JUGLON VE FLUOROURACİL KOMBİNASYONLARININ LNCAP VE PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zehra Nur DÜZEN

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLON VE FLUOROURACİL KOMBİNASYONLARININ LNCAP VE PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zehra Nur DÜZEN
0000-0002-2394-6048

Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ
0000-0003-1620-1918
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

JUGLON VE FLUOROURACİL KOMBİNASYONLARININ LNCAP VE PC-3 PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zehra Nur DÜZEN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

1,4-naftokinonlar doğada yaygın olarak bulunan ve antikanser aktivitesi bulunan fenolik bileşiklerdir. Bu çalışmada juglon ve 5-Florourasilin ayrı ayrı ve kombinasyonlarının prostat kanseri üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla her iki maddenin ayrı ayrı ve kombinasyonlarının LNCaP (prostat kanseri lenf metastazı) ve PC3 (prostat kanseri kemik metastazı) hücre hatlarında sitotoksik etkileri XTT testi, genotoksik etkileri komet testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca olası hücre içi reaktif oksijen türevlerinin seviyeleri DCF-DA kullanılarak, hücre ölüm şekli ise Annexin V yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

İki hücre hattında da XTT testi ile belirlenen 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglon $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarının uygulandığı kombinasyon gruplarında canlılık oranlarında artan dozlarda anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Komet testinde juglon ve 5- FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarına maruz bırakılan LNCaP ve PC3 hücre hatlarında kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti hesaplanmış ve elde edilen sonuçlarda kontrol grubuna göre anlamlı artışlar olduğu saptanmıştır. Hücre hatlarında kombinasyon için 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonu ile juglon $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları kullanılarak yapılan komet testinde de hem kontrol hemde tek başına 5-FU grubu ile yapılan karşılaştırmada anlamlı artışlar gözlenmiştir. ROS testinde hücre hatlarında juglon ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombinasyonları aynı konsantrasyonlar kullanılarak uygulanmıştır. Bunun sonucunda her iki hücre hattında da anlamlı artışlar olduğu belirlenmiştir. Kullanılan hücre hatlarında juglonun tek başına ve 5-FU ile kombinasyonunun aynı konsantrasyonlar kullanılarak uygulandığı Annexin V testi apoptotik potansiyelin doz artışı ile anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Juglon, 5-Florourasil, Prostat kanseri, kombine tedavi, sitotoksisite, genotoksisite, ROS, apoptoz, LNCaP, PC3.

2022, xv + 95 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTİGATİON OF THE INVİTRO CYTOTOXİC AND GENOTOXİC EFFECTS OF JUGLONE AND FLUOROURACİL COMBİNATİONS ON LNCAP AND PC-3 PROSTATE CANCER CELLS

Zehra Nur DÜZEN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

1,4-naphthoquinones are phenolic compounds widely found in nature and have anticancer activity. This study aimed to investigate the *in vitro* cytotoxic and genotoxic effects of juglone and 5-Fluorouracil separately and in combination on prostate cancer. For this purpose, the cytotoxic and genotoxic effects of both substances separately and in combinations on LNCaP (prostate cancer lymph metastasis) and PC3 (prostate cancer bone metastasis) cell lines were evaluated using XTT and comet test, respectively. In addition, the levels of possible intracellular reactive oxygen derivatives were determined using DCF-DA, and the mode of cell death was determined using the Annexin V method. The 5-FU IC12,5 concentration determined by the XTT test was kept constant in both cell lines. A significant decrease was observed in the viability rates at increasing doses in the combination groups in which the juglone IC12,5, IC25, and IC50 concentrations were applied. In the comet test, tail length, tail % DNA, and olive tail moment were calculated in LNCaP and PC3 cell lines exposed to juglone and 5-FU (IC12,5, IC25, IC50, and IC75), in which significant increases were observed compared to the control group. By using 5-FU IC12.5 concentration and juglone IC12.5, IC25, and IC50 concentrations for combination in cell lines, significant increases were noticed in comparison with both the control and 5-FU groups alone. In the ROS test, juglone and 5-FU were applied separately and in combinations using the same concentrations in cell lines. As a result, significant increases were determined in both cell lines. In the cell lines used, the Annexin V test in which juglone alone and in combination with 5-FU was applied using the same concentrations showed that the apoptotic potential increased significantly with the increase in dose.

Key words: Juglone, 5-Fluorouracil, Prostate cancer, combined therapy, cytotoxicity, genotoxicity, ROS, apoptosis, LNCaP, PC3.
2022, xv + 95 pages.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tecrübesi ve birikimi ile beni başarılı olmam yönünde destekleyen, bana güvenen ve olumlu düşüncelerini esirgemeyen, bu süreçte meydana gelen tüm aksiliklere karşı beni cesaretlendirerek mücadele etmeyi ve çalıştığım alanda tecrübe kazanmamı sağlayan, öğrencisi olmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a,

Yüksek Lisans sürecimde ilgisi ve pozitif enerjisiyle desteğini gördüğüm kıymetli Hocam Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ'a

Bu süreçte bana fikirleriyle destek olan, sabırlı ve anlayışlı tutumu ile yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Özgür VATAN'a

Tez çalışmamda kullandığım hücre hatlarının temin edilmesinde ve kültür aşamasında bana yardım eden sevgili Dr. Öğr. Üyesi Işıl Ezgi ERYILMAZ'a ve hücre kültüründe yardımcı olmasının yanı sıra akademik süreç dışında da içtenliğiyle yanımda olan değerli Hocam Dr. Öğr. Üyesi Burcu Erbaykent TEPEDELEN'E,

Çalışmam boyunca ve akademik hayatın dışında samimiyeti ve olumlu düşünceleriyle yanımda olan, yardımını esirgemeyen, birlikte zorlukların üstesinden geldiğimiz arkadaşım Carine Allounan'a,

Bu süreçte fikir ve önerileriyle beni destekleyen çalışma arkadaşlarım Huzeyfe HURİYET, Abdelaziz ASSOUYOUTI ve aynı laboratuvarda olmasak da yanımda olan Buket EYLEK'e

Hayatımın her alanında beni yetiştiren, başarılı, dürüst ve vicdanlı bir insan olmam konusunda maddi ve manevi tüm imkanlarını karşılıksız sunan, evlatları olduğum için kendimi ayrıcalıklı hissettiğim kıymetli anneme, babama ve enerjisiyle bana güç veren kardeşim Tuba DÜZEN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zehra Nur DÜZEN
/ /

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi
ABSTRACT vii
TEŞEKKÜR viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ x
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Kanser 3
2.2. Prostat 7
2.3. Prostat Kanseri 9
2.3.1. Prostat Kanseri Belirti ve Bulgular 13
2.3.2. Prostat Kanseri Evrelendirme ve Tedavi Yöntemleri 15
2.4. Doğal Bileşiklerin Prostat Kanseri Üzerindeki Etkisi 16
2.4.1. Juglon. 18
2.5. 5-Fluorouracil 22
3. MATERYAL ve YÖNTEM 25
3.1. Kullanılan Ekipmanlar ve Sarf Malzemeler 25
3.2. Kullanılan Hücre Hatları 27
3.4. 5-Florouasil Çözeltisinin Hazırlanması 30
3.5. XTT Testi 31
3.6. Komet Testi 32
3.7. ROS Testi 34
3.8. Annexin V Yöntemi İle Hücre Ölüm Şeklinin Belirlenmesi 35
3.9. İstatistiksel Analiz 36
4. BULGULAR 37
4.1. XTT Bulguları 37
4.1.1. LNCaP Hücre Hattı İçin XTT Test Bulguları 37
4.1.2. PC3 Hücre Hattı İçin XTT Test Bulguları 38
4.2. Komet Testi Bulguları 40
4.2.1. LNCaP Hücre Hattı İçin Komet Testi Bulguları 40
4.2.2. PC3 Hücre Hattı İçin Komet Test Bulguları 50
4.3. ROS Testi Bulguları 59
4.3.1. LNCaP Hücre Hattı İçin ROS Testi Bulguları 59
4.3.2. PC3 Hücre Hattı İçin ROS Testi Bulguları 63
4.4. Anneksin V Test Bulguları 67
4.4.1. LNCaP Hücre Hattı İçin Anneksin V Bulguları 67
4.4.2. PC3 Hücre Hattı İçin Anneksin V Bulguları 69
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 72
KAYNAKLAR 84
ÖZGEÇMİŞ 95

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
^0C	Celcius
gr	Gram
kg	Kilogram
mA	Miliamper
mg	Miligram
ng	Nanogram
ß	Beta
V	Volt
Mg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
5-FU	5-Fluorouracil
7-AAD	7-Aminoaktinomisin D
A549	İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
Akt	Protein Kinaz B
B16F1	İnsan Melanoma Hücre Hattı
C6	Rat Glioma Hücre Hattı
Ca	Kalsiyum
CO_2	Karbondioksit
ÇK	Çözücü Kontrol
DCF	Dichlorofluorescein
DCF-DA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate
DCFH	Dichlorodihydrofluorescin
dH_2O	Distile Su
dk	Dakika
DMSO	Dimetik Sülfoksid
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DU-145	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
EMT	Epitelyal Mezenkimal Transfer
EtBr	Etidyum Bromür
FBS	Fetal Bovine Serum
FdUMP	Florodeoksi üridin monofosfat
FdUTP	Florodeoksi üridin trifosfat
FUTP	Floro ürüdin trifosfat
H69	İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
HCT-15	İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı

HeLa	İnsan Rahim Ağzı Kanseri Hücre Hattı
IARC	Internatıonal Agency For Research On Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
IC	Inhibitör Konsantrasyon
LHRH	Luteinizing hormone releasing hormone
LMA	Low Melting Agarose
LNCaP	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
LS-174T	İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MDA-MB-231	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MDA-MB-435	İnsan Melanoma Hücre Hattı
MIA- Paca- 2	İnsan Pankreas Kanseri Hücre Hattı
Na_2EDTA	Sodyum Etilendiamin Tetra Asetik Asit
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NK	Negatif Kontrol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC3	İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
Pin1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PK	Pozitif Kontrol
PS	Fosfatidilserin
PSA	Prostate Spesific Antigene
RFU	Relative fluorescence units
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SGC-7901	İnsan Mide Kanseri Hücre Hattı
U251	İnsan Glioma Hücre Hattı
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. 2020 yılında dünya çapında her yaştan erkekler için tahmini vaka sayıları 4
Şekil 2. 2. 2020 yılında dünya çapında her yaştan kadınlar için tahmini vaka sayıları 4
Şekil 2. 3. Prostat anatomik yapısı (TZ: geçiş bölgesi, PZ: periferik bölge, AFMS: anterior fibromüsküler stroma) 8
Şekil 2. 4. 2020 yılında Türkiye'de her yaştan erkekler için vaka sayıları 10
Şekil 2. 5. Juglonun Kimyasal Yapısı 19
Şekil 2. 6. 5- Florourasil'in Kimyasal Yapısı 23
Şekil 3. 1. LNCaP Hücre Hattı. 28
Şekil 3. 2. PC3 Hücre Hattı 28
Şekil 3. 3. Çalışmamızda kullanılan Juglon (5-hidroksi, 1-4 naftakinon) 29
Şekil 3. 4. Çalışmada kullanılan antineoplastik ilaç. 30
Şekil 3. 5. Canlı hücreler tarafından XTT metobolizasyonu sonucunda suda çözünebilen formozan ürünlerinin oluşumu 31
Şekil 4. 1. Juglon ve 5-FU'nun kombinasyonlarının LNCaP hücre hattında yüzde canlılık değerleri üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (5-FU IC12 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 38
Şekil 4. 2. Juglon ve 5-FU'nun kombinasyonlarının LNCaP hücre hattında yüzde canlılık değerleri üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (5-FU IC12 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 39
Şekil 4. 3. LNCaP ve PC3 hücre hatlarında juglonun (24 saat) IC50 değerleri ve 5-FU'nun (48 saat) IC50 değerleri(ortalama ± standart sapma). 40
Şekil 4. 4. Juglonun LNCaP hücre hattında kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 41
Şekil 4.5. Juglonun LNCaP hücre hattında kuyruk %DNA değerleri üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)) 42
Şekil 4.6. Juglonun LNCaP hücre hattında olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)) 43
Şekil 4. 7. 5-FU'nun LNCaP hücre hattında kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)) 44
Şekil 4. 8. 5-FU'nun LNCaP hücre hattında kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)) 45
Şekil 4. 9. 5-FU'nun LNCaP hücre hattında olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)) 46
Şekil 4.10. Juglon ve 5-FU kombinasyonlarının LNCaP hücre hattında kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (*p<0,05, ***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa},p<0,001)). 47
Şekil 4. 11. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun LNCaP hücre hattında % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 48

Şekil 4. 12. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun LNCaP hücre hattında % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 49
Şekil 4. 13. PC3 hücre hattında juglonun kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).50
Şekil 4. 14. PC3 hücre hattında juglonun kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).51
Şekil 4. 15. PC3 hücre hattında juglonun olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark(***p<0,001) . 52
Şekil 4. 16. PC3 hücre hattında 5-FU'nun kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 53
Şekil 4. 17. PC3 hücre hattında 5-FU'nun kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).54
Şekil 4. 18. PC3 hücre hattında 5-FU'nun olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).55
Şekil 4. 19. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonunun kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 56
Şekil 4. 20. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonunu kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 57
Şekil 4. 21. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonunun olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 58
Şekil 4. 22.LNCaP hücre hattında juglonun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 60
Şekil 4. 23. LNCaP hücre hattında 5-FU'nun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 61
Şekil 4. 24. LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 62
Şekil 4. 25. PC3 hücre hattında juglonun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001).64
Şekil 4. 26.PC3 hücre hattında 5-FU'nun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 65
Şekil 4. 27. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5, ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 66

Şekil 4. 28. LNCaP hücre hattında juglonun apoptotik etkisi (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 68
Şekil 4. 29. LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve tüm gruplar arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 69
Şekil 4. 30. PC3 hücre hattında juglonun apoptotik etkisi (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)). 70
Şekil 4. 31. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve tüm gruplar arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)). 71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3. 1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar 25
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler..... 26
Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının karakterizasyonları..... 27

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PC), dünyadaki erkek ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir ve 65-74 yaş arasındaki erkekler arasında en sık teşhis edilen kanserdir. Prognoz etmenleri olarak ırk, yaş, yaşam koşulları ve aile öyküsü sayılabilir (Bassetto ve diğerleri, 2016). Prostat kanserinin erken evrede belirtisi yoktur. Fakat yıllık muayene ve tetkiklerle erken teşhis mümkündür. Prostat spesifik antijen (PSA) prostat kanseri taramalarında ön plandadır. PSA değeri yıllık taramada > 10 ng/mg üzerinde ise prostat biyopsisi gereklidir (Altınbaş, 2005). Günümüzde prostat kanser tedavisi androjen yoksunluğu, cerrahi, radyasyon, kemoterapi, endokrin terapi ve radikal prostektomiyi içermektedir. Prostat kanser gelişimi büyük oranda androjenlere bağımlıdır, bu nedenle androjen etkilerinin engellenmesi olumlu sonuçlar verebilir. Bu sonuçlara anti-androjen ilaçlarının tek başına veya kastrasyonla birlikte kullanılarak, androjen reseptörünün antagonize edilmesiyle ulaşılabilir (Bassetto ve diğerleri, 2016).

5-Fluorourasil pirimidin analoğu olarak bilinen ve katı tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Tüm kemoterapi ilaçlarında olduğu gibi 5-FU'nun bilinen toksik etkileri mevcuttur (Thalambedu ve Khan, 2019). Antikanser ilaçların kullanımı kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen bir mekanizmaya dayanır. Bu sırada hücrede antikanser mekanizmaya karşı direnç oluşumu gibi bazı zorluklarla karşılaşılmaktadır.

Doğal kaynaklardan elde edilen ve antikanser etkiye sahip bileşiklerin kemoterapötik ajanlara göre daha etkin ve güvenli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Antikanser özelliği *in vitro* ve *in vivo* testlerle sabitlenen doğal bileşiklerin umut verici potansiyellerinin anlaşılması sonucunda bu alanda yapılan çalışmalar artmış durumdadır (Ortiz, Orellana ve Ratovitski, 2017).

Juglon (5-hidroksi-1,4 naftakinon), *Juglandaceae* familyasının farklı türlerinden elde edilen aktif bir naftakinondur. Yapılan çalışmalar juglonun çeşitli kanser hücre hatları üzerinde büyük oranda sitotoksik aktivite gösterdiğini ifade etmektedir. Juglonun sitotoksik aktivitesi, hücre içi hemostazın bozulması ile reaktif oksijen türevlerinin

indüklenmesiyle apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün gerçekleşmesine bağlanmaktadır. Ayrıca bazı kanser türlerinde aşırı ekspresyonu gözlenen Pin1'i inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Zhang, Zou, Duan, Wu ve Li, 2015).

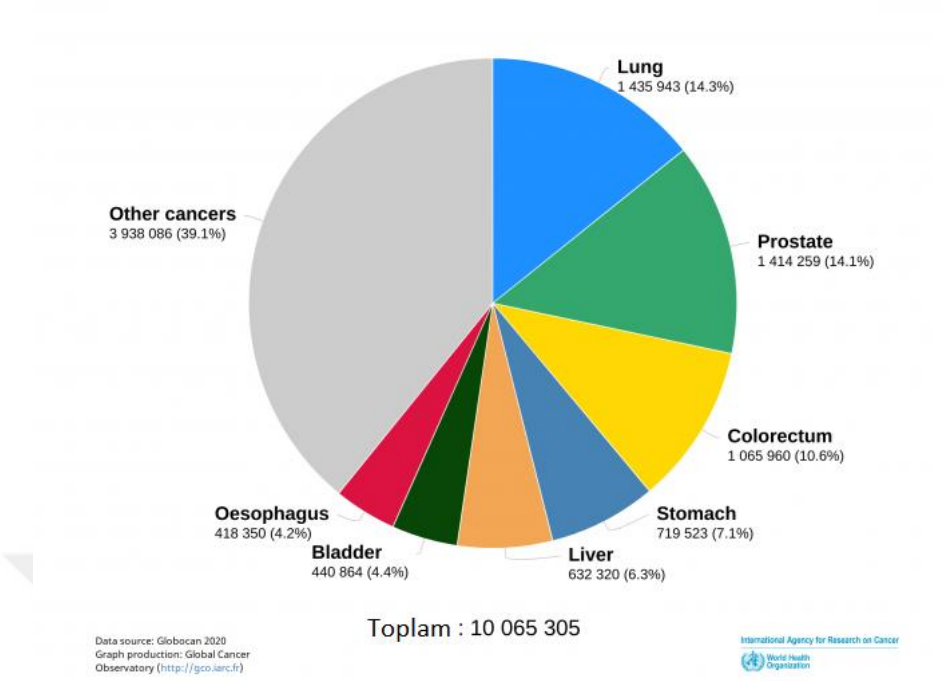
Juglonun, androjen bağımlı (LNCaP) ve androjen bağımsız (DU145) prostat kanser hücre hattı üzerinde farklı dozlarda uygulanmasıyla antikanser etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu maddenin LNCaP hücrelerinde kaspas 3 ve 9 aktivasyonunu artırarak apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Juglonun yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacı olan Doksorubisin ile kombinasyonu sonucunda sinerjik bir etki oluştuğu belirlenmiştir. A549 ve H69 hücre hatları üzerinde yapılan bu çalışmada ilaca dirençli hücrelerde juglonun doksorubisinin etkisini artırdığı ifade edilmiştir (Catanzaro, Greco, Potenza, Calcabrini ve Fimognari, 2018).

Son zamanlarda yapılan çalışmalara bakıldığında şiddetli yan etkilere neden olan kemoterapi ilaçlarının yerine etkinliği yüksek ve daha güvenilir olduğu düşünülen doğal bileşiklere yönelim söz konusudur. Bu konuda ilaç olabilme potansiyeli taşıyan bileşiklerin antikanser ilaçlarla kombine bir şekilde uygulanması ile ilaç dozunun azaltılması ve buna bağlı olarak yan etkilerin hafifletilmesi hedeflenmektedir.
Bu çalışmada doğal bir bileşik olan juglonun ve kemoterapide sık kullanılan antineoplastik bir ilaç olan 5-FU'nun *in vitro* sitotoksik, genotoksik, apoptotik ve ROS oluşturma potansitellerinin prostat kanseri hücre hatlarında karşılaştırılmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda model olarak erkeklerde yaygın olarak görülen metastatik prostat kanserinin lenf ve kemik metastazı ile çalışılması planlanmıştır. Bu amaçla seçilen androjen bağımlı prostat kanseri (LNCaP) ve androjen bağımsız prostat kanseri (PC3) hücre hatlarında çeşitli test yöntemleri uygulanmıştır. Juglon ve 5-FU bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyonlarının uygulanmasından oluşan bu çalışmada juglonun antikanser etkilerinin ortaya konulmasının dışında 5-FU ile sinerjitik bir etki göstererek etkinliğini artırdığı da belirlenmiştir. Sitotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla XTT test yöntemi kullanılmıştır. DNA hasarına yol açan genotoksik etkilerin belirlenmesi için comet test yöntemi uygulanmıştır. Bileşiklerin etki ettiği ölüm mekanizmasının belirlenmesi amacıyla Annexin V testi kullanılmıştır. Ayrıca hücre içi ROS seviyeleri DCFDA kullanılarak ölçülmüştür.

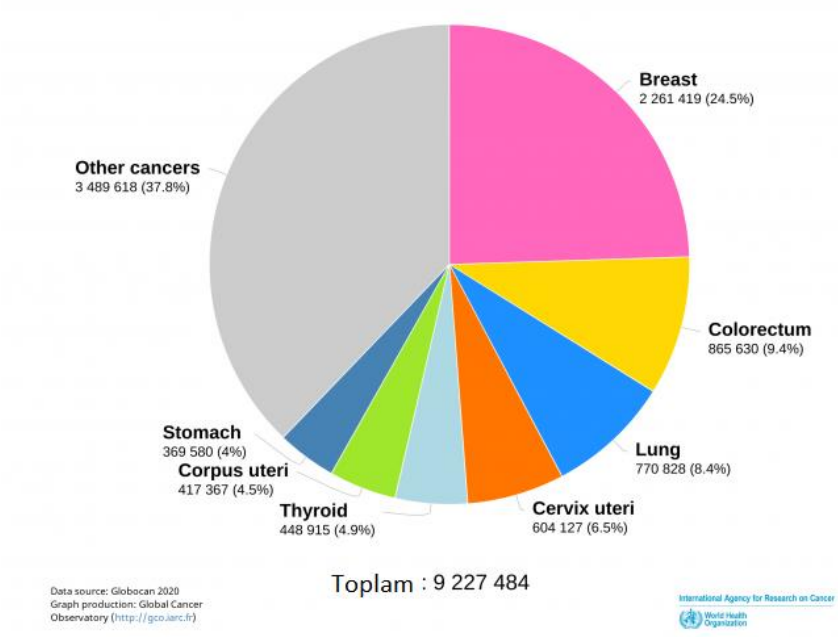
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin bölünme ve büyüme mekanizmalarını kontrol eden genlerin hasar görmesi sonucunda meydana gelen kompleks bir rahatsızlıktır. Kanseri tanımlayan en önemli özelliği, anormal hücre bölünmelerinin vücudun farklı bölgelerinde meydana gelmesi ve diğer organlara yayılabilmesidir. (Nayak ve Pal, 2010). Bu durumun bir süre devam etmesi sonucunda, hücrelerin aşırı miktarda çoğalması ve normalde apoptozla gerçekleşen hücre kaybıyla dengelenememesi gibi problemler ortaya çıkar. Kontrol kaybıyla aşırı miktarda çoğalan hücreler organizmanın farklı organlarında geri dönüşümsüz hasarlara neden olur (Nurbaki, 1983). Kanser, günümüzde artış gösteren vaka sayılarının ve ölümlerin nedenleri arasında ilk sıralarda yer alır (Şahin ve ark. 2000). Tüm veriler doğrultusunda kanser aslında önemli yükleri beraberinde getiren bir halk sağlığı sorunudur. Türkiye'deki en yaygın kanser türleri nin akciğer, meme, kolon, prostat ve mide kanseri olduğu belirlenmiştir. Kanser Türkiye'deki çeşitli sebeplere bağlı olarak gerçekleşen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yerini almaktadır (Donar, 2021). Ayrıca, kanser, hastalığın ve tedavi sürecinin getirdiği fiziksel, psikolojik ve sosyal sorunlar ile hastaların yaşam kalitesini büyük oranda azaltmaktadır (Bakar, 2017). 2030 yılı için, Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) bağlı bulunan Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) kanserin ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer alacağını tahmin etmektedir (Oylar ve Tekin, 2011). IARC, yayınladığı son verilerle kanser vakalarının 2020'de 19,3 milyon vakaya ve kansere bağlı ölümlerin 10 milyona yükseldiğini açıklamıştır (The Global Cancer Observatory [GLOBOCAN], 2020).



Şekil 2. 1. 2020 yılında dünya çapında her yaştan erkekler için tahmini vaka sayıları (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 2. 2. 2020 yılında dünya çapında her yaştan kadınlar için tahmini vaka sayıları (GLOBOCAN, 2020)

Karsinogenezin temelinde, hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmalarda çeşitli mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi sonucu hücrelerin kontrolsüz ve anormal bir şekilde çoğalması yer almaktadır (Kasap, 2010; Çoban ve Güran, 2013).
Normal hücrelerde bu anormal çoğalmanın önüne geçilmesini sağlayan kontrol mekanizmasında tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenler arasında dengeleyici bir mekanizma bulunmaktadır (Kasap, 2010). Tümör hücrelerine dönüşen hücreler, kanser gelişimi sırasında çok sayıda farklı fenotipik özellikler edinir. Bu farklılaşmalar değişime uğrayan hücrelerin kısa süre içinde hızla bölünerek çevre dokulara metastaz yapmalarına neden olur. Tümör hücreleri yaşamlarını devam ettirmek için özgün bir mikro çevreye ihtiyaç duymadan metastaz yeteneklerini devam ettirebilirler (McCormick, 1999).

