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	61
Şekil 35. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dostaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama \pm standart sapma	62

Şekil 36. Dosetaksel'in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	63
Şekil 37. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma	64
Şekil 38. Dosetaksel'in PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	65
Şekil 39. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ı. 3,125 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle Kurkumin'in IC ₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.....	69
Şekil 40. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ı. 3,125 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle Kurkumin'in IC ₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.....	71
Şekil 41. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ı. 3,125 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin. PC3 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle Kurkumin'in IC ₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.....	73
Şekil 42. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma	76
Şekil 43. Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	77

Şekil 44. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma	78
Şekil 45. Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	79
Şekil 46. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma	80
Şekil 47. Kurkumin'in DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	81
Şekil 48. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma	84
Şekil 49. Dosetaksel'in DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	85
Şekil 50. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma	86
Şekil 51. Dosetaksel'in DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	87
Şekil 52. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma	88
Şekil 53. Dosetaksel'in DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulaması sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri	89
Şekil 54. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin i. 3,125 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saat süreyle Kurkumin'in IC ₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.....	93

Şekil 55. Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte, DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 24 saatlik uygulama sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri.....	94
Şekil 56. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin ı. 3,125 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin. DU-145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saat süreyle Kurkumin'in IC ₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konstantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.....	95
Şekil 57. Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte, DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 48 saatlik uygulama sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri.....	96
Şekil 58. a. Kontrol b. 400 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin c. 200 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin d. 100 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin e. 50 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin f. 25 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin g. 12,5 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin h. 6,25 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin ı. 3,125 nM Dosetaksel + 50µM Kurkumin. DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saat süreyle Kurkumin'in IC ₅₀ dozu ile Dosetaksel'in 3,125-400 nM doz aralıklarında değişen 8 farklı konsantrasyondaki dozunun birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi. MTT testi plağı, veriler % canlılık ortalama ± standart sapma.....	97
Şekil 59. Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte, DU 145 prostat kanseri hücre serisinde 72 saatlik uygulama sonrasında MTT testi sonuçları kullanılarak yapılan probit analizi ve IC ₅₀ değeri .	98
Şekil 60. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Dosetaksel c) 70 nM Dosetaksel.....	101
Şekil 61. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup ± SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. n=3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$	102
Şekil 62. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 50 µM Kurkumin.....	103
Şekil 63. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup ± SH için yüzdelerin	

ortalama değerleri olarak verilmiştir. *, kontrole kıyasla n=3; T-Test $P_{\text{canlı}} < 0,0001$, $P_{\text{ölü}} = 0,003$, $P_{\text{apoptotik}} < 0,0001$	104
şekil 64. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin c) 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin	105
şekil 65. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup ± SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. n=3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$	106
şekil 66. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde PC3 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Dosetaksel c) 70 nM Dosetaksel.....	108
şekil 67. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup ± SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. n=3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$	109
şekil 68. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde PC3 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 50 µM Kurkumin.....	110
şekil 69. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup ± SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. *, kontrole kıyasla n=3; T-Test $P_{\text{canlı}} < 0,0001$, $P_{\text{apoptotik}} < 0,0001$	111
şekil 70. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizde PC-3 prostat kanseri hücre hattına ait canlı, ölü ve apoptotik hücre görüntüleri. Annexin V ve Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu histogramları a) Kontrol b) 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin c) 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin.....	112
şekil 71. TALİ görüntü tabanlı sitometre analizinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında saptanan canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup ± SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. n=3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$	113
şekil 72. Yara iyileştirme deneyinde PC3 prostat kanseri hücre hattına ait taşıt madde uygulanan grubun 0.-12. ve 24. saatlerde hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	115

Şekil 74. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Dosetaksel uygulaması yapılan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	116
Şekil 75. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 50 µM Kurkumin uygulaması yapılan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	116
Şekil 76. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 35 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin kombinasyonu uygulanan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	117
Şekil 77. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin kombinasyonu uygulanan PC3 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	117
Şekil 78. Yara iyileştirme deneyinde, PC3 prostat kanseri hücre hattında göç eden hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. N = 3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$	118
Şekil 79. Yara iyileştirme deneyinde DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait taşıyıcı madde uygulanan grubun 0.-12. ve 24. saatlerde hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	119
Şekil 80. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 35 nM Dosetaksel uygulaması yapılan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	120
Şekil 81. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Dosetaksel uygulaması yapılan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	120
Şekil 82. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 50 µM Kurkumin uygulaması yapılan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	121
Şekil 83. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 35 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin kombinasyonu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	121
Şekil 84. Yara iyileştirme deneyinde 0.-12. ve 24. saatlerde 70 nM Dosetaksel+50 µM Kurkumin kombinasyonu uygulanan DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait, hücre göçü görüntüleri A) 2 boyutlu B) 3 boyutlu.....	122