Bir hücreye malign fenotipik özellik kazandıran genlere "onkogen" denir. Onkogenler, normal hücrelerin tümör hücresine dönüşümün başlatma ve bu yönde devam ettirme yeteneğine sahiptirler (Yokuş ve Çakır, 2012). Viral onkogenlere veya hücresel onkogenlere homolog olan ve tipik olarak diferansiyasyon ve poliferasyonun kontrolü için esas olan proteinleri kodlayan normal hücre genleri ise "proto-onkogenlerdir" (Casciato, 2004). Protoonkogenler kromozomal olarak yeniden düzenlenme, çeşitli mutasyonlar veya gen amplifikasyonu gibi moleküler farklılaşmaların devamında onkogenlere dönüşebilirler (Yokuş ve Çakır, 2012). Yapılan araştırmalarla kanserin, hem dünyada hem de Türkiye'de gerçekleşen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada bulunduğu belirlenmiştir. Bu sıralamada birinci sırada yer alan ise kalp hastalıklarıdır (Arı, Öğüt ve Döğer, 2017).
Kanserin ortaya çıkışında 250'den fazla gen tanımlanmıştır ve bu genlerin incelenmesi sonucunda hücresel çeşitli faaliyetlerin mekanizmalara etki etmesi ile kanser gelişiminin tetiklendiği düşünülmektedir. Bu faaliyetleri sürdüren mekanizmalar aynı zamanda hücrelerin normal bir şekilde yaşamını sürdürebilmesini ve çoğalabilmesini düzenlemektedir. Hücrenin normal aktivitesini sürdürmesini sağlayan bazı yolakların aktivitesindeki artış veya azalış hücrelerin kontrolsüz bir şekilde proliferasyon ve farklılaşma göstermesine neden olmaktadır. Aynı zamanda bu süreç boyunca farklılaşmanın blokasyonu, apoptozun azalması, doku yapısının değişmesi gibi kansere özgü bazı karakteristik özellikler meydana gelmektedir (Schulz, 2007).

Kanser oluşumunda meydana gelen tümörlerin patolojik olarak benign veya malign olduğunu belirlemek önemlidir. Çevre dokulara invazyon veya metastaz özelliği bulunmayan lokalize tümörler benign olarak ifade edilir. Çevre dokulara yayılabilme potansiyeli olan, lenf veya kan dolaşımıyla vücuda yayılan tümörler malign olarak tanımlanır. Kan dolaşımı veya lenfatik sistemle organizmanın çeşitli bölgelerinde çoğalma potansiyeli bulunan kanser hücrelerinin bu yayılma sistemi metastaz olarak tanımlanmaktadır. Metastaz yeteneği bulunan malign tümörler hastalığın seyrini hızlandırarak tedaviyi zorlaştırmaktadır (Cooper ve Hausman, 2006).

Kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz oluşumunda bu hücrelerden salınan proteaz ve çeşitli büyüme faktörlerinin büyük bir rolü bulunmaktadır. Proteaz denilen enzim grubu ekstraselüler matriksin yapısını bozar ve kanser hücrelerinin çeşitli organlara yayılmasına ortam hazırlar (Stetler-Stevenson, Aznavoorian ve Liotta, 1993).
Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri olan normal farklılaşma mekanizmasının bozulması, hücrelerin apoptoz yeteneğini kaybetmesi gibi önemli bir sorunun gelişimiyle paralel bir şekilde ilerlemektedir. Normal hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda oluşan ve tamir edilemeyen hasarlar hücrenin apoptoz olarak isimlendirilen kontrollü ölümüne yol açar. Kanserli hücreler apoptozis yoluyla elimine edilmeden kontrolsüz çoğalmalarını sürdürürler (Keeton ve Gould 2003).

Türkiye'de yaygın olması, sakatlık ve ölümleri beraberinde getirmesi sonucunda ekonomik açıdan ulusal bir yük olan kanser, öncelikli ve önemli bir halk sağlığı problemidir (Akdur, 1993).

Kanser hücreleri meydana geldiği organ ve mikroskop altında patolojik olarak incelenmelerine göre sınıflara ayrılırlar. Çeşitli tiplerde oluşabilen kanserlerin büyüme, bölünme ve yayılma biçimleri hızlarıyla doğru orantılı olacak şekilde farklılık gösterir. Bu farklılıkların hastalığın tedaviye verdiği cevabı da etkilemesi göz önünde bulundurularak kanser türüne özgü tedavi yöntemleri uygulanır (Kutluk ve Kars, 1992).

Kanser gelişimi tespit edilen doku morfolojik olarak bariz değişiklikler gösterir. Bu değişiklikler arasında hücre nükleusunda görülen sayı ve şekil değişiklikleri, artmış hücre

sayısı, dokuların karakteristik görünümünü kaybetmesi, doku yapısının bozularak sınırlarının belirsizleşmesi sayılabilir (Keeton ve Gould, 2003).

Genetik açıdan bakıldığı zaman kanserlerin %1 oranında genler yoluyla aktarıldığı bilinmektedir. Genetik aktarım yoluyla meydana gelen türler genelde çocukluk çağında gelişen kanserleri ifade etmektedir (Sharon ve Ephrat, 2003). Bu oranın dışında kalan %99'luk dilimde ise çevresel risk faktörleri olarak adlandırılan insanların günlük yaşamlarındaki çalışma koşulları, beslenme alışkanlıkları, maruz kaldıkları radyasyon ve kanserojen maddeler yer almaktadır (Oylar ve Tekin, 2011).

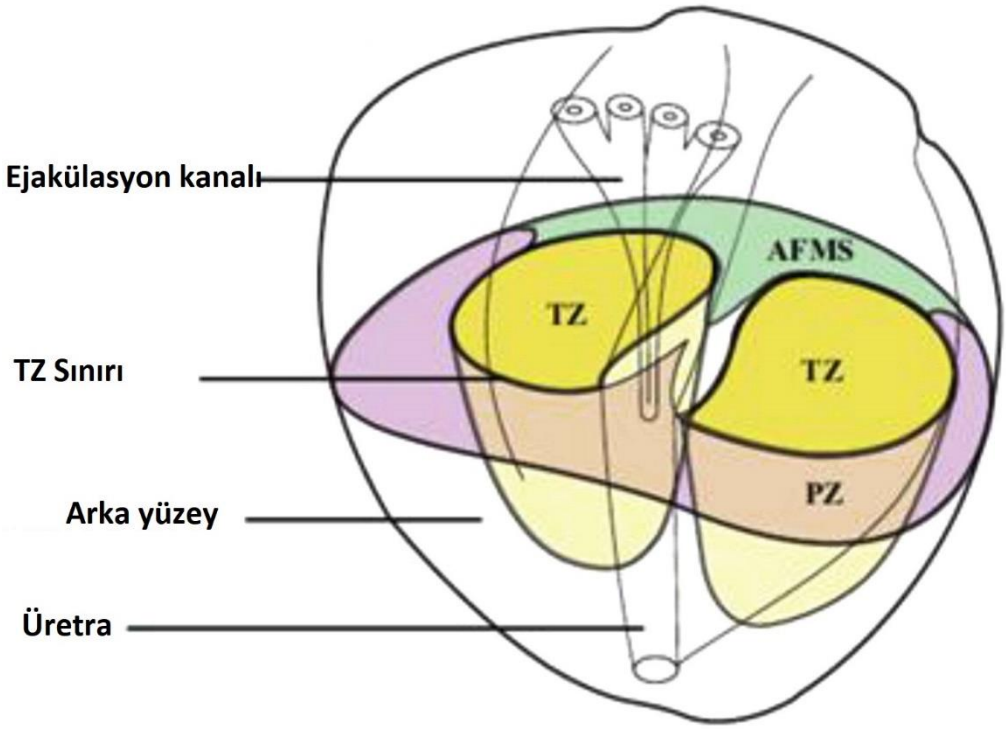
Kanser oluşumunun risk faktörleri arasında ilerleyen yaş, alkol ve sigara kullanımı, obezite, fiziksel aktivitelerden yoksun bir yaşam tarzı, UV veya iyonize radyasyona maruziyet, ailede kanser öyküsü, hormonal veya farklı rahatsızlıklar için kullanılan bir takım ilaçlar, bazı bakteri ve virüsler gösterilebilir (Ata, 2005). Kanser, tüm dünyada hızla artan ölüm nedenleri arasında yer alan bir hastalıktır. Bu hastalığın obez bireylerde görülme sıklığı son on yılda artış göstermektedir. Obezitenin kanserle doğrudan bir ilişki kurduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ve her sene yaklaşık 90.000'den fazla meydana gelen kanser sebepli ölümler aşırı kilodan kaynaklanmaktadır (Kwan ve diğerleri, 2017).

2.2. Prostat

Prostat, erkeklerde ortalama kestane boyutlarında üretrayı çevreleyen bir organdır. Prostat vücudun sekonder seks organlarından biri olmasının yanında bir dış salgı bezidir. Prostatik sekresyon hafif asidik yapıda olup spermin akışkanlığını artırarak fertiliteyi kolaylaştırır (Kendi, 1980). İnsan prostat epiteli, epitel hücreleri ve stromal hücreler olmak üzere iki önemli hücresel bölümden oluşmaktadır(Mammadov 2018). Normal prostat gelişimi için androjenler gereklidir. Androjenlerin prostat epitel hücreleri üzerindeki doğrudan etkisi, terminal farklılaşmasını indüklemektir. Bununla birlikte, androjenler aynı zamanda, epitel hücre proliferasyonunu uyararak bitişik stromal hücrelerde büyüme faktörlerinin uyarılması yoluyla da prostat epiteli üzerinde dolaylı etkilere sahiptir (Lee, Akin-Olugbade ve Kirschenbaum, 2011).

Prostatın glandüler dokusu, üretranın 'prostatik üretra' adı verilen *kısmını çevreler.* Anne karnında büyüme esnasında, prostat oluşumu için, epitel doku üretral duvardan mezenkime doğru uzanır. Bu dokular uzar, dallanır ve keseciklerle biten bir ağ halini alır. Prostat bezi salgıları, üretral duvara açılan kanallar aracılığıyla üretraya akar (Joseph, Turco, Vezina ve Strand, 2021).

Prostat, tabanı yukarı doğru piramit şeklinde bir ekzokrin bezdir . Prostatın bölgesel anatomisi ilk defa 60'larda tanımlanmıştır, ancak anatomik uygulamada terimlerin kullanımı 80'lerde tanımlanmıştır. Prostat dört bölgeden oluşur: merkezi bölge, geçiş bölgesi (TZ), periferik bölge (PZ) ve fibro-kas yapısı (Şekil 2.3.). Prostat tümörlerinin %70'i periferik bölge içinde yer aldığından PZ ve TZ anahtar yapılardır. Bunun aksine iyi huylu hipertrofi (BPH) çoğunlukla yaşla birlikte büyüyen geçiş bölgesinde meydana gelir (Betrouni, Iancu, Puech, Mordon, ve Makni, 2012).



Şekil 2. 3. Prostat anatomik yapısı (TZ: geçiş bölgesi, PZ: periferik bölge, AFMS: anterior fibromüsküler stroma) (Betrouni ve diğerleri, 2012).

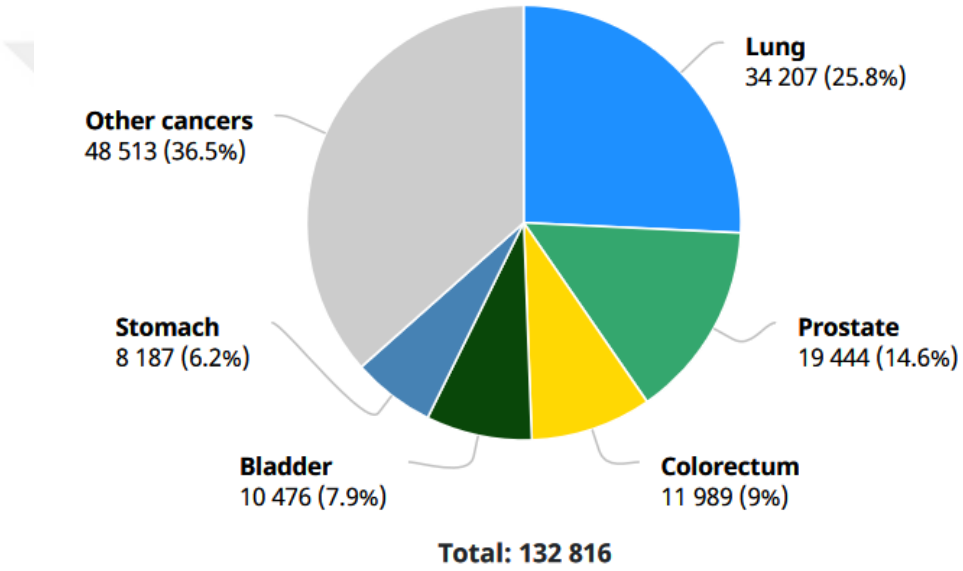
2.3. Prostat Kanseri

1817 yılında İngiliz anatomist ve cerrah olan Langstaff prostatta malign büyüme gösteren birkaç vaka tespit ederek, ilk prostat kanseri vakalarını yayınlamıştır. Ortaya koyduğu bu büyümelere ise "fungus haematodes" adını vermiştir (Kendi 1980). Prostat kanseri, batı ülkelerinin birçoğunda erkekler arasında en sık teşhis edilen kanser türüdür (Parkin, Whelan, Ferlay, Raymond ve Young, 1997). Prostat karsinojenezi, prostat epitelinin kontrolsüz çoğalması, lokalize olmuş tümörün, ilerlemiş ve metastatik hastalığa kademeli olarak dönüşümü ile karakterize bir durumdur (Nelson, De Marzo ve Isaacs, 2003).

Prostat kanseri, klinik seyri açısından heterojen bir kanser türüdür. Bazı hastalarda ölümcül ve hızlı olarak seyrederken, bazılarında çok yavaş veya klinik olarak anlamlı hastalık haline gelmeden devam etmektedir. Bu hasta grupları için risk faktörleri de değişkenlik göstermektedir (Mammadov, 2018). Genel olarak bakıldığında prostat kanseri yavaş ilerleyen bir hastalıktır ve kişide hayati bir tehdit oluşturmaz, bunun dışında kısa süre içinde hızla ilerleme göstererek yaşamı ciddi yönden etkileyen türlerde mevcuttur (Başaran, 2008). Yaş arttıkça prostat kanseri görülme sıklığıda artmaktadır. PSA'nın kanser taraması olarak kullanıma girdiği 1987 yılından itibaren, prostat kanseri tanısında ciddi oranda artış görülmektedir. Migrasyonla ilgili çalışmalarla da bu durum ortaya konulmuştur (Pernar, Ebot, Wilson ve Mucci, 2018). Avrupa randomize prostat kanseri taraması (ERSPC) sırasında erken teşhisle prostat kanserinden kaynaklanan ölümlerin büyük oranda azaltıldığı ifade edilmiştir. Bu taramalarda prostat spesifik antijen (PSA)'nın erken teşhiste önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, PSA'nın tek başına değerlendirilmesinin önemsiz olarak değerlendirilen bazı durumlara neden olduğu düşünülmektedir (Fenton ve diğerleri, 2018).

Prostat kanseri Avrupa ve ABD' de 50 yaş üstü erkekler arasında en sık görülen kanserdir. Prostat kanserine bağlı olarak dünyada yılda ortalama 1.1 milyon yeni vaka ve 300.000 ölüm görülmektedir (Ferlay, 2015). Her yıl için Avrupa' da 225.000 ve ABD' de 240.000 yeni vakadan sorumludur (Özen ve Türkeri, 2007). Asya gibi düşük riskli bölgeden, Amerika gibi yüksek riskli bölgeye göç eden insanlarda göç ettikleri ülkeye göre prostat

kanseri insidansı ve mortalitesi azalmış olmasına rağmen kendi ülkelerine kıyasla arttığı görülmüştür (Pernar ve diğerleri, 2018). Prostat kanseri ülkemizde erkekler arasında en sık görülen kanserler arasında ikinci sırada bulunmaktadır (Yılmaz ve Sarıkaya, 2017). T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı, 40 yaşını doldurmuş ve ailesel prostat kanseri geçmişi bulunan erkekler ile 50 yaşını geçmiş ve aile öyküsü olmayan erkeklerde hastalığın tedavisini kolaylaştıran erken tanı amacıyla kişilerin bir üroloji uzmanına yönlendirilmesini önermektedir ("Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü [HSGM] Prostat kanseri", 2021).



Şekil 2. 4. 2020 yılında Türkiye'de her yaştan erkekler için vaka sayıları. (GLOBOCAN, 2020).

Prostat kanserinin sebepleri ile ilgili birçok çalışma yapılıyor olmasına rağmen bu konu hakkında net bir bilgi bulunamamıştır. Hastalığın görülmesinde çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir (Gann, 2002). Yaşam tarzı, sigara ve alkol kullanımı diyet gibi faktörler de riski arttırmaktadır (Pernar ve diğerleri, 2018). Prostat kanserinin toplumda görülme sıklığı yaşa bağlı olarak artmaktadır. Özellikle 50 yaşın üstündeki erkek bireylerde görülme sıklığı ve hastalığa bağlı ölüm oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Bostwick ve ark, 2004). Prostat kanseri oluşumunda diyetinde önemli olduğunu ortaya koyan bazı çalışmalar yüksek oranda yağ içeren besinlerin ve

kırmızı et tüketiminin prostat kanserinin gelişmesine katkı sağladığını öne sürmektedir (Sebastiano ve Mourtzakis, 2014; Story, Hopp, Meier, Begun ve Lawson, 1993).

Prostat kanserinin görülme sıklığında en etkili faktörlerin başında genetik faktörlerin geldiği bilinmektedir ve yapılan çalışmalarla genetik yatkınlığı olan kişilerde prostat kanseri görülme sıklığının yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Genetik faktörlerin, prostat kanserinin oluşumunda %40 civarlarında etkili olduğu tespit edilmiştir. Prostat kanserinde tanımlanan genlerin sayısı araştırmalarla beraber artış göstermektedir ve belirlenen vakaların %5-10'una majör genlerin sebep olduğu ortaya konulmuştur (Güneş, Bağcı ve Sarıkaya, 2003). Bununla beraber yapılan araştırmalarla prostat kanseri tanısı konulan hastaların ortalama %18'inde aile öyküsünün olduğu gözlenmiştir (Aksel, 2017).

Kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde risk, birinci dereceden akrabalık bağı bulunan prostat kanserli kişilerde iki kat, ikinci dereceden akrabalığı bulunan prostat kanserli kişilerde ise beş kat artmaktadır. Bu yatkınlık risk oranının yüksek olmasının yanı sıra erken yaşta prostat kanserine yakalanma olasılığınında %5-10 oranında olduğu belirlenmiştir. Prostat kanserinin 55 yaş öncesi tanı konulan erken dönem vakalarının %40'ının genetik bir bozukluktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Güneş ve diğerleri, 2003). Yapılan bazı çalışmalarda, ailesinde kanser geçmişi olan kişilerde bazı kromozon hasarlarının prostat kanserine neden olabileceği gözlenmiştir. Bu durumun özellikle 7p, 7q, 8q, Xq, 8p, 10q, 13q ve 16q kromozom bölgeleri ile bağlantılı olduğu ortaya koyulmuştur (Rubin ve De Marzo, 2004). Araştırmalara göre prostat kanserinde p53 gen mutasyonları, bez ile sınırlı kalan tümörlerden daha çok kemik metastazı olan olgularda görülmektedir. Metastaz potansiyeliyle ilişkili olan diğer bir durum ise E-cadherin geninin ekspresyonunun azalması olduğu belirlenmiştir (Visakorpi, Hyytinen, Kallioniemi, Isola, Kallioniemi, 1994).

Prostat kanserinin görülme nedenleri arasında farklı durumlar da yer alır. Vücudun bazı dış ve iç çevresel kaynaklı uyarıcı faktörlere karşı inflamasıyon oluşumuyla tepki göstermesi ile dokuların fizyolojik işlevini sürdürdüğü gözlemlenmiştir. Doku fizyolojisinin düzenlenmediği durumlarda hemostaz bozulmaktadır. Bunun sonucunda mast hücreleri ve makrofajlar, biyoaktif uyaranlar olarak bilinen ROS, kemokinler,

sitokinler gibi grupları serbest bırakır (Visser, Eichten ve Coussens, 2006). Enflamasyonun kronik bir hale gelmesiyle kanser ve çok sayıda hastalığın meydana geldiği gözlenmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda özellikle kanser gelişiminin kronik inflamasyonla güçlü bir bağlantısı olduğu anlaşılmıştır. Prostatta ve çeşitli organlarda gerçekleşen tümör oluşumunu destekleyen durumlardan birinin hücre yaşlanması ve DNA hasarından kaynaklandığı ortaya konulmuştur (Yıldırım, 2019).

Bazı kanser türlerinde görülen enfeksiyon kaynaklı etiyolojinin prostat kanseri içinde geçerli olduğuna dair bazı çalışmalar mevcuttur. Mikrobiyolojik ajanlar içinde prostat kanserine neden olduğu öne sürülen açık bir kanıt olmasa da enflamatuar oluşum sürecinin bu kanser türüne neden olduğu yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Bu durumda prostat enflamasyonu ve prostat kanseri arasında belirgin bir ilişki kurabilmenin zor olduğu anlaşılmıştır. Bu durumun nedenlerinden birisi asemptomatik prostat bezi enfeksiyonunun alınan örneklerin ve yapılan biyopsilerin büyük bir kısmında görülmesidir. Semptomatik prostat enfeksiyonuna sahip olan kanser vakaları erken dönemde tespit edilmektedir. Buna karşılık herhangi bir semptom göstermeyen vakalarda kanserin varlığının belirlenememesiyle birlikte kansere sebep olan faktöründe anlaşılamadığı bildirilmiştir. Yapılan bazı araştırmalar sonucunda prostat kanserine enfeksiyon kaynaklı yakalanmadan daha çok cinsel yolla bulaşan hastalıkların neden olduğu gözlemlenmiştir. Tüm veriler ışığında son yapılan çalışmalar dikkate alındığı zaman kronikleşen enflamasyonun kanser gelişimi için önemli bir risk olduğu söylenmektedir (Türkeri, 2007).

Prostat dokusunun sağlıklı olabilmesi için yüksek çinko seviyelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser teşhisi konulan dokuda çinko seviyelerinde yüksek oranda bir azalmanın olduğu görülmektedir. Prostatın periferik bölgesinde yer alan sağlıklı hücrelerde yüksek çinko seviyelerinin yanı sıra sitrat seviyelerinin de yüksek olduğu belirlenmiştir. Hücre içi çinko seviyelerinin azalmasının hücrelerde kontrolsüz büyümeye sebep olabileceği saptanmıştır. Bu durumun yapılan araştırmalarla çinkonun proapoptotik etkisinin azalmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Hücre içinde çinko taşıyıcı proteinler tarafından çinko hemostazı belirli bir düzende tutulmaktadır (Franz ve diğerleri, 2013).

Sinir sisteminde prostat işlevini düzenlemede ve kanser oluşumunu engellemede belirgin bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. Sinirler protein sentezi, gen ekspresyonu, metabolizma dengesi gibi pek çok hücresel fonksiyondan sorumludur. Bu düzenlemeler prostat kanseri için oldukça önemli bir yere sahiptir. Sinir fonksiyonlarının yaşa bağlı olarak bir dönem arttığı ve sonrasında kademeli olarak azaldığı bilinmektedir. Prostat kanserine neden olan tümör ve çevresinde yer alan sinirlerin birbiriyle etkileşimi sonucunda kanserin ilerlemesinin olası bir durum olduğunu gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Buna karşılık tümör çevresinde yer alan sinirleri hedefleyen nörotoksin uygulamalarının ana tedaviye geçmeden önce uygulanabilir olması düşünülmektedir. Bu uygulamanın yapıldığı bazı çalışmalarda sinir inhibisyonu ile kanser hücrelerinde apoptoz oranında bir artış olduğu görülmektedir (Coarfa ve diğerleri, 2017).

2.3.1. Prostat Kanseri Belirti ve Bulgular

Genelde prostat kanseri başlangıç döneminde asemptomatik olarak ilerlemektedir. Bunun sebebi olarak kanserin prostatın üretradan uzak olan periferik bölgesinde meydana geldiği ve bu bölgede belirli bir büyüklüğe ulaşana kadar belirti vermediği belirlenmiştir. Prostat kanserinin ilerleme sürecinde gözlenen belirtiler incelendiği zaman genel olarak aynı durumların meydana geldiği gözlenmiştir. Prostat kanserinin üretra içine doğru büyümesi ile idrara başlama sırasında güçlük, idrarda kesiklik veya idrar akım hızında azalma gibi bazı boşaltım problemleri görülür. Bu kanserin ilerleyen evrelerinde rektum invazyonu gözlemlenebilir.

Lokal olarak yayılan prostat kanserlerinde tek taraflı veya çift taraflı böğür ağrısı, vücutta genel olarak ödem, pulmoner ödem, hipokalsemi, anüri, hiponatremi, hiperürisemi, obstrüktif üropati gibi farklı belirtilerin ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu belirtilerin bir kaçı ileri evrelerde gözlenen durumlardandır. Prostat kanserinin ortaya çıkarılması genel olarak 5 farklı klinik tabloyla açıklanabilir. Bunlar; toplum taraması sırasında, herhangi bir üriner şikayet sebebiyle yapılan tetkikler sonucunda, benign prostat hiperplazisi için yapılan TUR-P sırasında tesadüfen, metastatik kanserli hastaların primerinin araştırılması sırasında ve otopsi sonucunda olarak ifade edilmektedir (Özen ve Türkeri, 2007). Yapılan

çalışmalarla prostat kanserini belirlemede en önemli tanı yönteminin rektal muayene olduğu söylenmiştir. 50 yaşın üzerinde bulunan her erkekte rutin olarak yapılan rektal muayene erken safhada gelişmekte olan bir prostat kanseri tanısı koyma olasığını artırmaktadır. Bu tedavi sırasında tüberküloz, prostat taşı, prostatın mantar hastalıkları gibi bazı farklı rahatsızlıklar prostatta nodüler değişkenliklere neden olarak karışıklıklara yol açabilir. Rektal muayene sırasında prostat üzerinde bulunan kanser nodülü, sert ve normal prostat dokusundan belirgin bir sınırla ayrılmış, birkaç cm çapında olarak palpe edilir. İleri evrelerde bulunan vakalarda ise bu nodül sert ve prostatın yüzeyi irregüledir. İleri evrelerde prostat tümüyle fikse bir hale gelir. Prostat kanserinin kesin bir şekilde ayrımının yapılması için biyopsi şarttır (Kendi, 1980).

Prostat kanser araştırması sırasında yapılan test sonuçlarına göre özellikle ileri safhalarda laboratuvar bulgularında anemi gözlenir. İdrar sedimentinde kırmızı ve beyaz küreler gözlenir. Kanda bulunan laktik dehidrogenaz (LDH) ve alkalen fosfataz düzeylerinde belirgin bir artış gözlemlenir. Bu iki değerde görülen artış ile metastaz düzeyleri paralel bir ilişki içerisindedir (Küçüksu ve Ruacan, 1978).

Prostat kanserinin belirlenmesinde incelenen değerlerden biri ise prostat spesifik antijen (PSA) değeridir. PSA prostata özgü bir değerdir fakat yalnızca prostat kanserinin belirlenmesinde kullanılmaz. Serum PSA değeri iyi huylu prostat büyümelerinde veya idrar yolu enfeksiyonlarında artış gösterebilmektedir (Nadler, Humphrey, Smith, Catalona ve Ratliff, 1995). PSA seviyelerinin yüksek bulunması prostat kanseri teşhisi koymak için tek başına yeterli olmasa da biyopsiye ek olarak başvurulan bir belirteçtir. Hastalığın erken dönemde teşhis edilerek prostat kanserine bağlı mortalitenin azalmasına olumlu bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Loeb ve Catalona, 2010). PSA testininin sonucuna bağlı olarak çok sayıda hasta asemptomatik dönemde belirlenerek radyoterapi, radikal cerrahi gibi çeşitli tedavi yöntemlerine başvurabilmektedir. İleri evrede tanımlanan vakalarda kanserin lokal olmaktan çıkıp metastatik evreye ilerlediği gözlenmektedir. Bu dönemde aynı zamanda hormon mekanizmalarına etki eden palyatif yöntemler ön plana çıkmaktadır (Hacıbekiroğlu, Kodaz ve Türkmen, 2015).

2.3.2. Prostat Kanseri Evrelendirme ve Tedavi Yöntemleri

Prostat kanseri vakalarının yaklaşık %50' si sağlık kurumuna başvurduklarında metastaz olduğu gözlenir. Prostat kanseri A, B, C ve D olmak üzere 4 evrede incelenmektedir. Evre A' da prostat kanseri tesadüfi olarak belirlenir ve herhangi bir semptom göstermez. Evre B' de kanser prostat kapsülü içerisindedir ve herhangi bir metastaz yoktur. Evre C' de pelvik lenf bezlerine metastaz olabilir fakat kanser hala prostat kapsülündedir. Aynı zamanda bu evrede serum alkalen fosfat seviyelerinde bir artış belirlenir. Evre D ise ileri derece prostat kanseri olarak ifade edilmektedir. Prostat kanseri için uygulanacak olan tedavi yönteminin belirlenmesinde hastanın yaşı, hastalığın hangi evrede olduğu ve kişinin genel sağlık durumu göz önünde bulundurulmaktadır. Erken evrede (A ve B) teşhis edilen prostat kanserlerinde hastanın yaşı 70' in altındaysa mesane boynunun bir bölümü ve prostat seminal veziküller cerrahi yöntemle çıkarılmaktadır (Küçüksu ve Ruacan, 1978). Hastalığın ileri evrelerinde (C ve D) mortalite oranı yüksektir. Mortalitesi yüksek olan vakalarda radyoterapi, kemoterapi, kastrasyon ve hormon tedavileri bir arada uygulanmaktadır (Aras, Kadıoğlı ve Tunç, 1989).

Prostat hücreleri çoğalma, gelişme ve fonksiyonlarını sürdürebilmek için androjenlere bağımlılık duyar. Bu hücrelerde bulunan androjenik bağlantı herhangi bir şekilde kesilirse uyarı gelişmez ve hücreler apoptoza gider (Walsh, 1975). Prostat kanserinde 1950' li yıllardan beri orişektomi olarak adlandırılan bir yöntemle kandaki androjen seviyelerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Kimyasal kastrasyon uygulaması ise tedavi için yapılan farklı yöntemlerden biridir. Pitituar hipotalamus sinyalini hedef alan lüteinleştirici hormon salan hormon analoglarının (LHRH) kullanımı ile androjen üretimi engellenmektedir. Bu hormon analogları testosteron dönüşümünü %95 oranında baskılarken, adrenal bez tarafından üretilen dihidroepiandrojen gibi bazı androjen öncüllerinin baskılanmasında bir etki göstermemektedir. Bu sonuçlara göre tedavi boyunca androjen blokajını sağlayabilen çeşitli bileşikler uygulanmaktadır (Brooke, Parker ve Bevan, 2008). Standart olarak uygulanan hormon tedavileri dolaşımdaki testosteron düzeylerini cerrahi veya medikal kastrasyon seviyelerinde tutarak, kişinin yaşam seviyesini artırmayı hedeflemektedir. Tanı konulduğu zaman metastatik prostat kanseri bulunan veya tekrarlayan vakalarda androjen deprivasyon tedavisi sıklıkla

uygulanmaktadır. Antiandrojenler yapısal olarak steroidal veya non-steroidal olarak ayrılmaktadır. Non-steroidal antiandrojenler dolaşımdaki testosteron düzeylerini düşürmediklerinden dolayı kastrasyonla karşılaştırıldığı zaman yüksek bir yaşam kalitesi sağlamaktadır (Hacıbekiroğlu ve diğerleri, 2015).

2.4. Doğal Bileşiklerin Prostat Kanseri Üzerindeki Etkisi

Kanserin önlenmesi ve tedavi edilmesi sırasında bazı doğal bileşiklere başvurulmaktadır. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı çok sayıda doğal bileşiğin diğer tüm kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanseri üzerinde de tedavi edici bir etkisinin olduğu ileri sürülmektedir. Özellikle bu doğal bileşiklerin prostat kanser tedavisinde kullanılan farklı türlerde ki ajanlarla kombine bir şekilde uygulanmasının etkili sonuçlar ortaya koyduğu gözlenmiştir. Bu uygulama esnasında asıl amaç meydana gelen yan etkilerin en az seviyeye indirilerek kanser üzerindeki etkinliğin artırılmasıdır. Ayrıca doğal bileşiklerin farmakolojik ajanlarla bir arada kullanılmasının tek başına uygulamadan daha etkili sonuçlar doğuracağı düşünülmektedir. Yapılan çok sayıda çalışmada doğal bileşiklerden elde edilen tedavi yöntemlerinin bazı kanser türlerini hedef alarak etkili çözümler ürettiği belirlenmiştir (Sauter, 2020).

Özellikle Asya ülkelerinde geleneksel tıp alanında kullanılan bazı doğal bileşiklerden elde edilen özütlerin yapılan çalışmalar sonucunda prostat kanserine karşı seçici bir toksisite oluşturduğu gözlenmiştir. Kanser hücrelerini hedef alan bu fitokimyasalların tedavi potansiyelini artırması son dönemlerde umut verici olmuştur. Bu fitokimyasal ajanların etki mekanizmalarının araştırılması sonucunda elde edilen bulgular kanser hücresinin büyümesini ve çoğalmasını baskılayan sinyal yolaklarına etki ettiğini ortaya koymuştur. Büyüme ve çoğalmayı düzenleyen metabolik yolaklardan PI3/ Akt/ mTOR/ siklin-cdk, proinflamatuar etkiyi düzenleyen NF-kB, tümör baskılayıcı p53/Rb, anjiyogenezi kontrol eden VEGF, metastaz için WNT/β-katenin gibi kanser gelişiminde etkisi olan çok sayıda mekanizmanın bu doğal bileşikler yoluyla inhibe edildiği belirlenmiştir (Ghosh, Hazra, Pal, Nelson ve Pal, 2021).

Apoptoz olayı programlı hücre ölümü şeklinde tanımlanır ve kanser tedavisi için gerekli olan ana mekanizmalardan biridir (Hassan, Watari, AbuAlmaaty, Ohba ve Sakuragi, 2014). Yapılan bir çalışmada Çin'de alternatif tıpta kullanılan bitkisel kökenli Auriculasin'in prostat kanserinin lenf nodu metastazı üzerinde DNA parçalanmasına neden olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda LNCaP hücre hattı üzerinde yapılan bu çalışmada Auriculasin'in bazı reaktif oksijen türlerinin ekspresyonunu artırdığı ve fazla eksprese olması durumunda apoptozun durmasına neden olan Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (Cho ve diğerleri, 2018).

Kansere bağlı ölümlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturan metastaz ve çevre dokulara kanser hücresinin invazyonudur. Metastaz sürecinin başlamasında önemli olan adımlardan birinin epitelyal- mezenkimal geçiş (EMT) olduğu gözlenmektedir. Yapılan araştırmalarda doğal bileşiklerden kaynaklı bazı tedavi yöntemlerinin prostat kanseri üzerinde anti-metastatik etkileri saptanmıştır (Noh ve diğerleri, 2019). Prostat kanseri hastalarında doğal bileşiklerin aktivitesini ortaya koymak için çok sayıda klinik test uygulanmaktadır. Bu hastalığı kontrol altına almak için fitokimyasalların kullanımının avantajlı olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur. Proliferasyonu engelleyerek invazyonu önleyen doğal bileşiklerin güvenilir olduğuna dair kanıtlar yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Fontana, Raimondi, Marzagalli, Domizio ve Limonta, 2020).

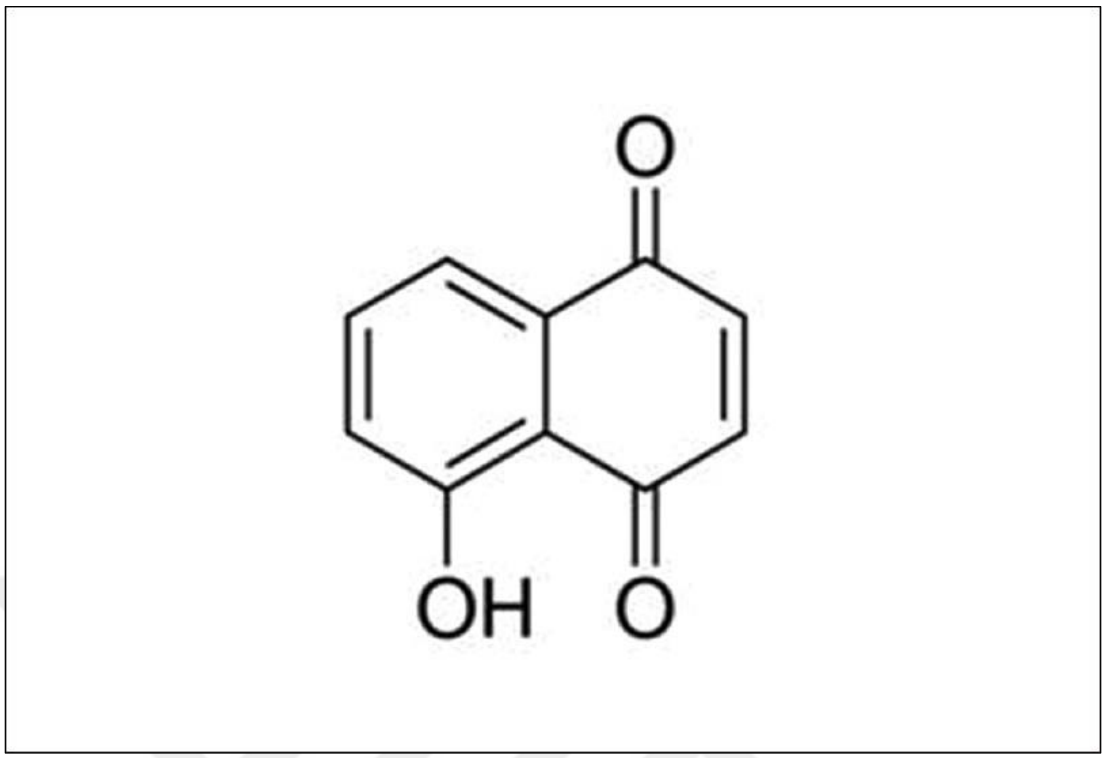
Prostat kanseri üzerinde etkinliği olduğu bildirilen çok sayıda doğal bileşiğin kemoterapötik ajanlarla kombinasyonlarının tedavi için umut verici bir yöntem olabileceğini öne süren çalışmalar mevcuttur. Bu uygulama için uygulanacak bileşiklerin toksik olmayan doz seviyelerinin belirlenmesi için ileri düzeyde testlerin ve incelemelerin yapılması gerekmektedir (Bai ve diğerleri, 2021). Genel olarak bakıldığı zaman fitokimyasalların moleküler düzeyde hangi mekanizmalara sahip olduğu açık bir şekilde anlaşılamamış olsa da *in vivo* veya *in vitro* yöntemlerle kanser türleri üzerindeki etkinliği saptanmıştır (Edderkaoui ve diğerleri, 2013). Doğal bileşikler arasından kanser çalışmalarında sıklıkla incelenen kinonların farklı yapılardan oluşan bileşiklerle bir antitümör grubu olduğu belirlenmiştir. Bu ailede bulunan bileşiklerin kimyasal özellikleri sayesinde hedefledikleri bölgeyle kovalent bağlar kurabildiği ve oksidasyon- redüksiyon

tepkimelerinde elektron taşıyıcısı olarak görev aldığı tespit edilmiştir. Kinonların tüm bu işlevlerini kanser hücrelerinde gerçekleştirmesi sonucunda toksisiteyi indüklediği ve antikanser bir aktivite sağladığı gözlemlenmiştir (Bolton, Trush, Penning, Dryhurst ve Monks, 2000). Tıp, biyoloji, kimya gibi farklı alanlarda kullanılabilen kinon ailesinin çok sayıda canlı hücrede bulunduğu tespit edilmiştir. Hücre metabolizmasında etkin bir görevi olan bu bileşikler elektron taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır. Yapılan farklı çalışmalarda bu grubun üyelerinden bazılarının bakteri ve mantarlar üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Akar, 2020).

Antibakteriyel, antifungal, antiinflamatuar etkileriyle bitkilerin sekonder metaboliti olan kinon ailesi naftakinon, benzokinon, antrakinon ve fenantren kinon olarak adlandırılan 4 farklı tipten oluşmaktadır. Bu gruptan naftakinonların tüm özelliklerine ek olarak yapılan araştırmalarla antikanser etkileri belirlenmiştir (Lu ve diğerleri, 2013). Kinon sınıfına ait bileşikler arasında yer alan plumbagin, lapakol, juglon ve K vitamini 1- 4 naftakinon grubunu oluşturmaktadır ve bu bileşiklerin antikanser etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Grolig ve Wagner, 2005). Kinon türevlerinden olan 1-4 naftakinonlar DNA topoizomeraz II enzimini inhibe ederek kanser hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki göstermektedir. Bu açıdan 1-4 naftakinonlar klinikte solid kanser tedavisi için kullanılmaktadır (Akar, 2020).

2.4.1. Juglon

Juglon (5 hidroksi, 1-4 naftakinon), *J. cinerea, J. regia, J. nigra* gibi Juglandaceae familyasına ait ağaçların yaprak, kök ve gövde gibi farklı kısımlarında bulunan bir naftakinon türevidir. Yapılan çalışmalarla juglonun antiviral, antibakteriyel ve antifungal etkilerine ek olarak antikanser etkisi de bulunan doğal bir bileşik olduğu saptanmıştır (Babula, Adam, Kizek, Sladky ve Havel, 2009) (Şekil 2.5.)



Şekil 2. 5. Juglonun Kimyasal Yapısı (Bayram ve diğerleri, 2019).

Juglonun antifungal etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *Juglans regia*'dan elde edilen metanolik ekstraktın oral kandidiyaz üzerinde etkili sonuçlar meydana getirdiği gözlenmiştir. Juglonun antidiyabetik özelliğinin olduğuna dair bazı çalışmalarda mevcuttur. Bu antidiyabetik etkinin arkasında yer alan mekanizmanın juglonun pankreasın ß- hücrelerini taklit ederek insülin salınımını artırması veya insüline olan duyarlılığı artırması gibi etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Gupta, Behl ve Panichayupakarananb, 2019).

Kinon türevlerinden biri olan juglonun redoks tepkimelerinde rol alarak prooksidan bir özellik gösterdiği belirtilmiştir. Kanser hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin üretilmesini sağlayan bu organik bileşiğin kanser tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Juglonun hücre üzerindeki toksik etkilerini ortaya koymak için yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan araştırmalar sonucunda juglonun sitotoksik ve genotoksik etkilerinin hücre zarı hasarı, oksidatif hasarın indüklenmesi, nekrotik ve apoptotik hücre ölümü olarak belirlenmiştir (Ahmad ve Suzuki, 2019). HCT-15 kolon karsinomu hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada juglonun hücre döngüsünün S fazını

bloke ederek hücre büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Kamei, Koide, Kojima, Hashimoto ve Hasegawa, 1998). Prostat hücre hattı olan LNCaP üzerinde yapılan bir çalışmada juglonun kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyonu ve mitokondriyel disfonksiyon ile ilişkili olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Xu, Yu, Qu ve Sui, 2013). Juglonun p53 protein seviyelerini azalttığı, DNA hasarını uyardığı ve hücre ölümünü indüklediği yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Lösemi hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada juglonun neden olduğu apoptoz ROS seviyelerinde görülen artışla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca juglonun artan dozlarında hücre içi GSH seviyelerini düşürerek hücre içindeki redoks tepkimelerini bozduğu ve bu şekilde apoptozu artırdığı belirlenmiştir (Xu ve diğerleri, 2012). Juglonun hücre döngüsü kontrol mekanizmasında önemli bir rolü olan ve çok sayıda kanser türünde yüksek oranda ifade edildiği bilinen Pin1 üzerinde inhibitör etkisi olduğu bilinmektedir Aynı zamanda Pin1 kanser tedavisinde kemoterapötik ilaçların hedeflerinden biridir (Fila, Metz ve Van Der Sluijs, 2008).

Omurga ve beynin glial hücrelerinde görülen bir tümör türü olan glioma malign beyin tümörlerinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar peptidyl-prolyl cis-trans izomeraz olarak bilinen Pin1'in gliomada aşırı bir şekilde eksprese olduğunu göstermektedir. Juglonun U251 glioma hücre hattında yapılan çalışmaları sonucunda Pin1' i inhibitörü olarak görev yaptığı ve anjiyongenezi baskılayarak tümör hücreleri üzerinde antikanser etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Wang, Liu, Wang ve Sun, 2017).

Ca Ski ve HeLa hücre hatları üzerinde yapılan toksisite çalışmalarında juglonun hücre proliferasyonunu büyük ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada Pin1' i spesifik olarak inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Servikal kanserler üzerinde sitotoksik etkisi belirlenen juglonun sinyal yolakları üzerindeki etki mekanizması için ileri seviyede araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun dışında yapılan bazı çalışmalarla juglonun SGC-7901 (mide kanseri), LNCaP (prostat kanseri), MDA-MB-435 (melanom) gibi hücre hatlarında in-vitro sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Ortaya konulan veriler ışığında juglonun çeşitli kanser türlerinin tedavisi için yeni bir ilaç potansiyeli taşıdığı ileri sürülmektedir (Zhao ve diğerleri, 2019). MIA Paca-2 (KRAS mutasyonlu pankreas kanseri) hücre hattında juglonun apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin incelendiği bir çalışmada hücre proliferasyonunun oldukça azaldığı ve apoptozun indüklendiği belirlenmiştir. Ayrıca juglon ile muamele edilen hücrelerin

koloni oluşturma yeteneklerinin kontrol grubuna göre açıkça azaldığı gözlenmiştir. Juglonun doğal bir bileşik olan Timokinon ile kombinasyonunda düşük konsantrasyonlarında sinerjitik etkinin beklendiği gibi yüksek olmadığı belirlenmiştir. Bu sinerjitik etkinin dozların yükselmesine bağlı olarak etkinliğini artırarak kanser hücrelerini yok etmeye başladığı belirlenmiştir (Karki, Aggarwal, Laine, Greenway ve Losso, 2020).

B16F1 melanom hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada kanser hücrelerinin juglon aracılığıyla radyasyona karşı duyarlılığının artırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada melanom hücreleri bir saat boyunca 5 uM juglon çözeltisi ile muamele edildikten sonra 1, 3, 6 ve 8 Gray radyasyona maruz bırakılmıştır. Klonojenik test yöntemi ile koloni oluşturabilme yeteneklerinin ölçüldüğü deney sonucunda yalnızca radyasyona maruz kalan kontrol grubuyla kıyaslama yapılarak hücre sağ kalımında doza bağlı olarak azalma olduğu gözlemlenmiştir (Aithal, Kumar, Rao, Udupa ve Rao, 2012).

Juglonun prostat kanser hücreleri üzerinde canlılığı azalttığına dair elde edilen bulguların apoptozla ilişkili olup olmadığını araştırmak için yapılan bir çalışmada DNA'nın Hoechst 33342 boyama ile görüntülenmesi sağlanmıştır. Boyama sonrasında inceleme ile kontrol grubuna göre juglonla muamele edilen hücrelerde nükleer yoğunlaşma, hücre boyutlarında küçülme ve bazı morfolojik değişiklikler olduğu ortaya konulmuştur. Apoptoz düzeyini belirlemek için yapılan Annexin V boyama yönteminde, 24 saat boyunca juglonla muamele edilen hücrelerde doza bağlı olarak belirgin bir artış gözlenmiştir (Xu ve diğerleri, 2013).

Prostat kanserinin ilerlemesinde ve metastazında EMT büyük bir rol oynamaktadır. Güçlü sitotoksik etkilere sahip olduğu düşünülen juglonun prostat kanseri üzerinde anti-EMT etkisinin belirlenmesi ve bunun altında yatan mekanizmanın ortaya konulması için yapılan bir araştırmada Western Blot analizi uygulanmıştır. Bu analizden elde edilen sonuçlarda juglonun bir adezyon molekülü olan E-cadherin ekspresyonunu artırdığı ve vimentin, N-cadherin gibi mezenkimal biyomarker seviyelerini doz artışına bağlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir (Fang ve diğerleri, 2013). PC3 ve DU145 prostat kanseri hücre hatlarında juglonun sitotoksik etkilerinin araştırılması sonucunda proliferasyonu önemli

ölçüde azalttığı görülmüştür. Kanser hücrelerinde yapılan araştırmalarla juglonun DNA, RNA ve protein sentezi gibi hücre canlılığında etkili mekanizmaların aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Juglonun aynı zamanda kanser kök hücrelerinde kaspaz-9 aktivitesini artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Mahdavi, Azadbakht, Vahdati, Shokrzadeh ve Farhadi, 2019).

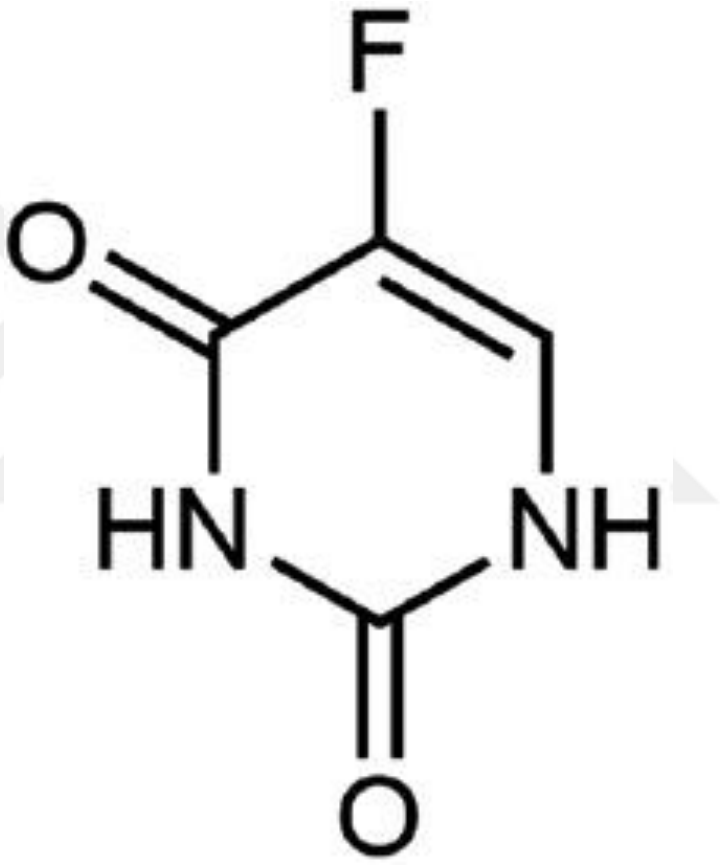
2.5. 5-Fluorouracil

Prostat kanserinin ileri evrelerinde genelde hormonal tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Hormon bağımlı hücrelerde androjen blokajı uygulaması apoptoz yoluyla başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Kemoterapi yöntemi prostat kanserine farklı hastalıkların da eşlik ettiği ve yaşam beklentisinin 6- 12 ay aralığında olan vakalara uygulanmaktadır. Prostat kanserinde sitotoksik etki gösteren ajanlardan olan sisplatin, karboplatin, paklitaksel ve 5-fluorouracil kullanılmaktadır (Wang ve Waxman, 2000). Metastatik prostat kanserinde hastalığın neden olduğu semptomlarla birlikte uygulanan tedaviden kaynaklanan yan etkilerin göz önünde bulundurularak tedavinin dikkatli bir şekilde planlanması gerektiği düşünülmektedir (Bitkin ve diğerleri, 2013).

Kanser tedavisinde uygulanan sitotoksik ilaçların antikanser etkileri kanser hücrelerindeki metabolik yolakların ve kanser hücresine özgü olan yapının bozulması olarak belirlenmiştir. Bu ilaçlar kanser hücresine farklı yollardan etki eden antimetabolitler (5- florourasil ve metotreksat), alkilleyici ajanlar (sisplatin, siklofosfamit), tubulin aktif ajanlar (paklitaksel, vinkristin) olarak gruplandırılmaktadır. *İn vivo* ve *in vitro* olarak yapılan araştırmalar sonucunda bu ilaçların hücre içi ROS üretimine neden oldukları gözlemlenmiştir. Antineoplastik ilaçlar kanser hücresinin yanı sıra tüm sistemde ROS oluşumunu artırarak çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011).

Akciğer, kolon, meme, baş ve boyun kanserleri gibi katı tümörlerin tedavisinde farklı kemoterapi ilaçlarıyla kombine bir şekilde kullanılmakta olan 5-Florourasil florlanmış bir pirimidin analoğudur (Cordier ve diğerleri, 2011) (Şekil 2.6.). Urasil analoğu olan bu anti-metabolit hücre içine urasilin taşıma mekanizması ile girmektedir. Hücre içinde 5-

FU'nun aktif metabolitleri olan Floro deoksi üridin monofosfat(FdUMP), floro ürüdin trifosfat (FUTP) ve floro deoksi üridin trifosfat (FdUTP)'a dönüştürülerek timidilat sentaz aktivitesinin ve RNA sentezinin inhibisyonuna neden olan bu bileşik aynı zamanda hücre döngüsünün sentez basamağı olan S fazını durdurarak DNA hasarına neden olmaktadır. 5-FU'nun kanser hücreleri üzerinde DNA hasarına neden olduğu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini gösteren farklı çalışmalar mevcuttur (Aybek, Ağca ve Çiftçi, 2020).