Şekil 85. Yara iyileştirme deneyinde, DU 145 prostat kanseri hücre hattında göç eden hücrelerin yüzdesi. Tüm veriler her grup \pm SH için yüzdelerin ortalama değerleri olarak verilmiştir. N = 3; Anova-Duncan Test $p \leq 0.05$	123
Şekil 86. PC 3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Doseetaksel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri kullanılarak oluşturulan ekspresyon skorlarına ait başlıca bileşen analizi, hiyerarşik sınıflandırma analizi ve sıcaklık haritası. Gruplar D: 35 nM Doseetaksel, DD:70 nM Doseetaksel, C: 50 μ M Kurkumin, CD:35 nM Doseetaksel + 50 μ M Kurkumin, CDD: 70 nM Doseetaksel + 50 μ M Kurkumin.....	125
Şekil 87. Du 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Doseetaksel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri kullanılarak oluşturulan ekspresyon skorlarına ait başlıca bileşen analizi, hiyerarşik sınıflandırma analizi ve sıcaklık haritası. Gruplar D: 35 nM Doseetaksel, DD:70 nM Doseetaksel, C: 50 μ M Kurkumin, CD:35 nM Doseetaksel + 50 μ M Kurkumin, CDD: 70 nM Doseetaksel + 50 μ M Kurkumin.....	128
Şekil 88. DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait VEGF-A protein miktarlarının relatif kat artış grafiği	130
Şekil 89. DU 145 prostat kanseri hücre hattına ait HIF-1 α protein miktarlarının relatif kat artış grafiği	131
Şekil 90. PC3 prostat kanseri hücre hattına ait VEGF-A protein miktarlarının relatif kat artış grafiği	132
Şekil 91. PC3 prostat kanseri hücre hattına ait HIF-1 α protein miktarlarının relatif kat artış grafiği	132

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Gleason derecelendirme sisteminde, skor gruplandırılması	11
Tablo 2. Yeni Gleason derecelendirme sistemi	12
Tablo 3. Besi ortamı içeriği	35
Tablo 4. Gen isimleri, primer baz dizileri ve uzunlukları.....	45
Tablo 5. ELİSA plaka düzeni	48
Tablo 6. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulmasının hücre canlılığına etkisi	58
Tablo 7. Kurkumin doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.	59
Tablo 8. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi	66
Tablo 9. Dosetaksel doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu.....	67
Tablo 10. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel konsantrasyonlarının 50 µM Kurkumin ile birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi.....	74
Tablo 11. Dosetaksel+Kurkumin'in doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu....	75
Tablo 12. DU 145 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 1,5-50 µM doz aralıklarında Kurkumin uygulamasının hücre canlılığına etkisi.....	82
Tablo 13. Kurkumin doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu	83
Tablo 14. DU 145 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM aralıklarında Dosetaksel uygulamasının hücre canlılığına etkisi	90

Tablo 15. Dosetaksel doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu	91
Tablo 16. DU 145 prostat kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,125-400 nM doz aralıklarında Dosetaksel konsantrasyonlarının 50µM Kurkumin ile birlikte uygulanmasının hücre canlılığına etkisi.....	99
Tablo 17. Dosetaksel ve Kurkumin'in birlikte uygulanmasının doz-zaman ilişkisine ait Pearson Korelasyon tablosu	100
Tablo 18. DU-145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dosetaksel ve 70 nM Dosetaksel uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri.....	102
Tablo 19. DU 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri.....	104
Tablo 20. DU 145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri....	106
Tablo 21. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dosetaksel ve 70 nM Dosetaksel uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri.....	109
Tablo 22. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri.....	111
Tablo 23. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle 35 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin ve 70 nM Dosetaksel + 50 µM Kurkumin uygulaması sonucunda TALİ görüntü tabanlı sitometre analizi ile belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları ve yüzdeleri....	113
Tablo 24. PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Dosetaksel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri.....	126
Tablo 25. Du-145 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süreyle Dosetaksel, Kurkumin ve kombine ilaç uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri.....	129

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında İstanbul ilinin Fatih ilçesinde doğdum. 2011 yılında Gürlek Nakipoğlu Lisesi'nden mezun oldum.2011 yılında Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2015 yılında Lisans eğitimimden ikincilikle mezun oldum. 2015 Eylül ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

EKLER

Kimyasal Sarf ve Diğer Malzemeler

Malzeme Adı	Marka
DMEM	Multicell (319-020-Cl)
EMEM	Multicell (320-02g-Cl)
HAM'S F-12	Multicell (318-010-Cl)
%0.25 Tripsin-Edta	Gibco
L-Glutamin	Gibco
Penicillin Streptomycin	Gibco
Fetal Bovine Serum	Gibco
Etanol	Merck (603-002-00-15)
Dimetil Sülfoksit	Merck (67-68-5)
Dimetil Sülfoksit	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Dnase/Rnase İçermeyen Su	Invitrogen By Life Technologies, ABD
25 cm ² 'lik Hücre Kültür Kabı	Nest, Çin
75 cm ² 'lik Hücre Kültür Kabı	Nest, Çin
96 Kuyucuklu Hücre Kültür Kabı	Ultra Cruz, ABD
6 kuyucuklu Hücre Kültür Kabı	Ultra Cruz, ABD
96 Kuyucuklu Reaksiyon Plakası	Applied Biosystems By Life Technologies, ABD
Kryojenik Vial	Nest, Çin
5 ml'lik Serolojik Pipet	Nest, Çin
10 ml'lik Serolojik Pipet	Nest, Çin
Curcumin	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Dosetaksel	Koçak Farma, Türkiye
Hücre Proliferasyon Ölçüm Kiti (MTT)	Biomatik (A-3338-56)
PCR Strip Tüpleri (0.2 ml)	Axygen Biotechnology, ABD
cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems By Life Technologies, ABD

RNA İzolasyon Kiti	Ambion By Life Technologies, ABD
Cyber Green Master Mix	Applied Biosystems By Life Technologies, ABD
15 ml'lik Falkon Tüpler	Nest, Çin
50 ml'lik Falkon Tüpler	Nest, Çin
1.5 ve 2 ml'lik Tüpler	Eppendorf, Almanya
PBS	Life Technologies, ABD
Tali® Apoptosis Kit–Annexin V AlexaFluor® 488 and Propidium Iodide	Life Technologies, ABD
Human HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha) ELISA Kit	Elabscience, Çin
Human VEGF-A Platinum ELISA Kit	Affymetrix eBioscience, Avusturya