Şekil 2. 6. 5- Florourasil'in Kimyasal Yapısı (Gómez, Medina, Martínez, González ve Bravo, 2018).

5-FU metabolitlerinin DNA'ya bağlanarak timin sentezini inhibe etmesi ile oluşan hasar yalnızca kanser hücrelerini değil aynı zamanda sağlıklı hücreleri de olumsuz yönde etkileyerek ciddi toksik etkilere neden olduğu bilinmektedir (Yun Liu ve diğerleri, 2018). MCF7 hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada 5-FU ile 48 saat boyunca muamele edilen hücrelerde proliferasyonun önemli ölçüde inhibe edildiği MTT testi ile

gösterilmiştir. 5-FU 50 yıldan fazla bir süredir geliştirilmiş olan kemoterapötik ajandır ve hem tek başına hem de farklı ajanlarla çeşitli kanser tedavilerinde uygulanmaktadır (Hua Ge ve diğerleri, 2014).

PC3 prostat kanser hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada 5-FU/ Rutin kombinasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, Bcl-2 aktivitesini düşürerek apoptuzu indüklediği ve tümör baskılayıcı p53'ü aktive ettiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu kombinasyonun 5-FU'nun etkinliğini artırmasının yanı sıra aynı zamanda ilaca ihtiyaç duyulan dozları da azalttığını göstermektedir

Kanser tedavisinde kemoterapi ajanlarının ve antioksidan etkiye sahip olan doğal bileşiklerin kombine bir şekilde uygulanması sonucunda sinerjitik bir etki oluşarak apoptozun uyarılmasının, metastaz, invazyon ve proliferasyonun inhibe edilmesinin sağlanacağı düşünülmektedir. Bitkisel kaynaklı bileşiklerle kemoterapötik ajanların kombine tedavisi ile ilaç direncinin oluşması ve ilacın yan etkilerinin azaltılması sağlanabilir. (Satari, Amini, Raeisi, Lemoigne ve Hiedarian, 2019).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada doğal bir bileşik olan juglon ve kemoterapötik bir ajan olan 5-Florourasil'in sitotoksik etkileri LNCaP ve PC3 insan prostat kanseri hücre hatlarında XTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Bu bileşiklerin oluşturduğu DNA hasarı komet test yöntemiyle araştırılmıştır. Annexin V yöntemi kullanılarak hücre ölüm mekanizmaları, ROS testi ile hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türevlerinin seviyesi değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında tüm testler juglon ve 5-FU için ayrı ayrı ve iki maddenin kombinasyonları şeklinde araştırılmıştır.

3.1. Kullanılan Ekipmanlar ve Sarf Malzemeler

Çizelge 3. 1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

Ekipman	**Marka/Model**
Soğutmalı santrifüj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Kaba terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	Elektro.mag-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80i
Işık mikroskobu	NIKON-ECLİPSE E100
Komet yazılımı	Kameram 21
Elektroforez güç kaynağı	PeqLab-Reqpower 300
Elektroforez tankı	Cleaver Scientific
Mikroplaka okuyucu	Bio Tek, ELx800 U.S.A
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buzdolabı	REGAL
Manyetik Karıştırıcı	ISOTEX
-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Karıştırıcı-ısıtıcı	M TOPS MS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEX XS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Fluoroskan Ascent FL Microplaka	Thermo Scientific
Muse cell analyzer	Luminex
CO_2 Inkübatör	Panasonic

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

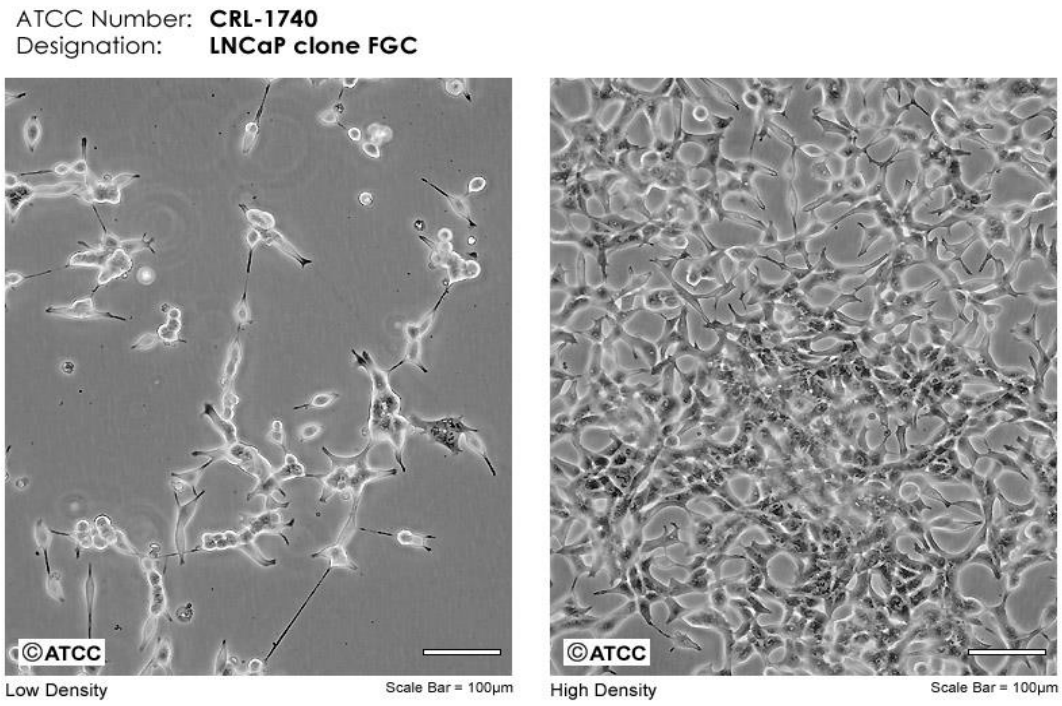
Sarf Malzeme	**Firma/ Katalog No**
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT-MIDI PLUS/ Dragon MED Levo plus
Steril 15 ml'lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPMI-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirüvat (100 ml)	PANBIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PANBIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/ S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
Lowmelting Agaroz	SIGMA/ A9414-25G
Normal Agaroz	SIGMA/ A9539-100G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898
DCFH-DA	Sigma
Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576

3.2. Kullanılan Hücre Hatları

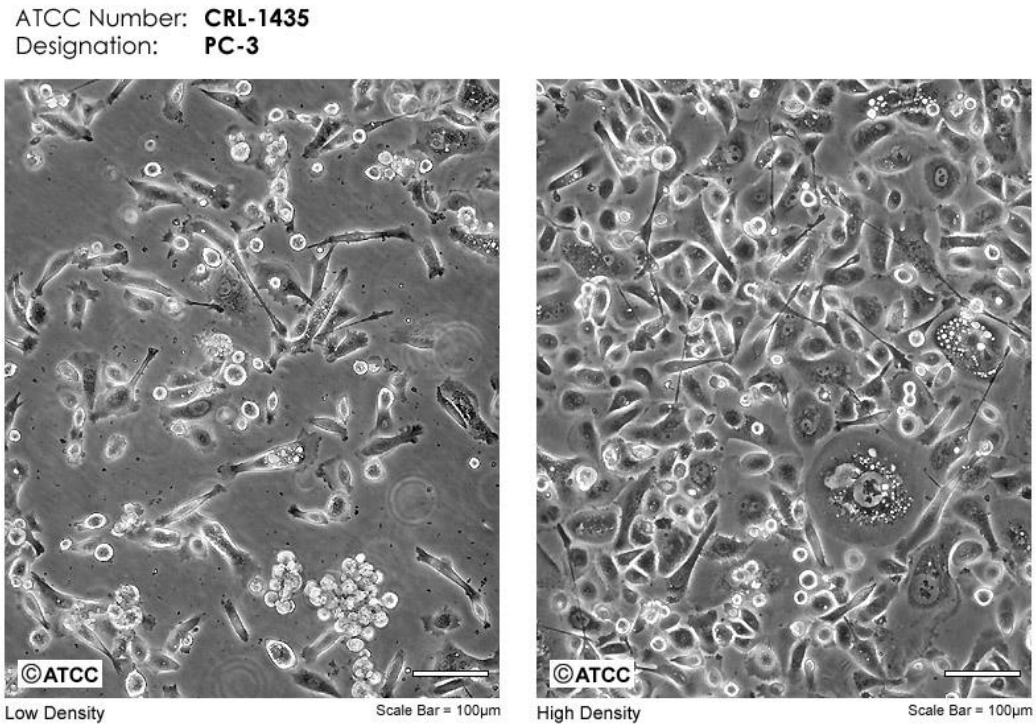
Bu çalışmada LNCaP insan prostat kanseri lenf metastazı ve PC3 insan prostat kanseri kemik metastazı hücre hatları kullanılmıştır. Hücre karakterizasyonları Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. Hücreler havalandırmalı T75 flasklar içinde %5 CO_2 ve 37 °C ortama sahip inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücre hatlarının yetiştirilmesi için kullanılan besiyeri: 500 mL RMPI 1640 medium + 60 ml FBS (fetal bovine serum) +, 6 ml penisilin-streptomisin, 3 ml L- glutamine, 6 ml sodyum pirüvattan oluşmaktadır.

Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının karakterizasyonları (American Type Culture Collection [ATCC], t.y.)

Hücrelerin özellikleri	LNCaP	PC3
Doku	Prostat	Prostat
Büyüme özellikleri	Yapışık	Yapışık
Türetilme şekli	Bu hücre hattı daha önce metastatik prostat kanseri tanısı alan 50 yaşında beyaz bir erkeğin sol supraklaviküler lenf düğümünden yapılan biyopsi ile izole edilmiştir.	Bu hücre hattı prostat adenokarsinomu tespit edilen 62 yaşında beyaz bir erkekte ki kemik metastazından izole edilmiştir.
Morfoloji	Epitel	Epitel
Metastatik	Lenf düğümü	Kemik
Hastalık	Karsinom	Adenokarsinom, IV. Evre.



Şekil 3. 1. LNCaP Hücre Hattı (ATCC, t.y.).



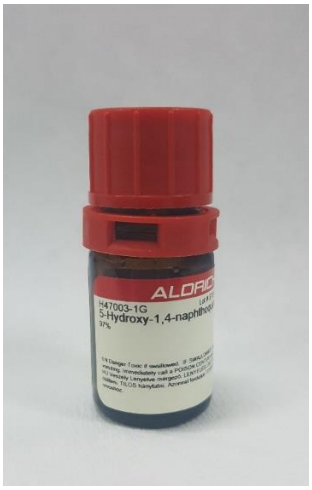
Şekil 3. 2. PC3 Hücre Hattı (ATCC, t.y.).

Hücrelerin pasajlanma prosedürü:

Flasklarda bulunan besiyeri uzaklaştırılır. Bu işlem esnasında flask yüzeyine yapışık bir şekilde bulunan hücreler tabandan ayrılmazlar. Hücreler PBS (Phosphate Buffered Saline) ile bir kez yıkanır ve PBS flasktan uzaklaştırılır. Daha sonra flasklara tripsin eklenerek flask tabanına yapışık halde bulunan hücrelerin bu yüzeyden ayrılması sağlanır. Tripsin eklendikten sonra 1- 2 dakika bekletilir. Tripsinin neden olduğu reaksiyonu durdurmak için bu süre sonunda tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri eklenir ve hücreler 15 mL'lik tüplere toplanır. Bu işlemden sonra tüplerde toplanan hücreler 2500 RPM, +4 °C'de 5 dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüj işlemi sonrası tüpteki süpernatant uzaklaştırılarak hücreler süspanse edilir. Yeni flasklara besiyeri eklenir ve bu hücre süspansiyonundan flasklara aktarılır.

3.3. Juglon Çözeltisinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan juglon ticari olarak temin edilmiştir (Sigma- Aldrich, St Louis, Amerika, Katalog No: H47003) (Şekil 3.3.). Katı formda +4 °C 'de muhafaza edilen Juglon (5-hidroksi, 1-4 naftakinon), 174,15 molekül ağırlığına sahiptir (Şekil 3.3.). Çalışmada kullanılmak üzere Juglon, 500 µM konsantrasyonda %2,5 etil alkol içinde çözdürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan bu stok solüsyon RPMI 1640 besiyeri ile seyreltilerek çalışmada farklı dozlarda uygulanmıştır.



Şekil 3. 3. Çalışmamızda kullanılan Juglon (5-hidroksi, 1-4 naftakinon)

3.4. 5-Florouasil Çözeltisinin Hazırlanması

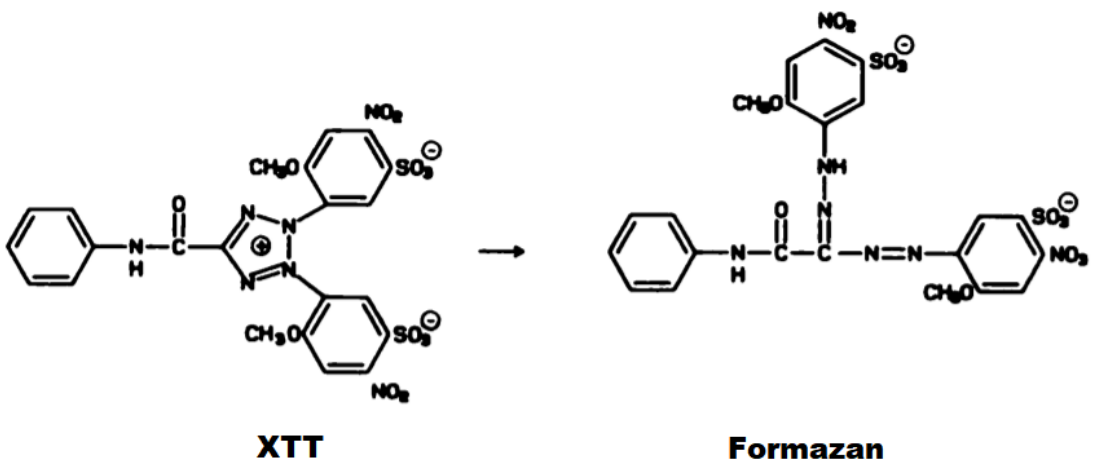
Bu çalışmada intravenöz enjeksiyon için solüsyon içeren flakon şeklinde FLUOROURACIL-KOÇAK 1000 mg/ 20 mL ticari olarak temin edilmiştir (Şekil 3.4.). Çözelti şeklinde bulunan Fluorouracil +4 °C' de muhafaza edilmiştir. 5-FU, $C_4H_3FN_2O_2$ kimyasal formülüne ve 130,077 molekül ağırlığına sahiptir. Çalışmada kullanılmak üzere 1000mg/ 20 mL Fluorouracil çözeltisinden 1000 µM konsantrasyonda bir stok hazırlanmıştır. RPMI 1640 besiyerinde seyreltilen bu stok solüsyon farklı dozlarda uygulanmıştır.



Şekil 3. 4. Çalışmada kullanılan antineoplastik ilaç.

3.5. XTT Testi

Hücresel canlılığın ve proliferasyonun belirlenmesinde çeşitli yöntemler ortaya koyulmuştur. Bu test yalnızca canlı hücrelerin renksiz veya hafif sarı renkte bir tetrazolyum tuzu olan XTT (2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilit tuzu)' yi indirgeyerek portakal renkli formazan ürünlerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.5.). Formazan boyalar sulu çözeltilerde çözünür ve oluşan renk değişimi doğrudan spektrofotometre ile ölçülerek ortamdaki canlı hücre miktarı belirlenebilmektedir (Scudiero ve diğerleri, 1988).



Şekil 3. 5. Canlı hücreler tarafından XTT metobolizasyonu sonucunda suda çözünebilen formozan ürünlerinin oluşumu (Scudiero ve diğerleri, 1988).

XTT test protokolü;

Hücreler T75 flasklarda 2 hafta boyunca çoğalmaları için bekletilmiştir. Yaklaşık %90 doluluğa ulaşan flasklardan pasajlama yöntemiyle 96 kuyucuklu platelere ekilen hücre hatları 48 saat boyunca 37 °C ve %5 CO_2 ortamlı inkübatörde inkübe edilmiştir. LNCaP hücre hattı için her kuyucuğa $20x10^3$ hücre, PC3 hücre hattı için ise her bir kuyucuğa $8x10^3$ hücre eklenmiştir. 48 saat inkübe edilen hücrelerin besiyerleri değiştirilerek juglon çözeltisinin 10 µM ile 100 µM arasında değişen konsantrasyonları ve 5-FU çözeltisinden

ise 10 µM ile 1280 µM arasında değişen konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklar PBS çözeltisi ile yıkanarak 100'er µL besiyeri eklenmiştir. Sonrasında her bir kuyucuğa aktive halde XTT solüsyonundan eklenerek 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 450 nm'de mikroplaka okuyucu ile absorbans ölçülmüştür. Muamele gruplarından blankler çıkarıldıktan sonra (1- A muamele grubu/ A kontrol grubu) x 100 formülü ile % canlılık değeri hesaplanmış ve buna göre bir proliferasyon eğrisi çizilmiştir. Proliferasyon eğrisinden hücre hatları için uygulanan tüm maddelerin IC50 dozları hesaplanmıştır. 5-FU için hesaplanan $IC_{12,5}$ konsatrasyonu sabit tutulmuş ve juglon için hesaplanan $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarıyla kombine bir şekilde LNCaP ve PC3 hücre hatlarıyla muamele edilmiştir.

Kimyasalın aktif hale getirilmesi:

Kimyasallar 37 °C su banyosunda deneyden hemen önce ısıtılarak eritilmiştir. XTT solüsyonuna(5000 µL) karanlık ortamda 1:50 hacim oranında elektron bağlayıcı solüsyondan (100 µL) eklenerek ölçüm solüsyonu aktif hale getirilmiştir.

3.6. Komet Testi

Komet testi hücresel anlamda çeşitli etmenlere bağlı olarak gerçekleşen DNA hasarı veya onarımının değerlendirilmesine imkan tanıyan genotoksisite testlerinden biridir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ökaryotik organizmalardan elde edilen farklı türden hücre tiplerindeki genotoksik etkilerin belirlenmesi için uygundur (Gajski, Langie ve Zhanataev, 2020). Yöntemin temel amacı, her bir hücrenin farklı ajanlar tarafından DNA hasarına uğrayıp uğramadığını elektroforez ortamında gerçekleşen göçe göre değerlendirmektir. Bu anlamda genetik hasar gerçekleşmeyen hücrelerde DNA'lar tek bir yüke sahip olacakları için elektroforez ortamında birlikte göç ederler. Buna karşılık kırık ve hasar bulunan hücre DNA'ları bütünlüğün bozulmasından dolayı farklı yüklere ve molekül ağırlığına sahip olan parçalara ayrılarak elektroforez ortamında değişen hızlarda göç ederler. Bunun sonucunda DNA'ya özgü boyalarla boyandığı zaman kuyruklu yıldız görünümü oluşturdukları gözlemlenir. Deney pozitif ve negatif kontrol gruplarıyla birlikte sürdürülerek sağlıklı bir sonuç elde edilebilir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).

Komet Test Protokolü:

Hücreler T75 cm^2'lik flasklarda %90 oranında çoğaltıldıktan sonra pasajlanarak T25 cm^2' lik flasklara aynı sayıda olacak şekilde bölünmüştür. İnkübe edilerek çoğalması sağlanan hücreler juglon ve 5- FU'nun XTT yöntemi ile belirlenen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonları ile ayrı ayrı 24 saat boyunca muamele edilmiştir. İki maddenin kombinasyonlarında ise LNCaP ve PC3 hücre hattına 5-FU, $IC_{12,5}$ konsatrasyonda sabit tutularak, juglon çözeltisinin $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda hücreler pasajlama yöntemi ile flasklardan tüplere aktarılmış ve santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler süspanse edilmiş ve agar kaplı lamlara yaymaya hazır hale getirilmiştir. Deneyde kullanılacak olan lamlar bir gün öncesinden agarla kaplanarak hazırlanmıştır.

Süspanse hale getirilen hücreler düşük erime noktasına sahip agaroz (LMA) PBS içinde ısıtma yöntemiyle jel haline getirildikten sonra karıştırılarak lamlara yayılmıştır. Bu işlem için jel haline getirilen LMA her doz için ependorflara bölünerek 37 °C su banyosuna alınmıştır. Süspanse edilen hücre pelletinden LMA ile karıştırılan hücreler rodajlı kısımları etiketlenen ve agarla kaplanan lamlara her bir doz için ayrı ayrı olacak şekilde yayılmıştır. Sonrasında lamelle kapatılan lamlar 10 dakika +4 °C'de bekletildikten sonra lameller çıkarılmış ve lamlar şalelere dizilmiştir. Şaleler lizis solüsyonu ile doldurulduktan sonra +4 °C'de ve karanlıkta 6 saat bekletilmiştir. Lizis solüsyonu deneyden önce hazırlanmıştır. Bunun için 7,4448 gr Na_2EDTA, 29,22 gr NaCl, ve 0,2422 gr Tris tartılmış ve 178 mL dH2O'da çözdürüldükten sonra pH değeri 10 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kullanılmadan 30 dk önce bu çözeltiye 20 mL DMSO ve 2 mL Triton x100 eklenmiştir. Lizis aşamasına kadar geçen sürede bu çözelti +4 °C'de bekletilmiştir.

6 saat boyunca +4 °C'de ve karanlıkta bekletilen hücreler elektroforez tankına alınarak akım vermeden 30 dk boyunca yürütme tamponunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda 300 mA, 25V'da 30 dk boyunca yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada kullanılan yürütme tamponu deneyden önce hazırlanmış ve yürütme aşamasına kadar +4 °C'de bekletilmiştir. Yürütme tamponu için 18 gr NaOH ve 0,56 gr Na_2EDTA, 1,5 L dH_2O'da çözdürüldükten sonra pH değeri 13'e ayarlanmıştır.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamlar 5 dakika boyunca karanlık ortamda nötralizasyon tamponu içerisinde bekletilmiştir. Nötralizasyon tamponu için 4,8456 gr Tris, 100 ml dH_2O' da çözdürülmüş ve pH değeri 7,5' e ayarlanmıştır. Nötralizasyon işleminden sonra soğuk suya daldırılan lamlar kuruması için bekletilmiş ve sonrasında etanolde 5 dk bekletilerek fikse edilmiştir.

Tüm bu işlemlerden sonra boyama aşamasında lamlar 20 µg/mL konsantrasyonlu EtBr ile boyanmış ve lamelle kapatıldıktan sonra floresan mikroskop ile komet fotoğrafları çekilmiştir. Bu aşamada her konsantrasyon için 100'er fotoğraf çekilmiş ve bu fotoğraflar Kameram 21 komet sayım programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Komet analizi için Kuyruk DNA%, Kuyruk uzunluğu (µm) ve Olive Tail Moment (OTM) parametreleri dikkate alınarak sonuçlar belirlenmiştir.

3.7. ROS Testi

Bu yöntem kullanılarak juglon ve 5-FU'nun hücre için ROS oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Hücre içine giren 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)'ın esterazların etkisiyle 2',7'-dichlorodihydrofluorescin (DCFH)'a dönüştürüldükten sonra ortamdaki reaktif oksijenlerin varlığında okside olarak floresan özelliğiyle bilinen 2',7'- dichlorodihydrofluorescein (DCF)'a dönüşümü gerçekleşir.

ROS Testi Protokolü:

LNCaP ve PC3 hücre hatları T75 cm^2'lik flasklarda büyütüldükten sonra 96 kuyucuklu siyah platelere ekilmiştir. Ekim sonrasında platelerde 37 °C ve %5 CO^2 ortam sağlayan inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyerleri değiştirilerek PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Karanlık ortamda 5 mM DCFH-DA, RPMI 1640 içinde çözdürülerek stok çözelti hazırlanmıştır ve bu çözeltiden 1:9 oranında seyreltilerek her bir kuyucuya 100'er µL eklenmiştir. Plate 37 °C'de 120 dk boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda her bir kuyucuk PBS ile 2 defa yıkanmıştır ve çalışmada kullanılan maddeler ayrı ayrı XTT testi ile belirlenmiş olan $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. LNCaP ve PC3 hücre hattına 5-FU, $IC_{12,5}$

konsatrasyonda sabit tutularak, juglon çözeltisinin $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir.

Plateler absorbans değeri 480 nm/530 nm olan florometrik plaka okuyucu cihazda 48 saat boyunca belirli aralıklarla kinetik olarak okutulmuştur. Elde edilen ROS değerleri hesaplanarak grafiklerle ifade edilmiştir.

3.8. Annexin V Yöntemi İle Hücre Ölüm Şeklinin Belirlenmesi

Apoptozun erken dönemlerinde hücre yüzeyinde bazı değişiklikler meydana gelir. Membran bütünlüğü bozulmaya başlamadan önce hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) molekülleri dış yüzeye transloke olur. Anneksin-V fosfatidilserine yüksek oranda bağlanabilen bir proteindir. Floresan özelliğe sahip bir boya olan FITC ile işaretlenen Anneksin-V görünür hale getirilebilir. Fosfatidilserinin bu geçişi aynı zamanda nekrozda da gözlenen bir durumdur fakat hücre membran bütünlüğü de bozulmuş durumdadır. Ortama propidyum iyodür (PI) gibi farklı boyalar eklenerek normal hücreler (FITC- /PI -), apoptotik hücreler (FITC+ /PI-) ve nekrotik hücreler (FITC + /PI +) belirlenir (Vermes, Haanen, Nakken ve Reutellingsperger, 1995). DNA'nın GC bölgelerine spesifik olarak bağlanan aktinomisin D'nin bir türevi olan 7-aminoaktinomisin D (7-AAD) floresan özelliğe sahiptir. Bu yöntemde ölü hücreleri belirlemek için kullanılan 7-AAD'nin seçici bir rolü vardır. Geç apoptotik dönemde erken apoptotik döneme göre hücre membranı geçirgenliğinin artmasından dolayı DNA'ya bağlanan 7-AAD oranı da fazladır. Erken ve geç apoptotik evreleri bu şekilde birbirinden ayrılır (Zembruski, Stache, Haefeli ve Weiss, 2012).

Anneksin-V Test Protokolü:

Bu yöntemle hücre ölüm mekanizması Muse Annexin V & Dead Cell Kiti (Millipore, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Nekrotik veya apoptotik hücrelerin canlı hücrelerden ayrılmasını sağlayan bu yöntem Anneksin-V ve 7-AAD ile işaretlenen moleküllerin belirlenmesiden oluşur.

T75 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan LNCaP ve PC3 hücreleri, T25 cm^2'lik flasklara eşit oranda bölünmüş ve 37 °C'de %5 CO^2 içeren ortamda inkübe edilerek çoğalmaları sağlanmıştır. Sonrasında her bir flaska juglon XTT testi ile belirlenmiş olan IC12,5, IC25, IC50 ve IC75 konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. LNCaP ve PC3 hücre hattına 5-FU, $IC_{12,5}$ konsatrasyonda sabit tutularak, juglon çözeltisinin $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir.

Bu sürenin sonunda hücreler tüplerde toplanarak santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra süspanse hale getirilen hücrelerden 500 hücre/µL alınarak 1:1 oranında Annexin V & Dead Cell Assay kit çözeltisi ile karıştırılmış ve 20 dk boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiştir. Muse Cell Muse® Cell Analyzer (Millipore, Almanya) ile bu hücrelerin sayımı yapılmış ve sonuçlar grafiklerle birlikte elde edilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada yapılan deneylerin tamamı birbirinden bağımsız en az 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS 23 paket program kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım göstermelerine ve/veya homojen dağılımlarına bağlı olarak One Way ANOVA, Tukey ve Man Whitney U testleri uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. XTT Bulguları

Tez çalışmasında kullanılan juglon ve 5-FU'nun LNCaP ve PC3 hücre hatları üzerinde ayrı ayrı ve kombine bir şekilde sitotoksik etkisini belirlemek için yapılan XTT test bulguları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Juglon LNCaP ve PC3 hücre hatlarına 10 µM ve 100 µM arasında değişen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Bu doğal bileşiğin kullanılan hücre hatları üzerinde $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri hesaplanmıştır. 5-FU, LNCaP ve PC3 hücre hatlarına 10 µM ve 1280 µM arasında değişen konsantrasyonlarda 24 saat boyunca muamelesinde IC_{50} değeri hesaplanamadığından, hücre hatları bu maddeyle aynı konsantrasyonlarda 48 saat muamele edilmiştir. 5-FU'nun kullanılan hücre hatları üzerinde $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen IC değerlerinden LNCaP ve PC3 hücre hattına 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonda sabit tutulmuş ve juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonları kombine olarak olarak 24 saat boyunca muamele edilmiştir.

4.1.1. LNCaP Hücre Hattı İçin XTT Test Bulguları

- LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU'nun ayrı ayrı uygulanmasından elde edilen XTT bulguları:

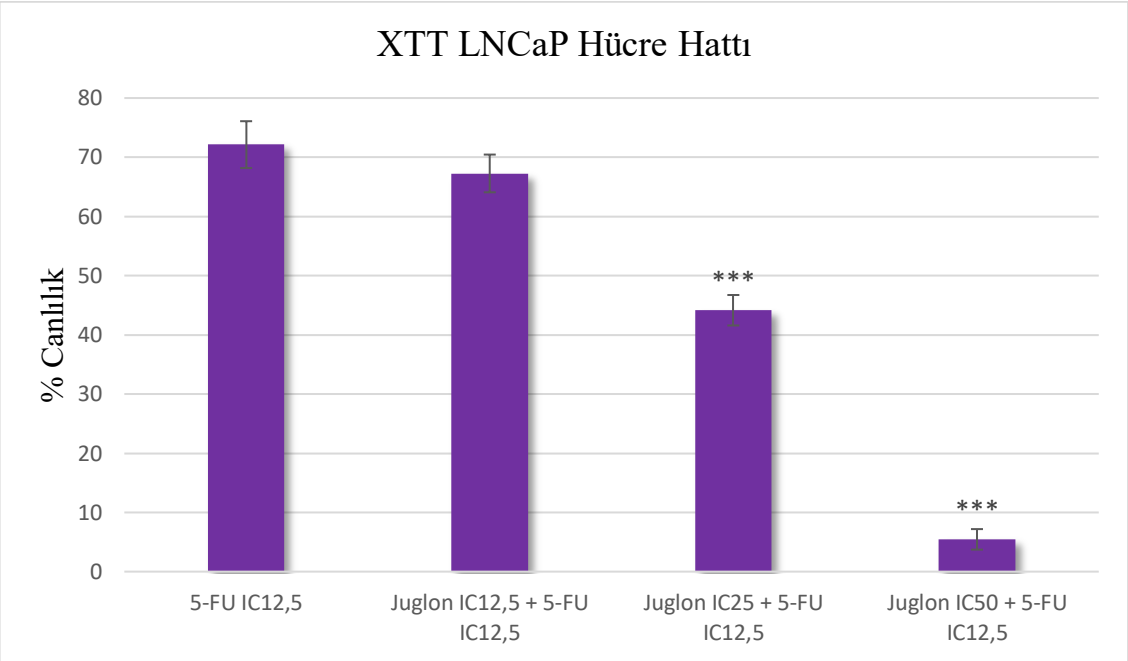
LNCaP hücre hattının juglon ile 24 saat muamelesi ile elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla 14,405 ± 1,214 µM, 28,810 ± 2,429 µM, 57,621 ± 4,859 µM ve 86,431 ± 7,288 µM olarak belirlenmiştir.

Aynı hücre hattının 5-FU ile 48 saat muamelesi ile elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla 54,715 ± 2,910 µM, 109,431 ± 5,820 µM, 218,863 ± 11,641 µM ve 328,294 ± 17,462 µM olarak belirlenmiştir. Elde edilen IC_{50} değerleri Şekil 4.3 ile gösterilmiştir.

- LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonu sonucunda elde edilen canlılık oranları:

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonları ile kombinasyonundan elde edilen canlılık oranları sırasıyla

%67,26, %44,15, %5,45 olarak belirlenmiştir. Ayrıca 5-FU'nun tek başına uygulanmasıyla elde edilen canlılık oranı %72,13 olarak belirlenmiştir. Elde edilen oranlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. Juglon ve 5-FU'nun kombinasyonlarının LNCaP hücre hattında yüzde canlılık değerleri üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (5-FU IC12 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

4.1.2. PC3 Hücre Hattı İçin XTT Test Bulguları

- PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU'nun ayrı ayrı uygulanmasından elde edilen XTT bulguları:

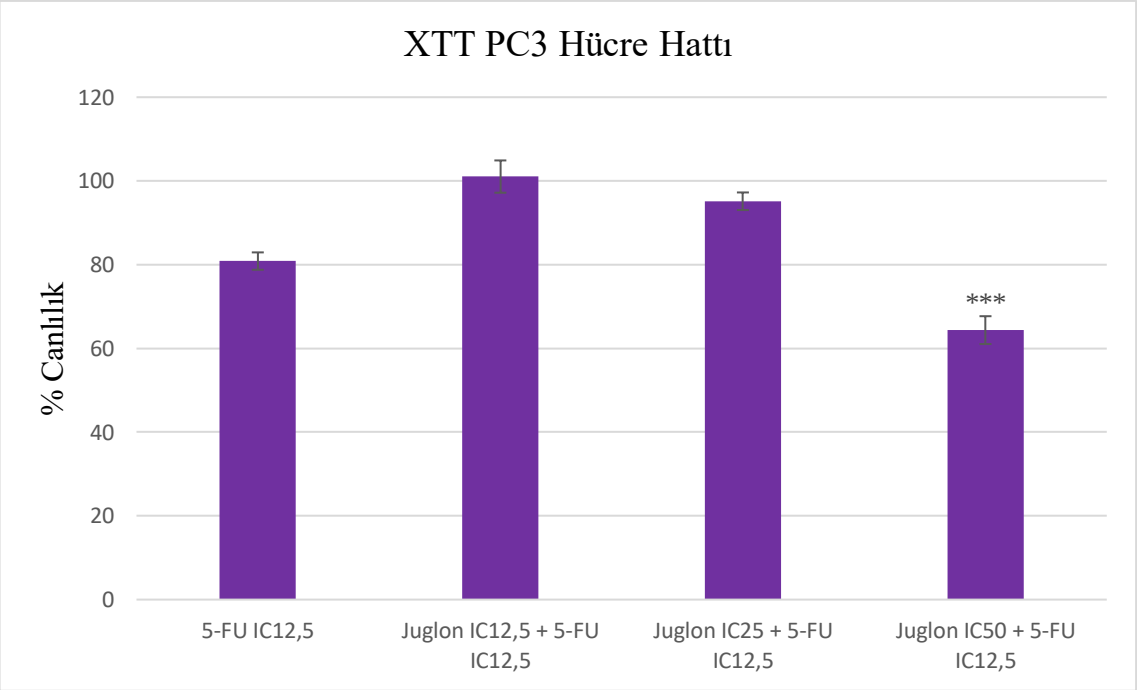
PC3 hücre hattının juglon ile 24 saat muamelesi ile elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla 14,817 ± 1,027 µM, 29,635 ± 2,054 µM, 59,271 ± 4,107 µM ve 88,907 ± 6,161 µM olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen bulgular Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Aynı hücre hattının 5-FU ile 48 saat muamelesi ile elde edilen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla 75,687 ± 1,210 µM, 151,374 ± 2,421 µM, 302,748 ± 4,842 µM ve

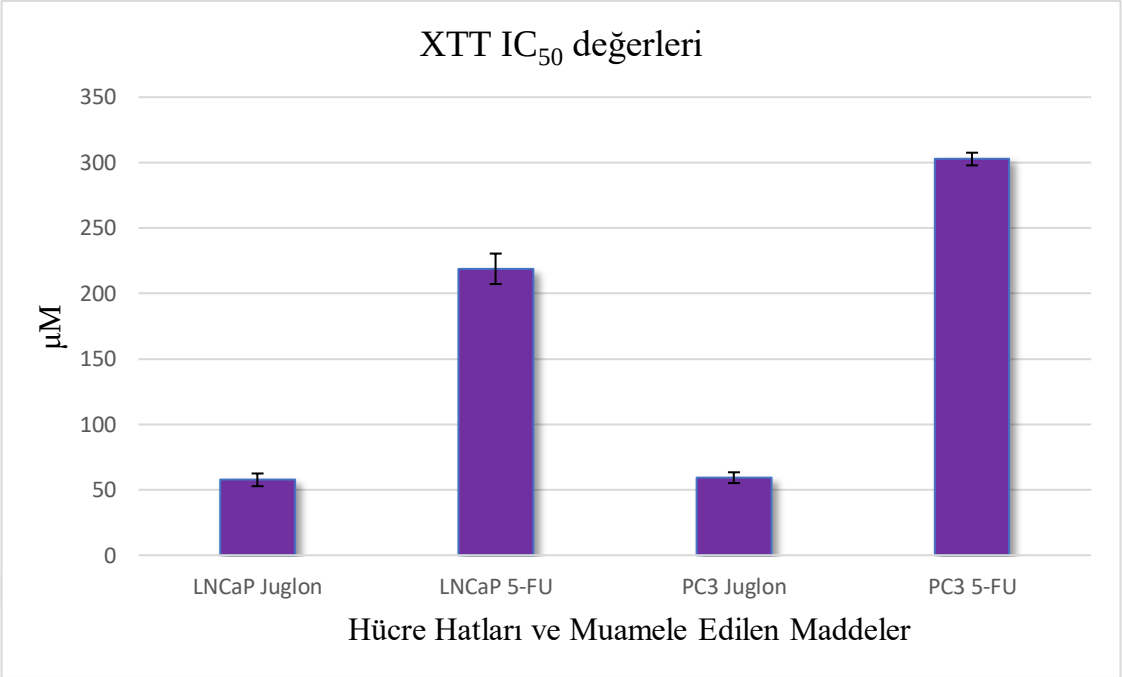
454,122 ± 7,263 µM olarak belirlenmiştir. Elde edilen IC_{50} değerleri Şekil 4.3 ile gösterilmiştir.

- PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonu sonucunda elde edilen canlılık oranları:

PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonları ile kombinasyonundan elde edilen canlılık oranları sırasıyla %100,05, %95,15 ve %64,36 olarak belirlenmiştir. Ayrıca 5-FU'nun tek başına uygulanmasıyla elde edilen canlılık oranı %80,85 olarak belirlenmiştir. Elde edilen oranlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2. Juglon ve 5-FU'nun kombinasyonlarının LNCaP hücre hattında yüzde canlılık değerleri üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (5-FU IC12 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001)).



Şekil 4. 3. LNCaP ve PC3 hücre hatlarında juglonun (24 saat) IC50 değerleri ve 5-FU'nun (48 saat) IC50 değerleri(ortalama ± standart sapma).

4.2. Komet Testi Bulguları

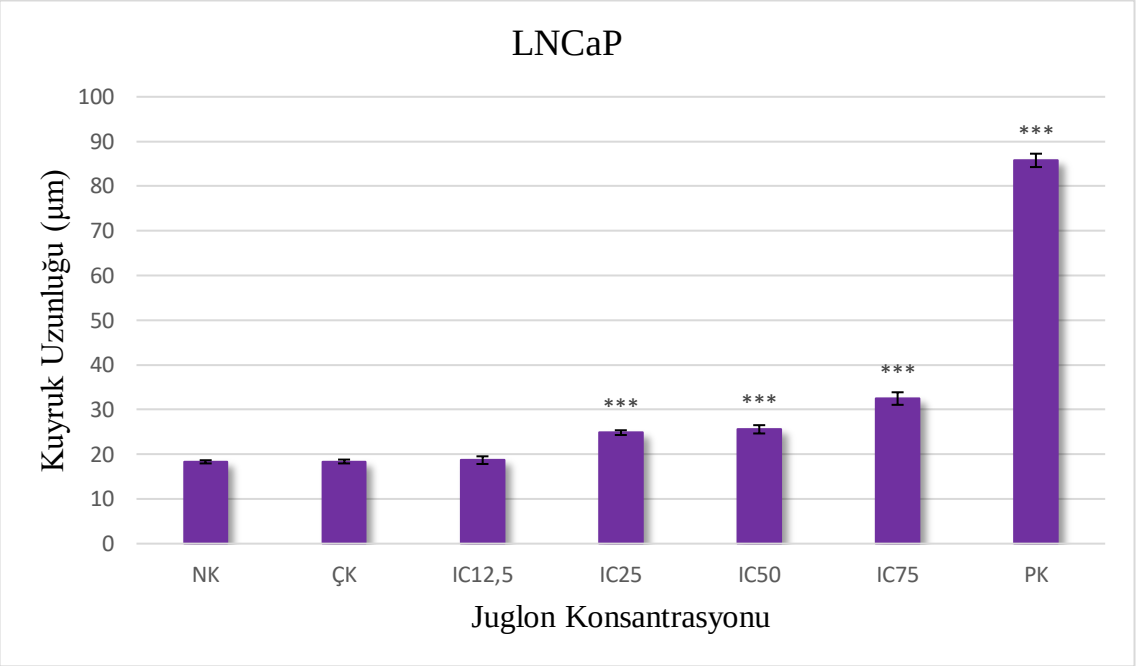
Juglon ve 5-FU'nun LNCaP ve PC3 hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda 24 saat boyunca muamele edilmesiyle yapılan komet testi ile kuyruk uzunluğu, kuyruk% DNA ve olive kuyruk momenti bulguları belirlenmiştir. LNCaP ve PC3' ün juglon ve 5-FU kombinasyonları için 5-FU konsantrasyonları sabit tutulmuş ve juglon artan konsantrasyonlarda muamele edilmiştir.

4.2.1. LNCaP Hücre Hattı İçin Komet Testi Bulguları

LNCaP hücre hattının juglon ve 5-FU'nun çeşitli konsantrasyonlarıyla ayrı ayrı ve kombine olarak 24 saat süreyle muamelesinden sonra elde edilen kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti bulguları gösterilmiştir.

- LNCaP hücre hattında juglon için elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri:

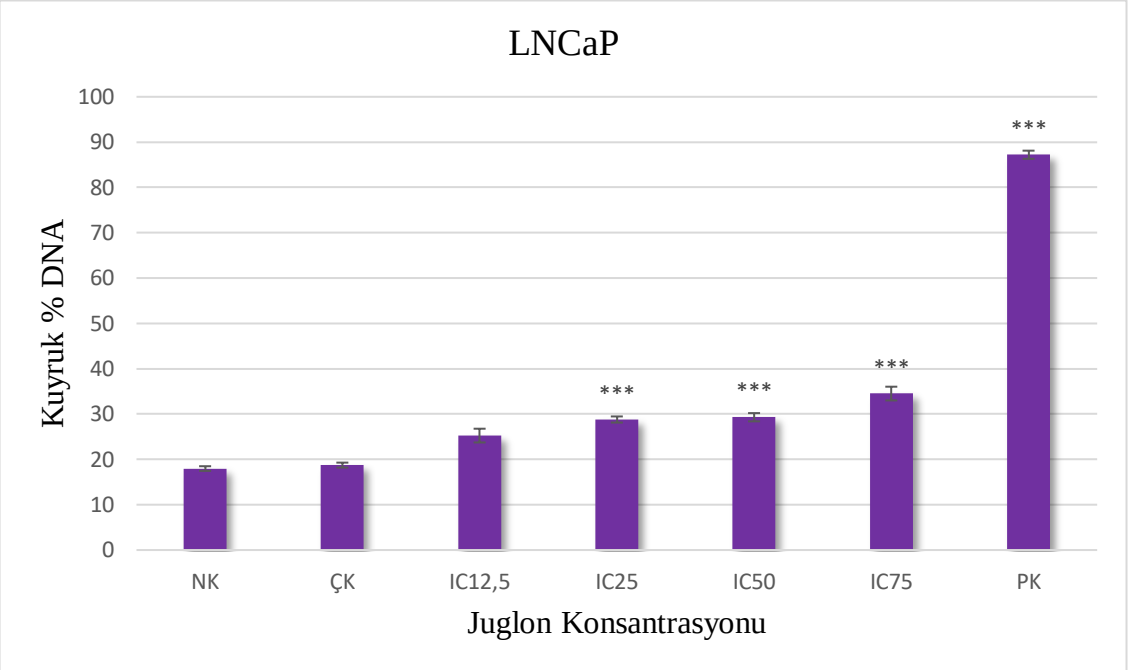
LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunlukları sırasıyla 18,68 ± 0,85 µm, 24,84 ± 0,53 µm, 25,58 ± 1,92 µm ve 32,46 ± 1,40 µm olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 18,30 ± 0,35 µm, 18,38 ± 0,43 µm ve 85,76 ± 1,49 µm olarak belirlenmiştir. Juglonun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri Şekil 4.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 4. Juglonun LNCaP hücre hattında kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında juglon için elde edilen kuyruk %DNA değerleri:

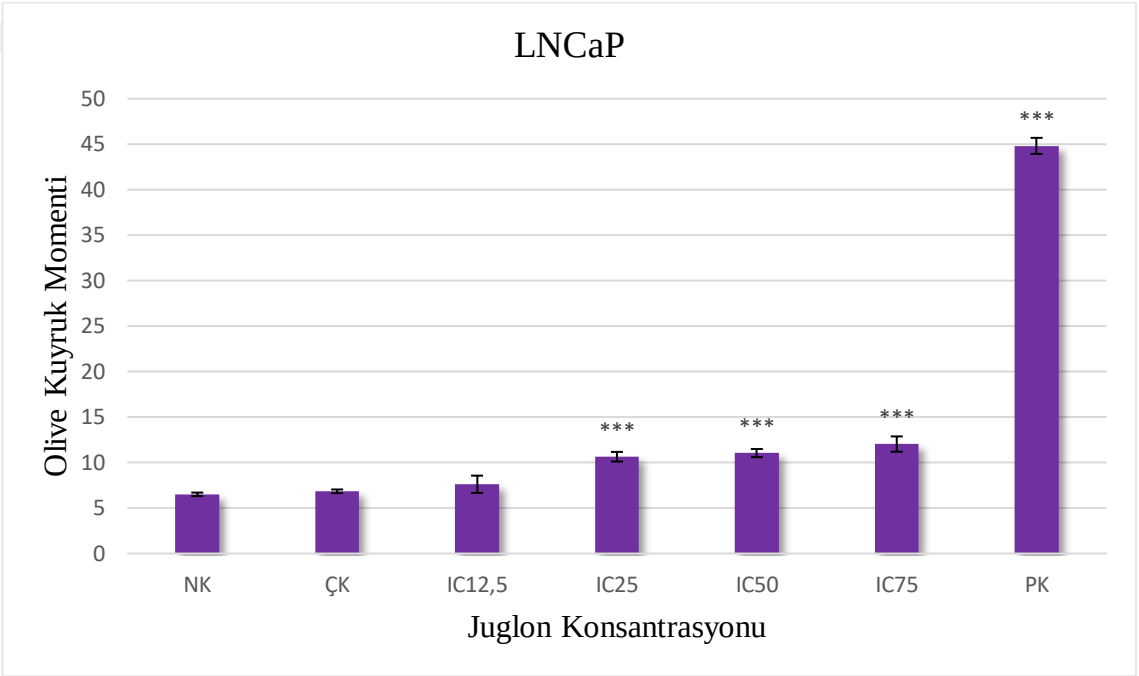
LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 25,25 ± 1,51, 28,79 ± 0,67, 29,30 ± 0,91 ve 34,52 ± 1,51 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 17,97 ± 0,51, 18,74 ± 0,54 ve 87,21 ± 0,90 olarak belirlenmiştir. Juglonun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen kuyruk %DNA değerleri Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 5. Juglonun LNCaP hücre hattında kuyruk %DNA değerleri üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattı için olive kuyruk momenti değerleri:

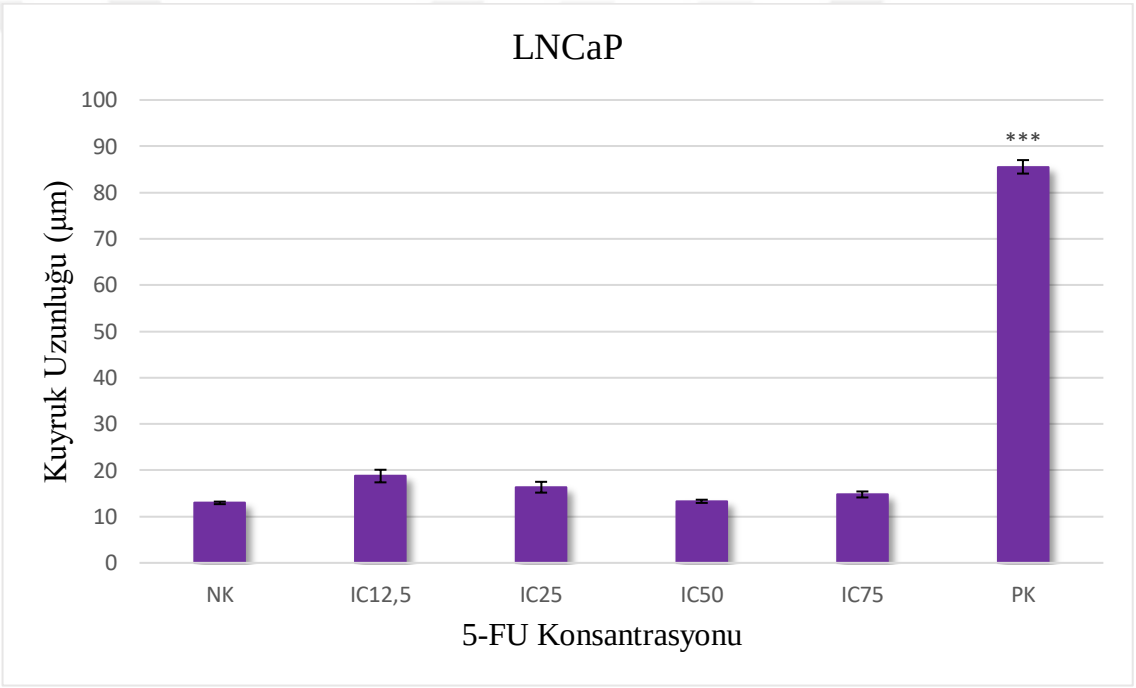
LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 7,61 ± 0,95, 10,64 ± 0,52, 11,03 ± 0,44 ve 12,03 ± 0,84 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 6,50 ± 0,19, 6,83 ± 0,20 ve 44,80 ± 0,88 olarak belirlenmiştir. Juglonun LNCaP hücre hattına uygulanmasıyla elde edilen olive kuyruk momenti değerleri Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 6. Juglonun LNCaP hücre hattında olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında 5-FU için elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri:

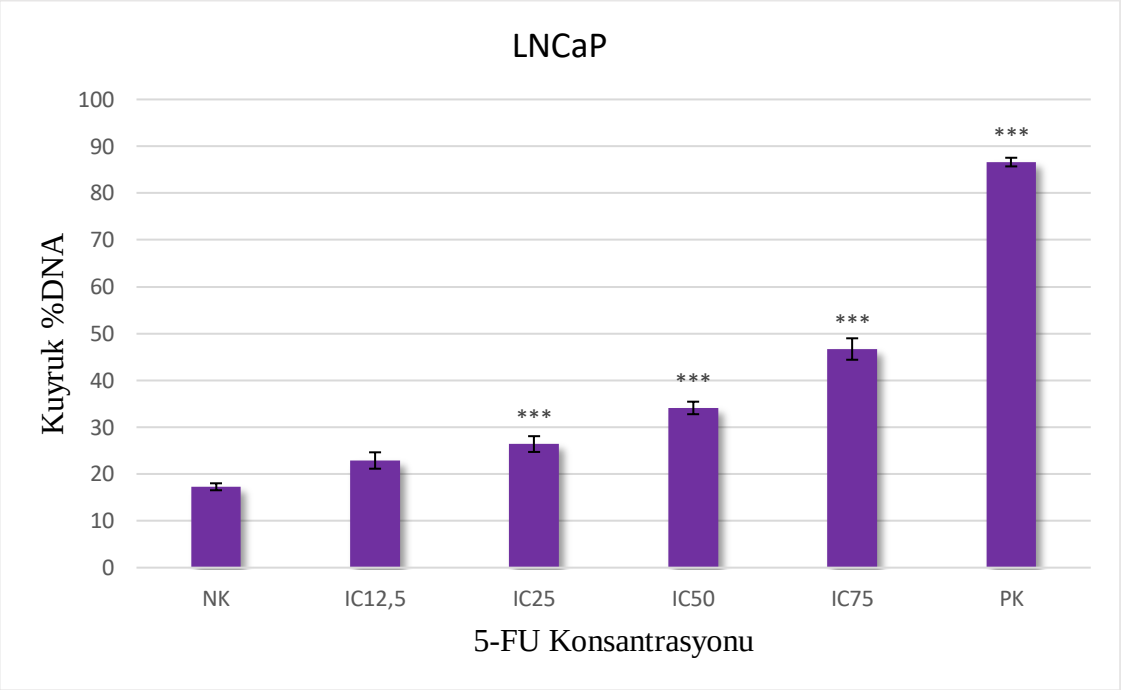
LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunlukları sırasıyla 18,75 ± 1,35 µm, 16,34 ± 1,16 µm, 13,29 ± 0,34 µm ve 14,77 ± 0,64 µm olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 12,95 ± 0,27 µm ve 85,56 ± 1,45 µm olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 7. 5-FU'nun LNCaP hücre hattında kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında 5-FU için elde edilen kuyruk % DNA değerleri:

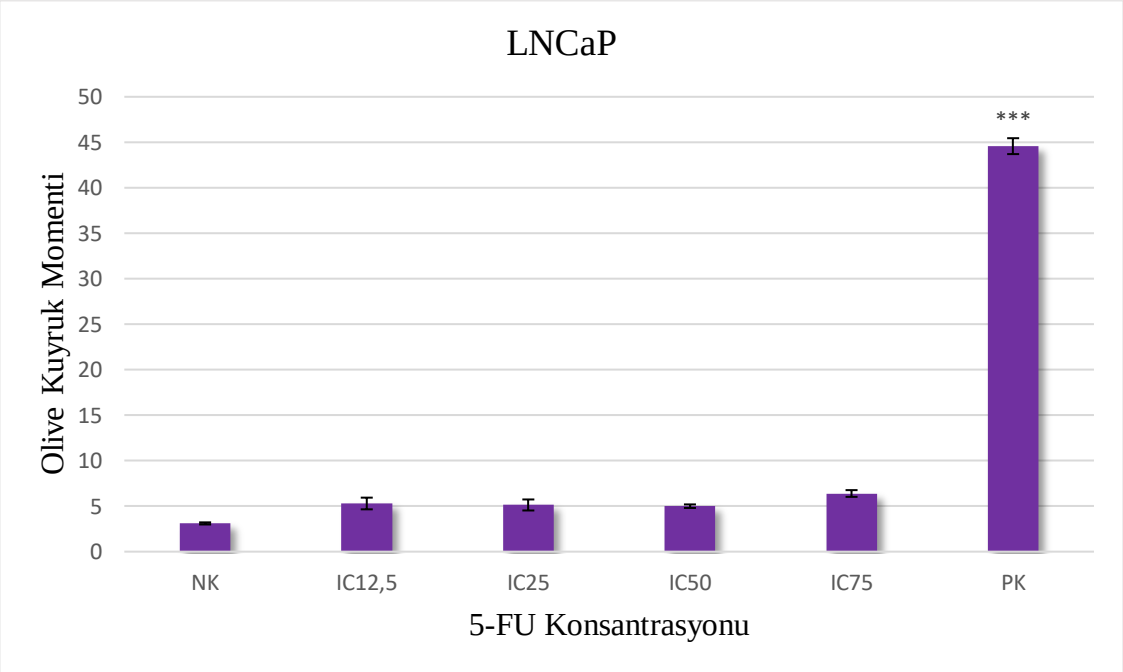
LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 22,88 ± 1,75, 26,39 ± 1,68, 34,10 ± 1,33 ve 46,69 ± 2,29 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 17,26 ± 0,73 ve 86,62 ± 0,92 olarak belirlenmiştir. 5- FU' nun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen kuyruk %DNA değerleri Şekil 4.8.'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 8. 5-FU'nun LNCaP hücre hattında kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında 5-FU için elde edilen kuyruk olive kuyruk momenti değerleri:

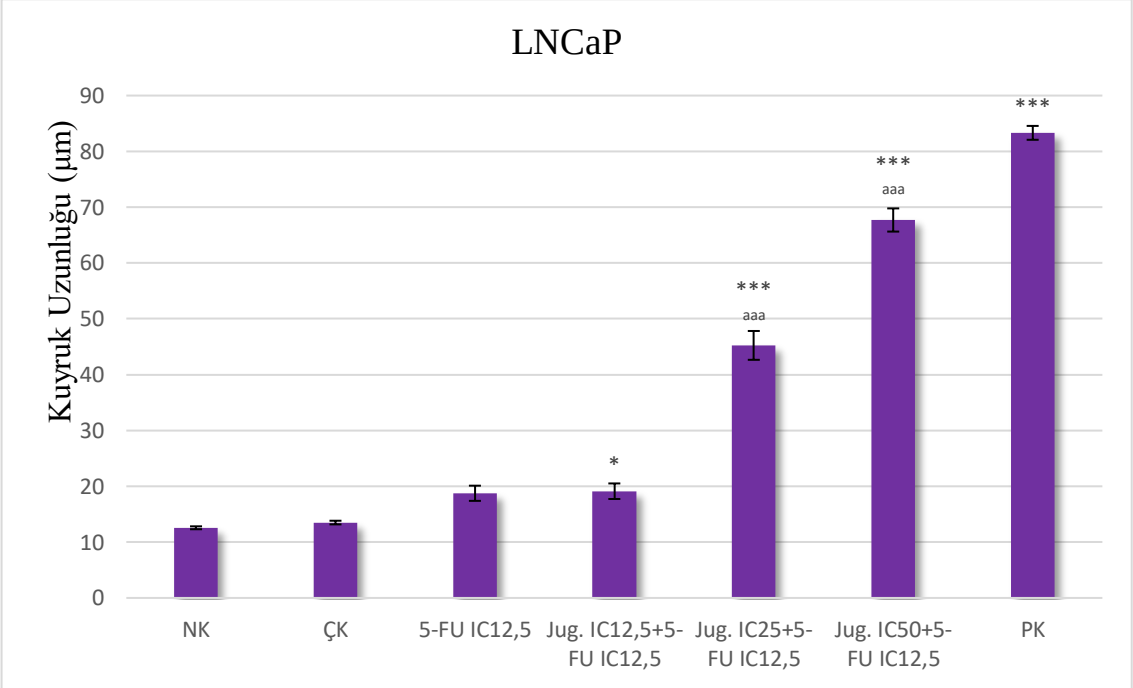
LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 5,29 ± 0,64, 5,12 ± 0,60, 4,99 ± 0,19 ve 6,39 ± 0,37 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 3,10 ± 0,11 ve 44,57 ± 0,87 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun LNCaP hücre hattına uygulanmasıyla elde edilen olive kuyruk momenti değerleri Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 9. 5-FU'nun LNCaP hücre hattında olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonundan elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri:

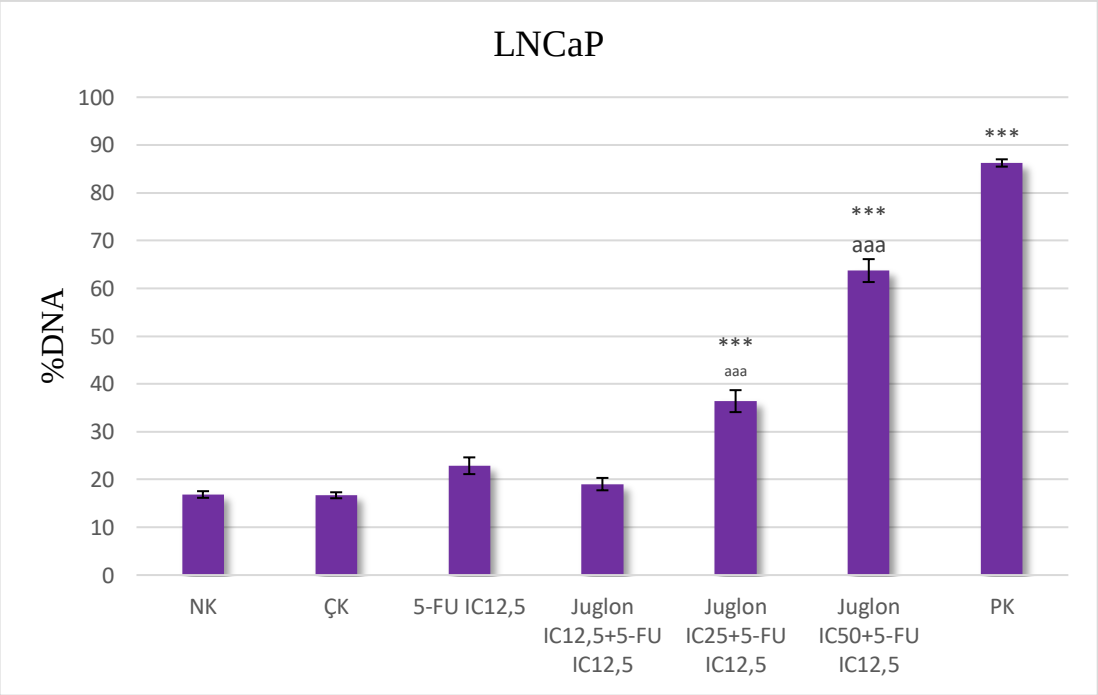
LNCaP hücre hattında 5-FU'nun $IC_{12,5}$ değeri sabit olacak şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} değerleri ile kombinasyonu sonucunda elde edilen kuyruk uzunlukları sırasıyla 19,12 ± 1,39 µm, 45,24 ± 2,58 µm ve 67,70 ± 2,07 µm olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 12,56 ± 0,26 µm, 13,50 ± 0,32 µm ve 83,32 ± 1,24 µm olarak belirlenmiştir. LNCaP hücre hattının juglon ve 5-FU'nun kombinasyonları ile muamelesinden elde edilen kuyruk uzunluğu sonuçları Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 10. Juglon ve 5-FU kombinasyonlarının LNCaP hücre hattında kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (*p<0,05, ***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonundan elde edilen kuyruk % DNA değerleri:

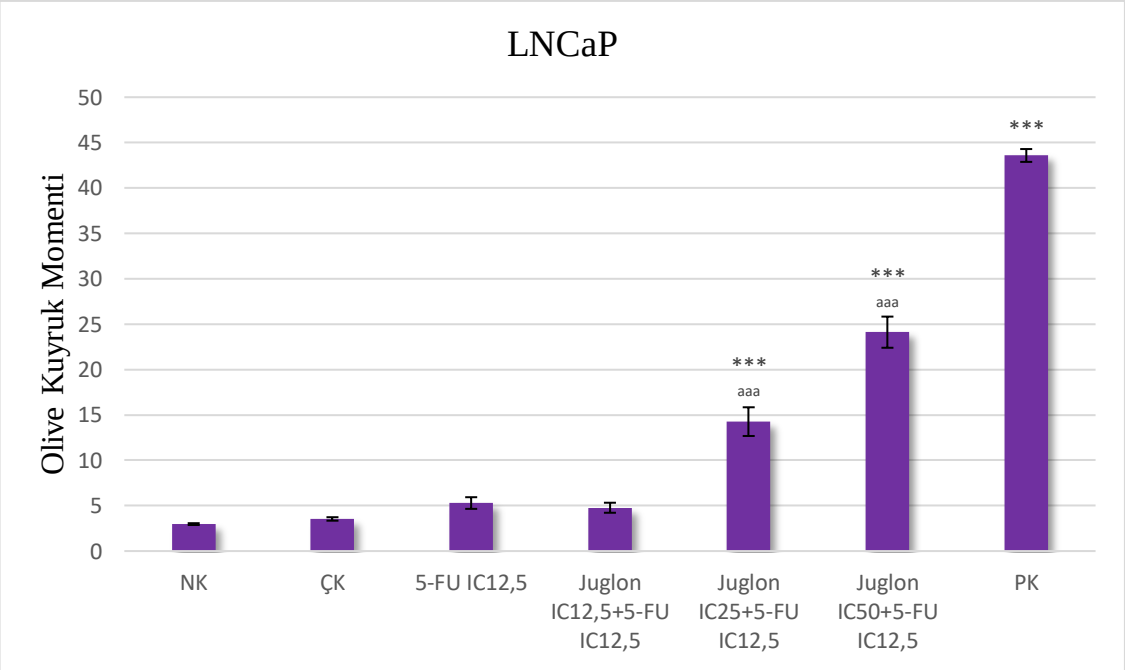
LNCaP hücre hattında 5-FU'nun $IC_{12,5}$ değeri sabit olacak şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} değerleri ile kombinasyonu sonucunda elde edilen kuyruk %DNA değerleri sırasıyla 19,03 ± 1,29, 36,40 ± 2,29 ve 63,71 ± 2,39 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 16,86 ± 0,69, 16,70 ± 0,62 ve 86,24 ± 0,76 olarak belirlenmiştir. LNCaP hücre hattının juglon ve 5-FU'nun kombinasyonları ile muamelesinden elde edilen kuyruk %DNA değerleri Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 11. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun LNCaP hücre hattında % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonundan elde edilen olive kuyruk momenti değerleri:

LNCaP hücre hattında 5-FU'nun $IC_{12,5}$ değeri sabit olacak şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} değerleri ile kombinasyonu sonucunda elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 4,77 ± 0,55, 14,26 ± 1,58 ve 24,11 ± 1,71 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 2,97 ± 0,10, 3,53 ± 0,19 ve 43,58 ± 0,70 olarak belirlenmiştir. LNCaP hücre hattının juglon ve 5-FU'nun kombinasyonları ile muamelesinden elde edilen olive kuyruk momenti değerleri Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.



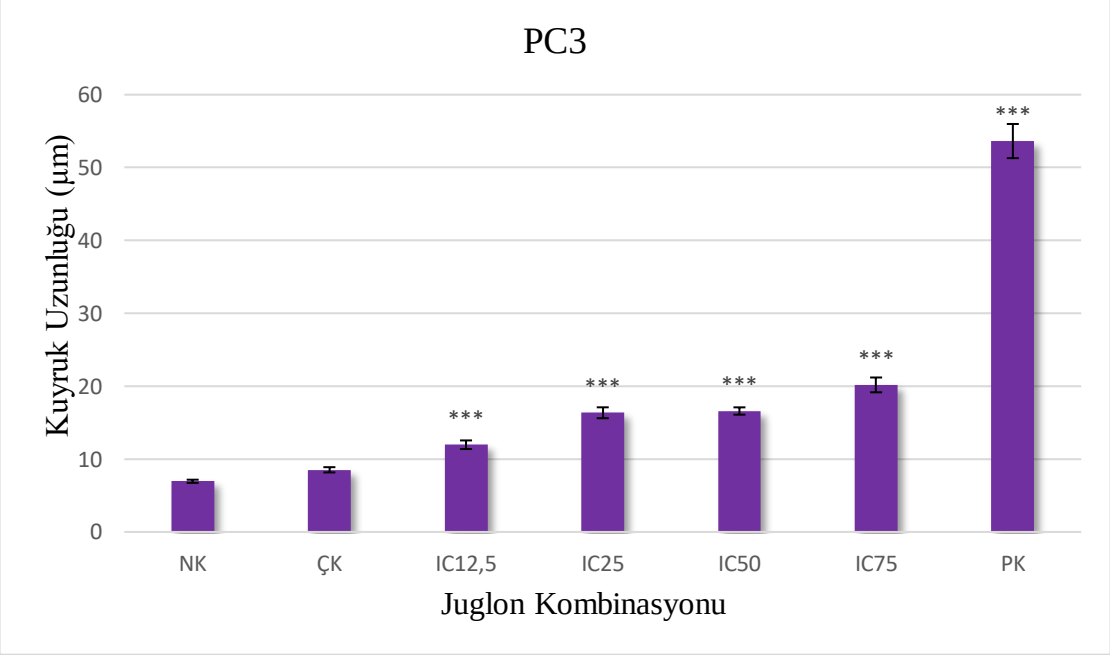
Şekil 4. 12. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun LNCaP hücre hattında % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa},p<0,001)).

4.2.2. PC3 Hücre Hattı İçin Komet Test Bulguları

PC3 hücre hattının juglon ve 5-FU'nun çeşitli konsantrasyonlarıyla ayrı ayrı ve kombine olarak 24 saat süreyle muamelesinden sonra elde edilen kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti değerleri gösterilmiştir.

- PC3 hücre hattında juglon için elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri:

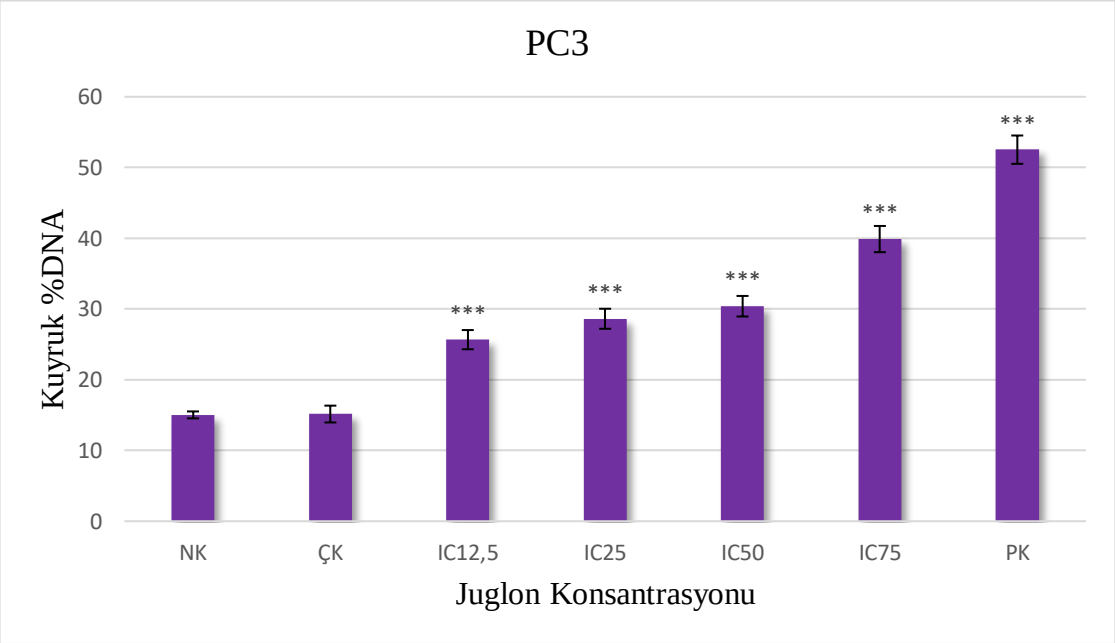
PC3 hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunlukları sırasıyla 11,96 ± 0,59 µm, 16,35 ± 0,74 µm, 16,59 ± 0,50 µm ve 20,17 ± 1,01 µm olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 6,94 ± 0,21 µm, 8,52 ± 0,36 µm ve 53,63 ± 2,34 µm olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri Şekil 4.13.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 13. PC3 hücre hattında juglonun kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- PC3 hücre hattında juglon için elde edilen kuyruk %DNA değerleri:

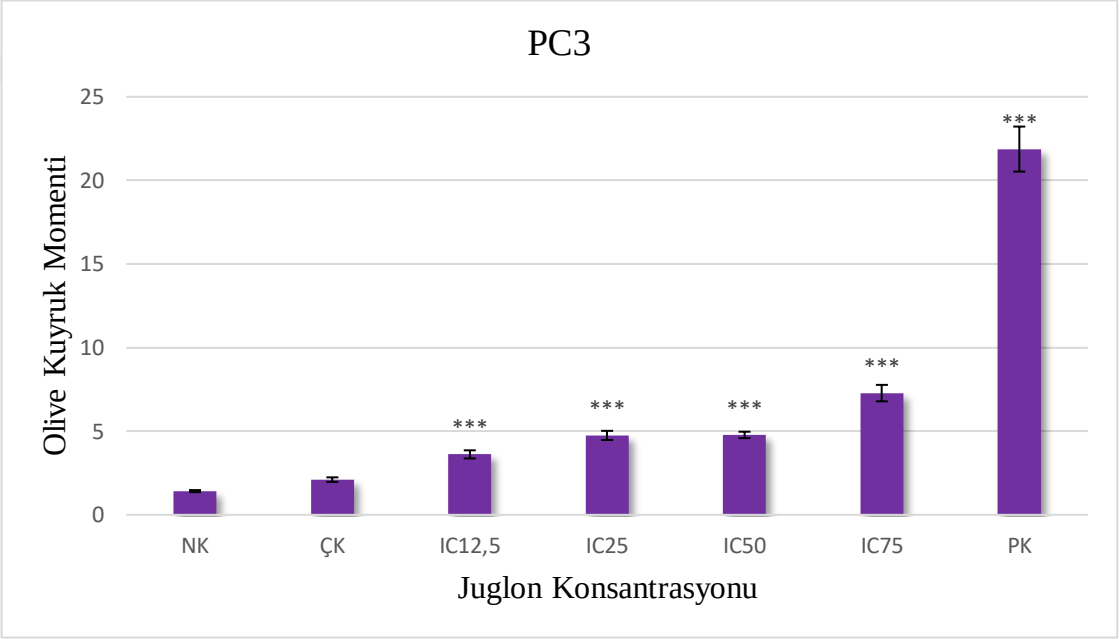
PC3 hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 25,66 ± 1,35, 28,62 ± 1,41, 30,39 ± 1,45 ve 39,88 ± 1,85 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 15,02 ± 0,49, 15,14 ± 1,91 ve 52,52 ± 2,00 olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen bulgular Şekil 4.14.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 14. PC3 hücre hattında juglonun kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- PC3 hücre hattında juglon için elde edilen olive kuyruk momenti değerleri:

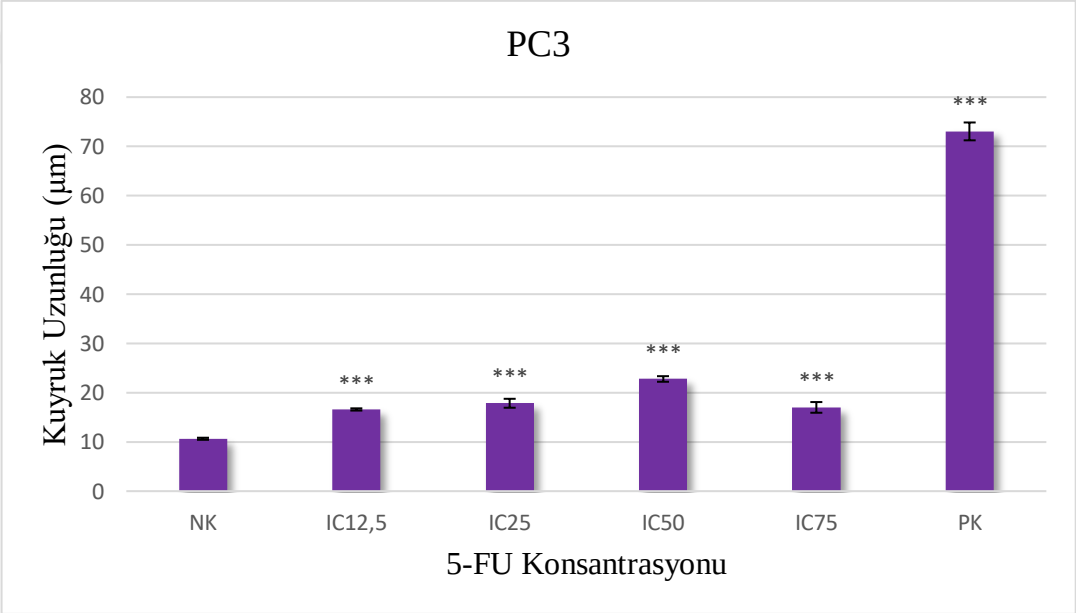
PC3 hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 3,61 ± 0,24, 4,74 ± 0,27, 4,77 ± 0,19 ve 7,27 ± 0,49 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,41 ± 0,06, 2,10 ± 0,13 ve 21,87 ± 1,34 olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasıyla elde edilen olive kuyruk momenti değerleri Şekil 4.15.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 15. PC3 hücre hattında juglonun olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- PC3 hücre hattında 5-FU için elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri:

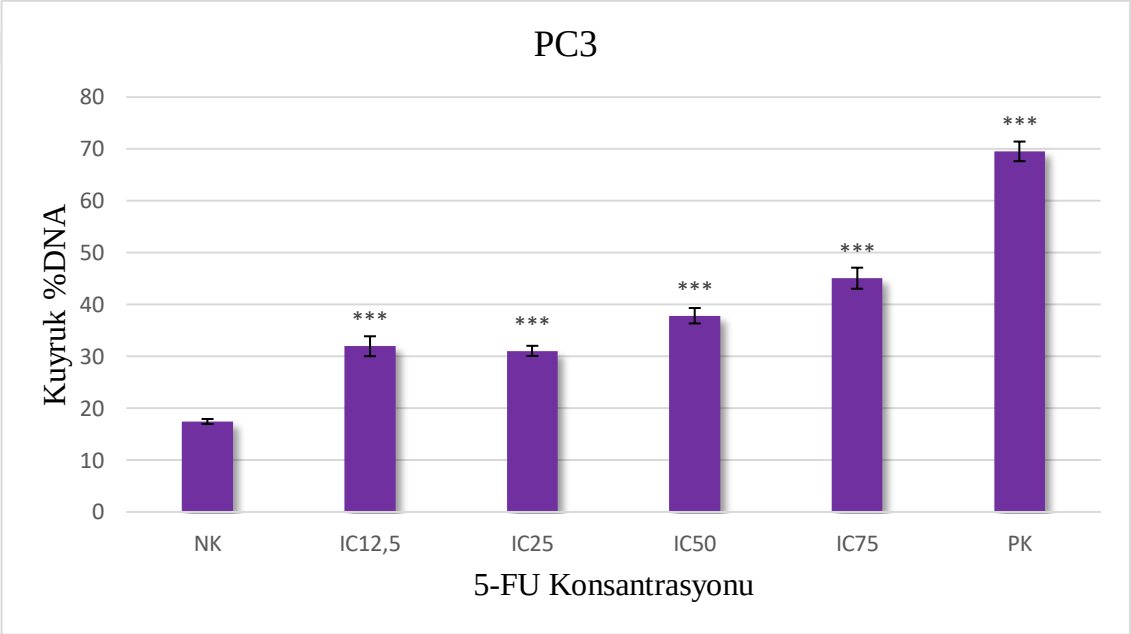
PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunlukları sırasıyla 16,58 ± 0,22 µm, 17,84 ± 0,90 µm, 22,77 ± 0,56 µm ve 17,00 ± 1,08 µm olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 10,63 ± 0,21 µm ve 73,04 ± 1,81 µm olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen bulgular Şekil 4.16.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 16. PC3 hücre hattında 5-FU'nun kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- PC3 hücre hattında 5-FU için elde edilen kuyruk % DNA değerleri:

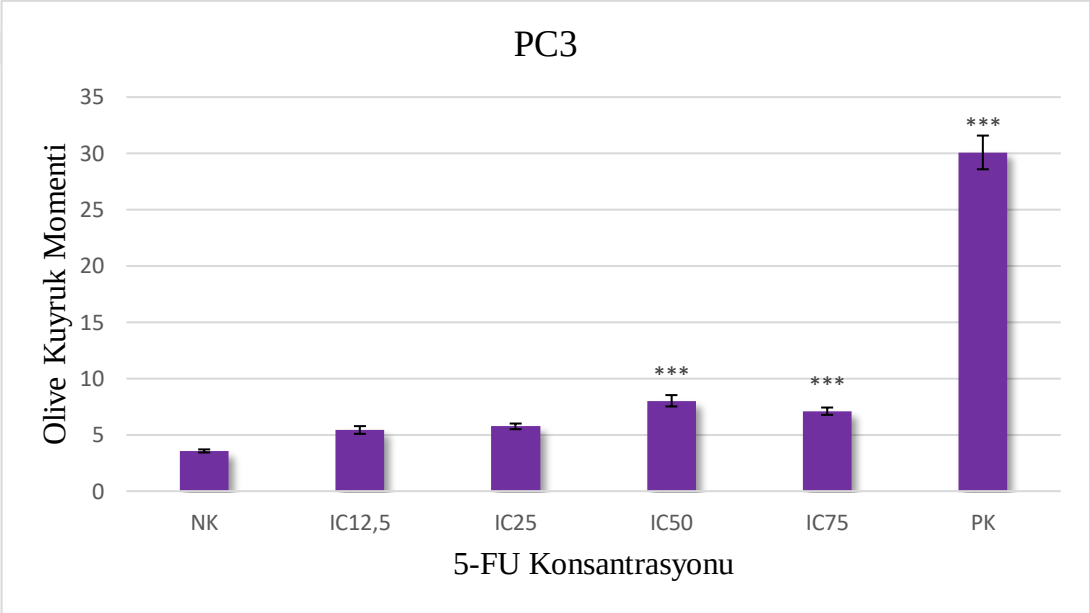
PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 31,95 ± 1,92, 31,05 ± 0,98, 37,83 ± 1,49 ve 45,07 ± 2,03 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 17,45 ± 0,47 ve 69,53 ± 1,89 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen bulgular Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 17. PC3 hücre hattında 5-FU'nun kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- PC3 hücre hattında 5-FU için elde edilen olive kuyruk momenti değerleri:

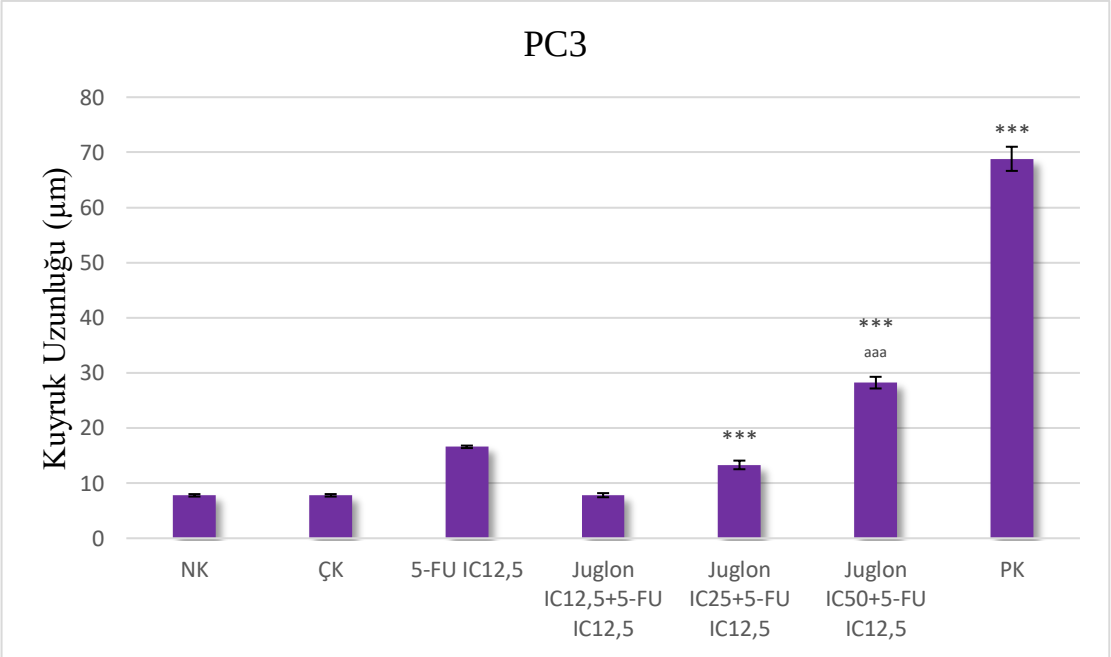
PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 5,43 ± 0,34, 5,75 ± 0,25, 8,02 ± 0,50 ve 7,10 ± 0,32 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 3,57 ± 0,13 ve 30,08 ± 1,49 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun PC3 hücre hattına uygulanmasıyla elde edilen olive kuyruk momenti değerleri Şekil 4.18.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 18. PC3 hücre hattında 5-FU'nun olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonundan elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri:

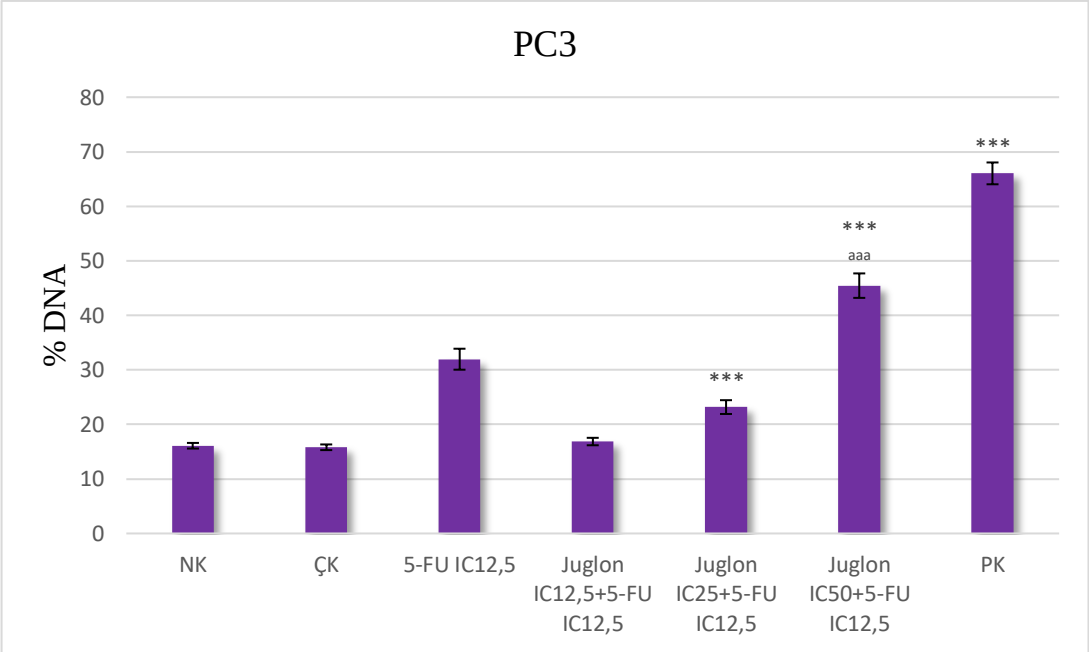
PC3 hücre hattında 5-FU'nun $IC_{12,5}$ değeri sabit olacak şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} değerleri ile kombinasyonu sonucunda elde edilen kuyruk uzunlukları sırasıyla 7,81 ± 0,37 µm, 13,30 ± 0,78 µm ve 28,22 ± 1,05 µm olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 7,78 ± 0,22 µm, 7,79 ± 0,22 µm ve 68,82 ± 2,18 µm olarak belirlenmiştir. PC3 hücre hattının juglon ve 5-FU'nun kombinasyonları ile muamelesinden elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri Şekil 4.19.'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 19. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonunun kuyruk uzunluğu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

- PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonundan elde edilen kuyruk % DNA değerleri:

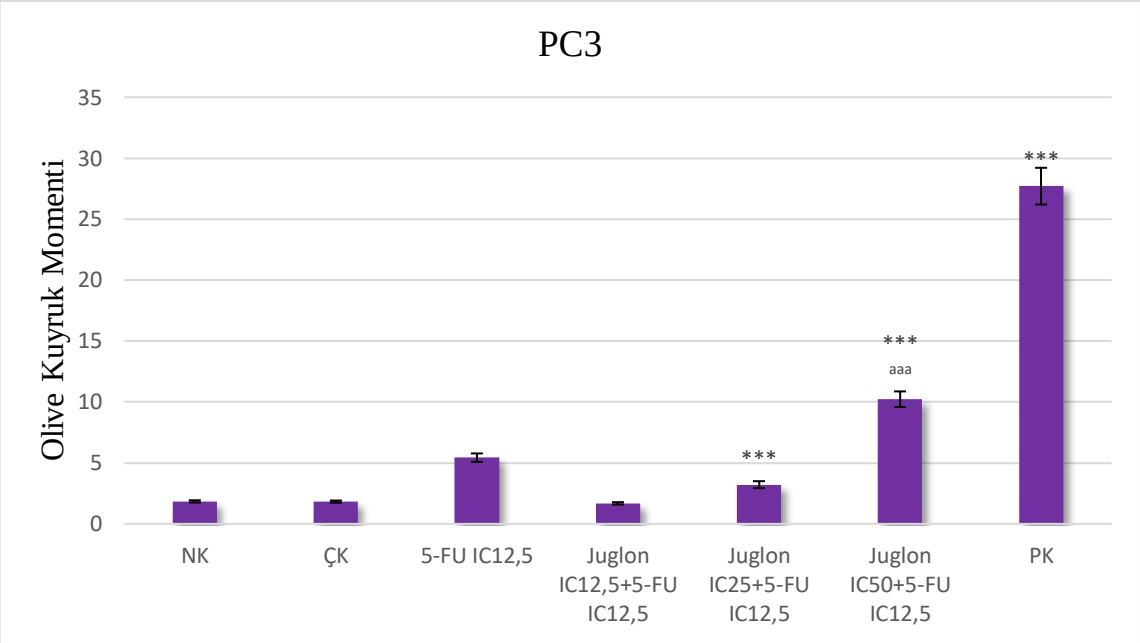
PC3 hücre hattında 5-FU'nun $IC_{12,5}$ değeri sabit olacak şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} değerleri ile kombinasyonu sonucunda elde edilen kuyruk %DNA değerleri sırasıyla 16,85 ± 0,68, 23,17 ± 1,26 ve 45,44 ± 2,24 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 16,09 ± 0,51, 15,80 ± 0,51 ve 66,03 ± 2,00 olarak belirlenmiştir. PC3 hücre hattının juglon ve 5-FU'nun kombinasyonları ile muamelesinden elde edilen kuyruk % DNA değerleri Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 20. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonunu kuyruk % DNA üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

- PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonundan elde edilen olive kuyruk momenti değerleri:

PC3 hücre hattında 5-FU'nun $IC_{12,5}$ değeri sabit olacak şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} değerleri ile kombinasyonu sonucunda elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 1,68 ± 0,09, 3,21 ± 0,28 ve 10,22 ± 0,64 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,84 ± 0,08, 1,82 ± 0,08 ve 27,70 ± 1,50 olarak belirlenmiştir. PC3 hücre hattının juglon ve 5-FU'nun kombinasyonları ile muamelesinden elde edilen olive kuyruk momenti değerleri Şekil 4.21.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 21. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonunun olive kuyruk momenti üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

4.3. ROS Testi Bulguları

4.3.1. LNCaP Hücre Hattı İçin ROS Testi Bulguları

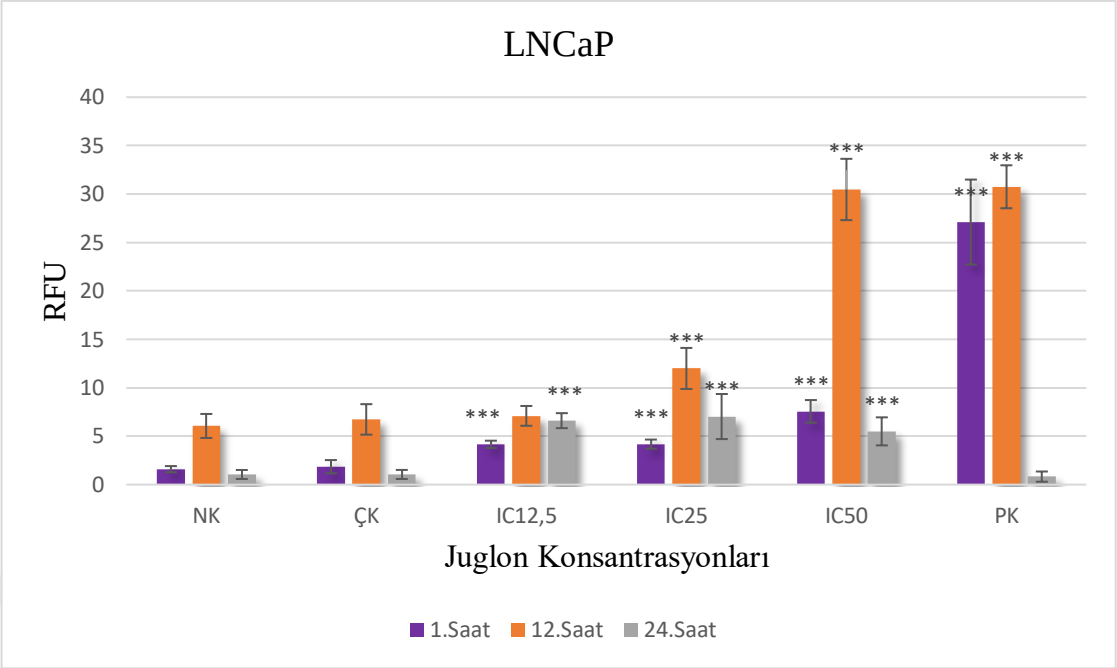
LNCaP hücre hattının juglon ve 5-FU'nun çeşitli konsantrasyonlarıyla ayrı ayrı ve kombine olarak 24 saat süreyle muamele edildikten sonra 1. saat, 12. saat ve 24. saatte yapılan ölçümlerle elde edilen hücre içi ROS değerleri belirlenmiştir.

- LNCaP hücre hattında juglon için elde edilen hücre içi ROS seviyeleri:

LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 1. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 4,15 ± 0,38, 4,17 ± 0,47 ve 7,56 ± 1,16 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,59 ± 0,32, 1,85 ± 0,68 ve 27,11 ± 4,38 olarak belirlenmiştir. Juglonun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 12. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 7,09 ± 1,02, 11,99 ± 2,11 ve 30,47 ± 3,16 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 6,05 ± 1,23, 6,73 ± 1,57 ve 30,75 ± 2,21 olarak belirlenmiştir. Juglonun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 24. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 6,60 ± 0,77, 7,02 ± 2,32 ve 5,49 ± 1,44 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,04 ± 0,46, 1,05 ± 0,46 ve 0,82 ± 0,52 olarak belirlenmiştir. Juglonun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



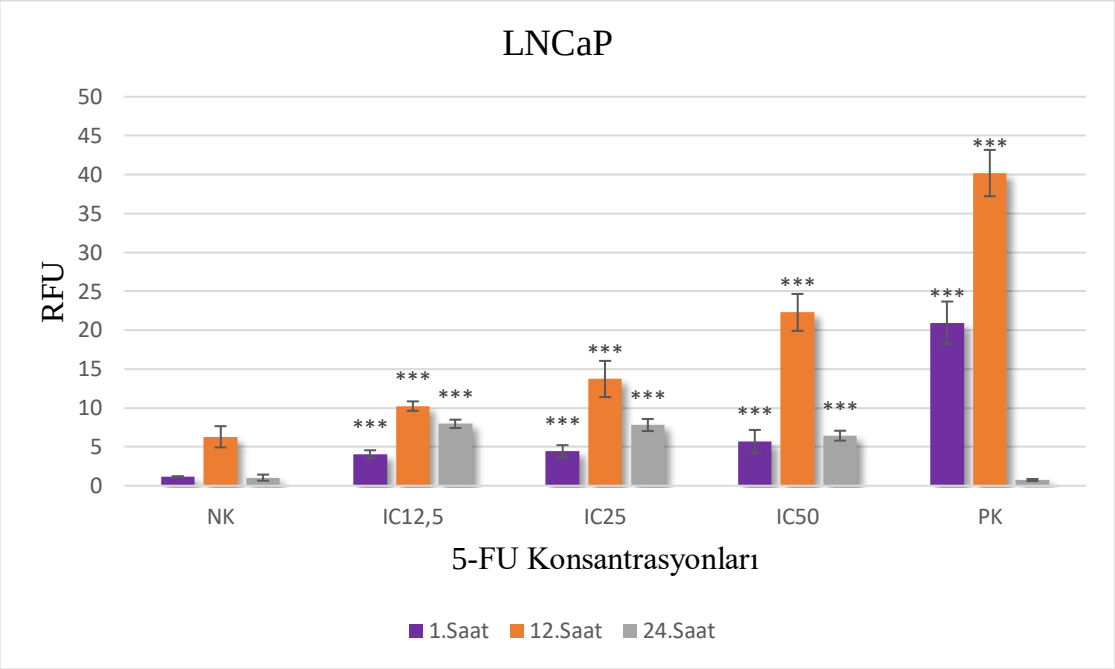
Şekil 4. 22. LNCaP hücre hattında juglonun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında 5-FU için elde edilen hücre içi ROS seviyeleri:

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 1. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 4,04 ± 0,51, 4,41 ± 0,79 ve 5,70 ± 1,46 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,17 ± 0,02, 20,94 ± 2,72 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.23'de gösterilmiştir.

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 12. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 10,23 ± 0,60, 13,71 ± 2,32 ve 22,27 ± 2,37 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 6,29 ± 1,36 ve 40,18 ± 2,97 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.23'de gösterilmiştir.

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 24. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 7,95 ± 0,53, 7,80 ± 0,77 ve 6,43 ± 0,63 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,03 ± 0,39 ve 0,73 ± 0,13 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



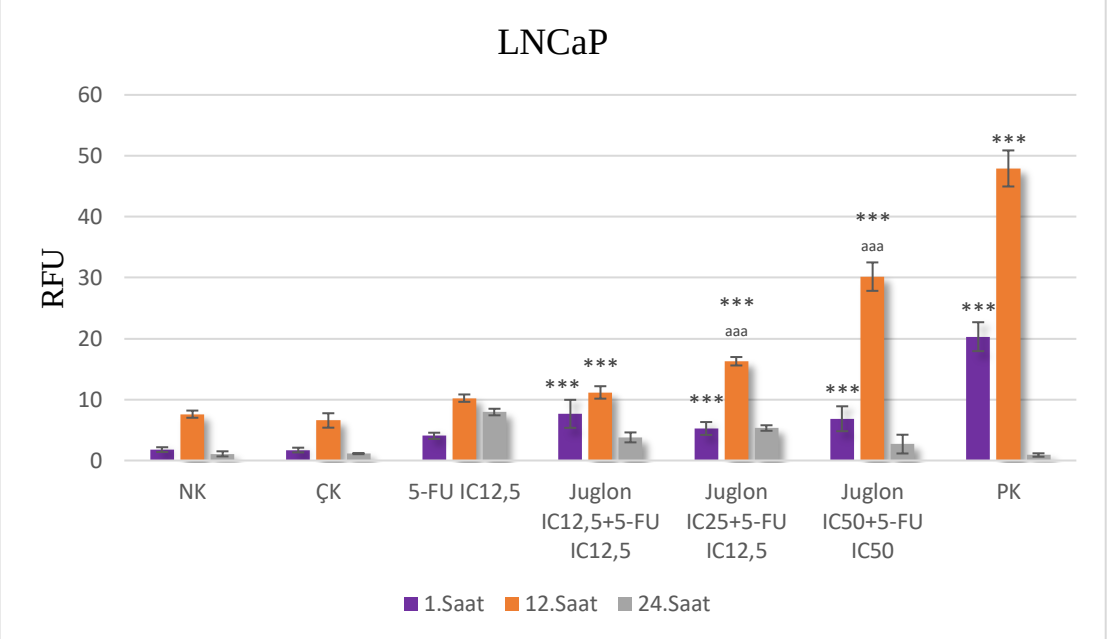
Şekil 4. 23. LNCaP hücre hattında 5-FU'nun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonu ile elde edilen hücre içi ROS seviyeleri:

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamelesi sonucunda 1. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 7,65 ± 2,29, 5,25 ± 1,05 ve 6,85 ± 2,04 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,78 ± 0,38, 1,71 ± 0,38 ve 20,32 ± 2,37 olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamelesi sonucunda 12. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 11,17 ± 1,02, 16,28 ± 0,69 ve 30,17 ± 2,33 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 7,60 ± 0,58, 6,57 ± 1,18 ve 47,92 ± 2,95 olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamelesi sonucunda 24. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 3,79 ± 0,81, 5,33 ± 0,45 ve 2,69 ± 1,54 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,09 ± 0,41, 1,13 ± 0,09 ve 0,89 ± 0,27 olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun LNCaP hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 24. LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

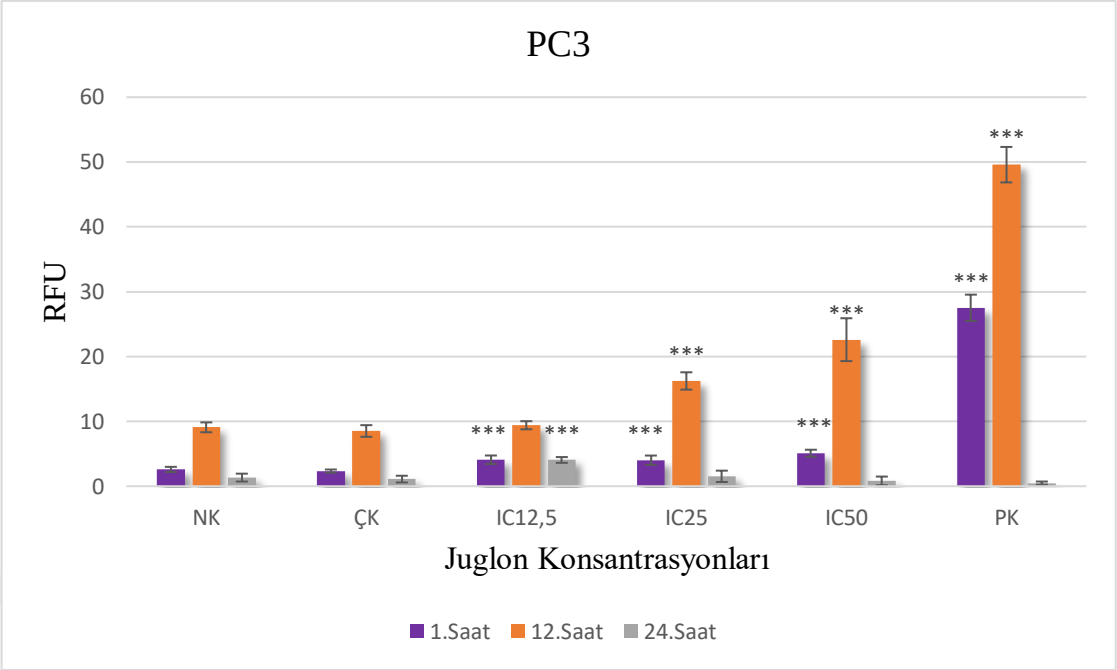
4.3.2. PC3 Hücre Hattı İçin ROS Testi Bulguları

- PC3 hücre hattında juglon için elde edilen hücre içi ROS seviyeleri:

PC3 hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 1. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 4,08 ± 0,65, 4,00 ± 0,72 ve 5,08 ± 0,53 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 2,58 ± 0,39, 2,33 ± 0,24 ve 27,52 ± 2,02 olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

PC3 hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 12. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 9,40 ± 0,62, 16,23 ± 1,33 ve 22,60 ± 3,30 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 9,08 ± 0,76, 8,51 ± 0,89 ve 49,59 ± 2,73 olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

PC3 hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 24. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 4,05 ± 0,44, 1,52 ± 0,87 ve 0,81 ± 0,66 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,32 ± 0,60, 1,09 ± 0,51 ve 0,48 ± 0,23 olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.25'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 25. PC3 hücre hattında juglonun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

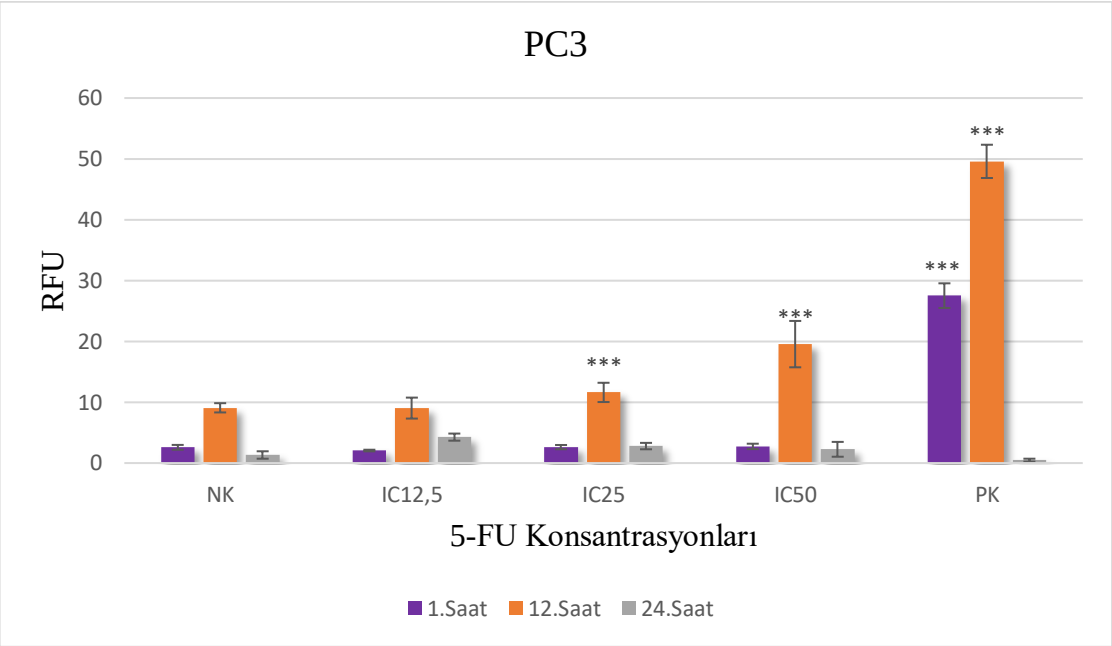
- PC3 hücre hattında 5-FU için elde edilen hücre içi ROS seviyeleri:

PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 1. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 2,05 ± 0,13, 2,62 ± 0,34 ve 2,73 ± 0,44 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 2,58 ± 0,39, 27,52 ± 2,02 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.26'de gösterilmiştir.

PC3 hücre hattının 5-FU $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 12. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 9,03 ± 1,72, 11,61 ± 1,58 ve 19,55 ± 3,81 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 9,08 ± 0,76, 49,59 ± 2,73 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.26'de gösterilmiştir.

PC3 hücre hattının 5-FU $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda 24. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 4,26 ± 0,58, 2,79 ± 0,52 ve 2,26 ± 1,21

olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,32 ± 0,60, 0,48 ± 0,23 olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.26'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 26. PC3 hücre hattında 5-FU'nun hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

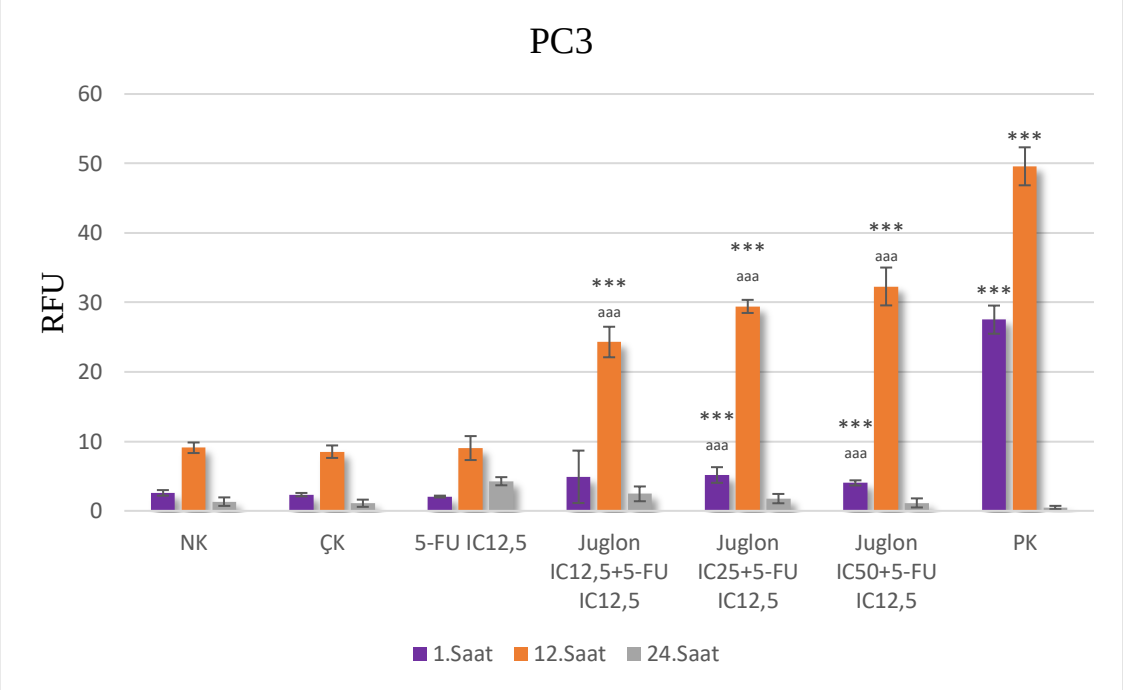
- PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonu ile elde edilen hücre içi ROS seviyeleri:

PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamelesi sonucunda 1. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 4,89 ± 3,77, 5,16 ± 1,12 ve 4,02 ± 0,37 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 2,58 ± 0,39, 2,33 ± 0,24 ve 27,52 ± 2,02 olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.27'de gösterilmiştir.

PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamelesi sonucunda 12. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 24,30 ± 2,19, 29,42 ± 0,94 ve 32,29 ± 2,72 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif

kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 9,08 ± 0,76, 8,51 ± 0,89 ve 49,59 ± 2,73 olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.27'de gösterilmiştir.

PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} değerleri ile muamelesi sonucunda 24. saatte elde edilen hücre içi ROS değerleri sırasıyla 2,44 ± 1,06, 1,76 ± 0,67 ve 1,14 ± 0,65 olarak belirlenmiştir. Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla 1,32 ± 0,60, 1,09 ± 0,51 ve 0,48 ± 0,23 olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU kombinasyonunun PC3 hücre hattına uygulanmasından elde edilen hücre içi ROS seviyeleri Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 27. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve kombinasyon grupları arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5, ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

4.4. Anneksin V Test Bulguları

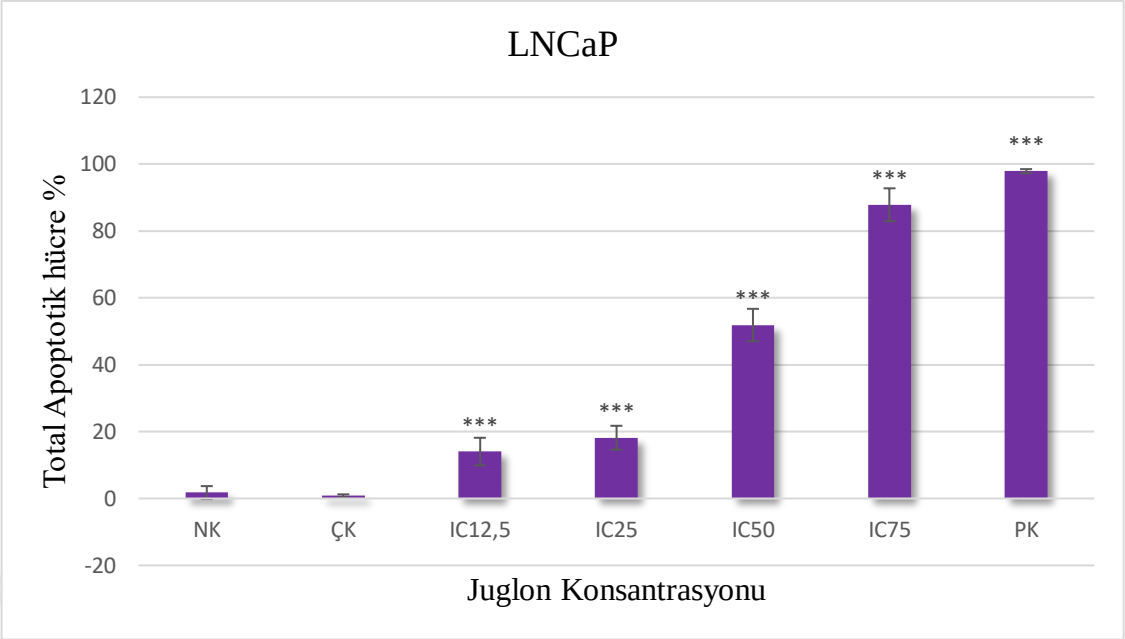
Juglon ve 5-FU'nun LNCaP ve PC3 hücre hatlarına ayrı ayrı ve kombine olarak farklı konsantrasyonlarda 24 saat boyunca muamele edilmesi sonucunda total apoptotik hücre oranı Anneksin V testi ile belirlenmiştir. LNCaP ve PC3' ün juglon ve 5-FU kombinasyonları için 5-FU konsantrasyonları sabit tutulmuş ve juglon artan konsantrasyonlarda muamele edilmiştir.

4.4.1. LNCaP Hücre Hattı İçin Anneksin V Bulguları

- LNCaP hücre hattının juglon ile muamele edilmesinden elde edilen total apoptotik hücre oranları:

LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen total apoptotik hücre oranı sırasıyla %14,03 (erken apoptotik %14,03 geç apoptotik %0), % 18,16(erken apoptotik %16,4, geç apoptotik %1,76), % 51,86 (erken apoptotik %28,73, geç apoptotik % 23,13), %87,83(erken apoptotik %18,56, geç apoptotik %69,26) olarak belirlenmiştir.

Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla %1,76 (erken apoptotik %1,4, geç apoptotik %0,36), % 0,8 (erken apoptotik %0,76, geç apoptotik %0,03) ve %97,86 (erken apoptotik %12,1, geç apoptotik %85,76) olarak belirlenmiştir. Juglonun LNCaP hücre hattına apoptotik etkisi Şekil 4.28'de gösterilmiştir.

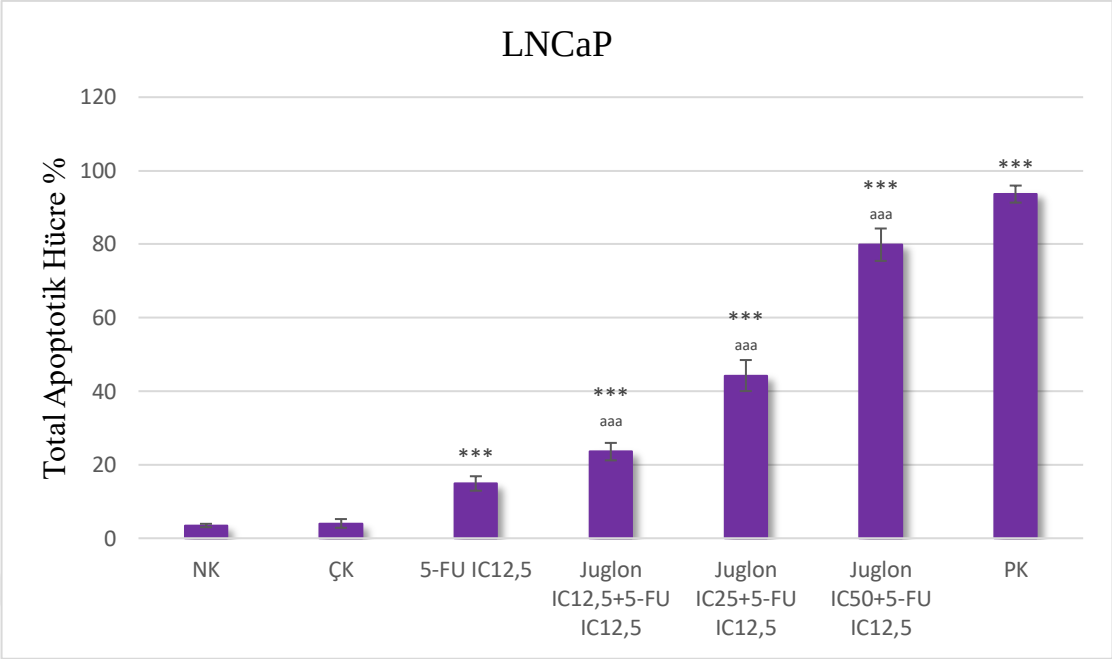


Şekil 4. 28. LNCaP hücre hattında juglonun apoptotik etkisi (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- LNCaP hücre hattının juglon ve 5- FU kombinasyonu ile muamele edilmesinden elde edilen total apoptotik hücre oranları:

LNCaP hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonları ile kombine olarak muamele edilmesi sonucunda belirlenen total apoptotik hücre oranı sırasıyla %23,56 (erken apoptotik %18,4, geç apoptotik %5,16), %44,26 (erken apoptotik 19,86%, geç apoptotik %24,4) ve % 79,86(erken apoptotik %14,83, geç apoptotik %65,03) olarak belirlenmiştir.

Ayrıca 5-FU'nun tek başına uygulanmasıyla elde edilen total apoptotik oran % 14,9(erken apoptotik %11,53, geç apoptotik %3,36) ve Negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla % 3,46(erken apoptotik %3,13, geç apoptotik %0,33), % 4,03(erken apoptotik %3,6, geç apoptotik %0,43) ve %93,63 (erken apoptotik %15,13, geç apoptotik %78,5) olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU'nun LNCaP hücre hattına apoptotik etkisi Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 29. LNCaP hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve tüm gruplar arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

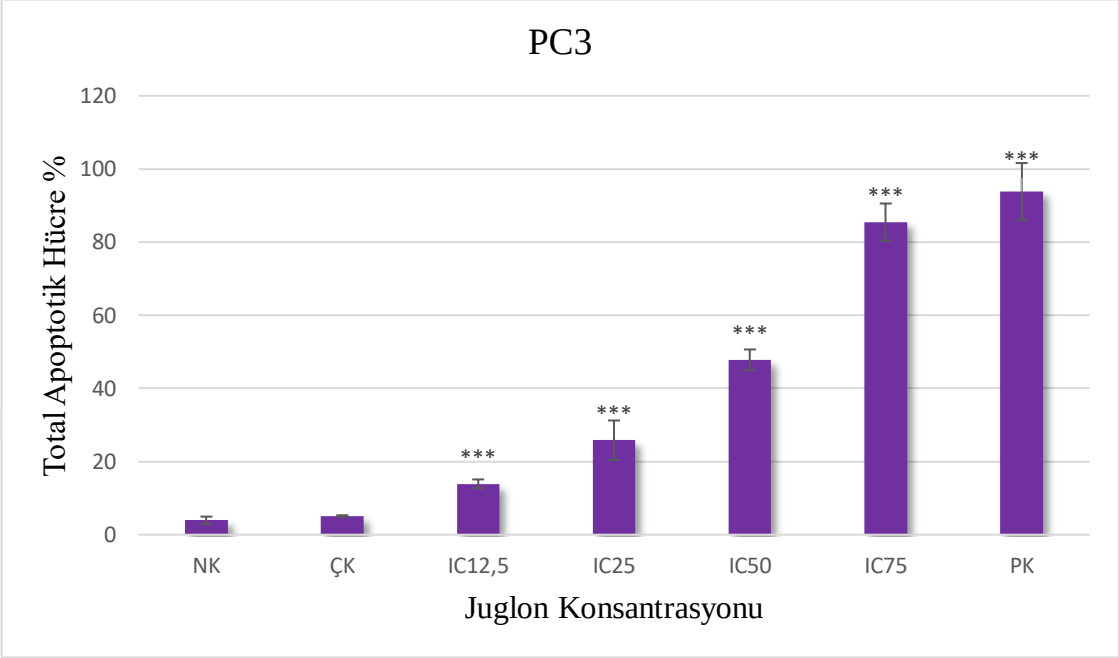
4.4.2. PC3 Hücre Hattı İçin Anneksin V Bulguları

- PC3 hücre hattının juglon ile muamele edilmesinden elde edilen total apoptotik hücre oranları:

PC3 hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen total apoptotik hücre oranı sırasıyla % 13,9(erken apoptotik %11,4, geç apoptotik %2,5), %25,83 (erken apoptotik %18,56, geç apoptotik %7,26) ve %47,8 (erken apoptotik %5,96, geç apoptotik %41,83), %86,46 (erken %15,16, geç %70,3) olarak belirlenmiştir.

Ayrıca negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla %3,93 (erken apoptotik %3,4, geç apoptotik %0,53), %5,1 (erken apoptotik %4,76, geç apoptotik %0,33) ve % 93,86(erken apoptotik %7,8, geç apoptotik %86,06)

olarak belirlenmiştir. Juglonun PC3 hücre hattına apoptotik etkisi Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



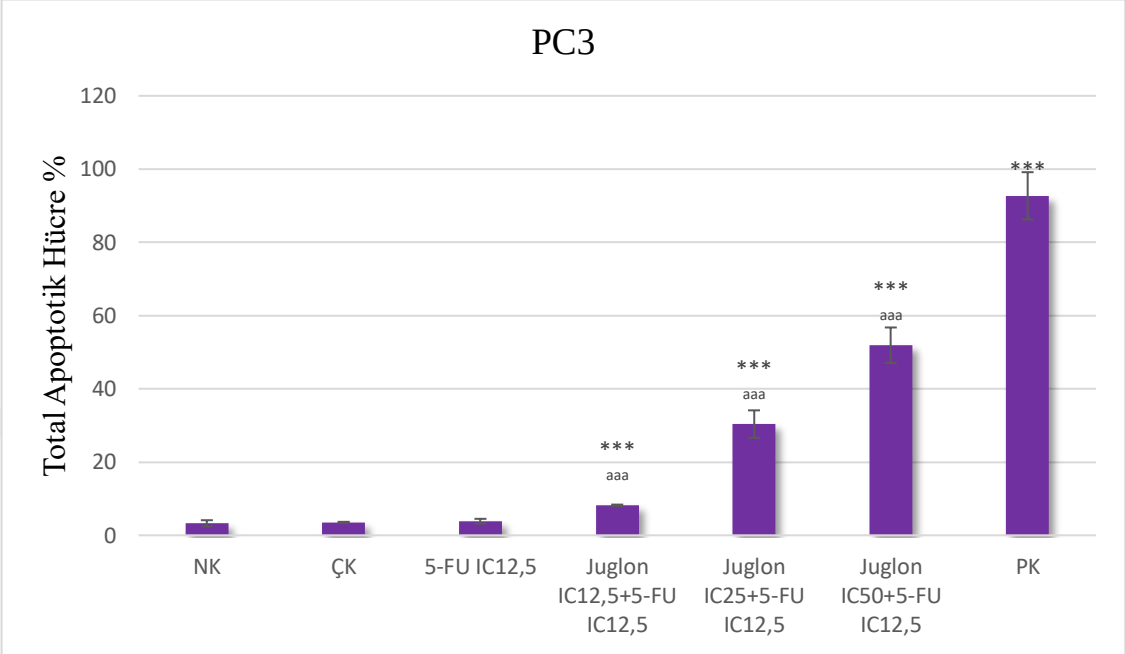
Şekil 4. 30. PC3 hücre hattında juglonun apoptotik etkisi (ortalama ± standart sapma) (NK ve muamele grupları arasındaki fark (***p<0,001)).

- PC3 hücre hattının juglon ve 5-FU ile muamele edilmesinden elde edilen total apoptotik hücre oranları:

PC3 hücre hattının 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonları ile kombine olarak muamele edilmesi sonucunda belirlenen total apoptotik hücre oranı sırasıyla %8,16 (erken apoptotik %7,76, geç apoptotik %0,4), %30,36 (erken apoptotik %28,56, geç apoptotik %1,8) ve %51,9 (erken apoptotik %28,53, geç apoptotik %23,36) olarak belirlenmiştir.

Ayrıca 5-FU'nun tek başına uygulanmasıyla elde edilen total apoptotik oran 3,83% (erken apoptotik %3,7, geç apoptotik %0,13) ve Negatif kontrol (NK), çözücü kontrol (ÇK) ve pozitif kontrol (PK) değerleri sırasıyla % 3,26(erken apoptotik %3,16, geç apoptotik %0,1), % 3,5(erken apoptotik %3,36, geç apoptotik %0,13) ve % 92,7(erken apoptotik

%77,86, geç apoptotik %14,83) olarak belirlenmiştir. Juglon ve 5-FU'nun PC3 hücre hattına apoptotik etkisi Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 31. PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS oluşumu üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) (NK ve tüm gruplar arasındaki fark (***p<0,001), 5-FU IC12,5 ve kombinasyon grupları arasındaki fark (^{aaa}p<0,001)).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Prostat kanseri erkek bireylerde en sık görülen kanser türleri arasında yer alır ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Bu oran özellikle gelişmiş ülkelerde sıklıkla tekrar edilen prostat spesifik antijen (PSA) taramaları ve transrektal biyopsi uygulaması ile artış göstermektedir (Humphrey, 2014).

Prostat kanserinde gözlemlenen değişime uğramış androjen reseptör sinyal iletimine hücresel olarak iç ve dış faktörlerin yanı sıra mutasyonlar ve kromozal anormalliklerinde neden olduğu bilinmektedir. Kanser gelişim sürecinde meydana gelen tüm olayların anlaşılması ve androjen reseptörü sinyal iletimi ile ilişkilendirilmesi, bu konuda alternatif tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Erzurumlu, 2021).

Kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi, cerrahi, hormonal ve moleküler tedaviyi içeren kemoterapi ve immünoterapi yöntemleri her zaman olumlu sonuçlar vermediği için ve kanser hücreleri uygulanan ilaca karşı direnç oluşturarak tedaviye engel olduğu için son dönemlerde yeni yöntem arayışları devam etmektedir (Alkan ve Rakıcıoğlu, 2021, Bannurah ve diğerleri, 2017).

Bazı doğal bileşiklerin kemopreventif ve kemoterapötik etkilerinin anlaşılması üzerine doğal bileşikler sayesinde kanser tedavisi ve immün sistem üzerinde etkili sonuçlar elde edilebileceği anlaşılmış ve bu yöndeki araştırmalara ağırlık verilmiştir (Özkan ve Kaleli, 2020).

Doğal bileşiklerden elde edilen bir grup olan polifenoller bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunan sekonder metabolitleri kapsar. Deney hayvanlarında ve hücre hatlarında yapılan çalışmalar sayesinde polifenollerin çeşitli kanser türleri üzerinde aktif olarak etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bu bileşiklerin yapılan çalışmalar sonucu inflamasyonu ve metastazı engellediği, apoptozu ve sinyal iletim mekanizmalarını indükleyerek antikanser etki gösterdiği belirlenmiştir (Alkan ve Rakıcıoğlı, 2021).

Fenolik bileşiklerden olan ve antikanser etkisi olduğu düşünülen *Pistacia vera* (urfa fıstığı) bitkisinin reçine, kırmızı kabuk ve meyve sapı gibi kısımlarından elde edilen ekstratların prostat (DU-145, PC3) ve meme kanseri (MCF7, MDA-MB 213) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Ayrıca *P. lentiscus* bitkisinin prostat ve kolon kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Koyuncu, 2018).

Ferulik asit ve kafeik asidin araştırıldığı bir çalışmada ferulik asidin prostat kanserinde onkogen ekspresyonunu inhibe ettiği ve proliferasyonu engellediği, kafeik asidin ise NF-kappa B'yi baskıladığı gözlenmiştir (Russo ve diğerleri, 2017).

Dialil disülfit ve dialil trisülfit olarak bilinen sarımsağın etken maddesinin prostat kanserinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bu doğal bileşiğin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda artan dozlarda hücre içi ROS seviyelerini artıran ve hücre içi Ca^{+} seviyelerini artırarak apoptozu indükleyen bu doğal bileşiğin kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre daha aktif olduğu ifade edilmiştir. Doğal bileşiklerle yapılan çok sayıda çalışmanın ışığında bu bileşikler arasından kanser hücrelerini hedef alan ve sağlıklı hücreler üzerinde belirgin bir toksisite göstermeyen çeşitler son dönemlerde dikkat çekmektedir (Güler, Hira, Kaleli ve Koçyiğit, 2020).

Ayrıca kinon türevlerinden biri olan timokinon ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların etkinliğinin bu doğal bileşik sayesinde artırılabildiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara ilaveten farelerle yapılan *in vivo* çalışma ile timokinon ve kemoterapötik bir ajanın kombinasyon tedavisinde tek ilaçla yapılan tedaviye karşılık anlamlı bir fark elde edilmiştir. Pankreas kanseri ile yapılan bu çalışmadan elde edilen tümör hücrelerindeki proliferasyon azalışı ile farklı kanser türleri içinde kombine tedavilerin uygulanabileceği ve ileri çalışmaların yapılabileceği düşünülmektedir (Banerjee ve diğerleri, 2009).

Bir naftakinon türevi olan juglonun metanolik ekstratının PC3 ve DU145 prostat kanser hücreleri üzerine etkisinin gözlemlendiği bir çalışmada, ilk 24 saatte MTT testi ile anlamlı bir fark elde edilmemiştir, fakat 24 saatten sonra kanser hücrelerindeki sağ kalımın

sağlıklı epitel hücrelerine göre büyük oranda azaldığı belirlenmiştir. Bu durumda hücrelerle muamele edilen sürenin juglonun aktivasyonunda rol oynadığı ileri sürülmektedir (Mahdavi, Azadbakht, Vahdati, Shokrzadeh ve Farhadi, 2019).
Juglonun farklı konsantrasyonlarda MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile 24 saatlik muamelesi sonucunda meme kanserinde hedef alınan mt-ATP6 gen ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada juglonun farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 ve MCF7 hücre hatlarında migrasyonu ve invazyonu inhibe ettiği belirtilmiştir (Aydemir, 2019).

Juglonun yapısal analoğu olan plumbaginin pankreas kanseri üzerindeki antimetastatik etkisinin *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterildiği çalışmalarda stat-3 ve EGFR etkili sinyal yolaklarını inhibe ettiği ortaya koyulmuştur (Hafeez, Jamal, Fischer, Mustafa ve Verma, 2012).

SGC-7901 mide kanseri hücre hattı üzerinde juglonun sitotoksik etkisinin SRB testi ile incelendiği bir çalışmada farklı konsantrasyonların 24 saat boyunca muamelesi sonucunda IC_{50} değeri 36.51 ± 1.05 µM olarak bulunmuştur. Ayrıca juglonun bu süre içinde hücre içi ROS oluşumunu artırdığı ve Bcl-2 aktivitesini düşürerek apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir (Ji, Qu ve Zou, 2011).

Kanser türlerinin tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların etkisi kısa süreli olabildiği gibi aynı zamanda normal hücreler üzerinde toksik etki gösterme potansiyelinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu anlamda tedavi sürecini olumsuz etkileyen durumları ortadan kaldırmak için doğal bileşiklerle kombine tedavilere olan yönelim artış göstermektedir. Bu kombinasyonların amacı kemoterapi sürecini etkin bir hale getirmenin dışında normal dokularda oluşabilen toksisitenin azaltılması hedeflenmektedir (Ağca, Kırıcı, Can ve Yumak, 2019).

Mevcut tez çalışmasında juglon ve 5-FU kombinasyonunun prostat kanser hücrelerinde apoptozu ROS artışı ve genetik hasar oluşumu ile arttırma potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aktif metabolitlerinin RNA sentezini inhibe ederek hücre çoğalmasını baskıladığı bilinen 5-FU'nun düşük konsantrasyonu ile juglonun artan konsantrasyonları

kombine edilerek 5-FU'nun tek başına uygulandığı grup ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda çok sayıda kanser türü üzerinde antikanser aktivite gösterdiği düşünülen juglonun LNCaP ve PC3 prostat kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi XTT test yöntemiyle araştırılmıştır. Ayrıca bu doğal bileşik ve antineoplastik bir ilaç olan 5-Florourasil kombine olarak farklı dozlarda uygulanarak LNCaP ve PC3 hücre hatları üzerindeki sitotoksik, genotoksik, apoptotik etkileri belirlenmiştir. Literatürde bu konuda yeterli sayıda çalışma bulunmadığından dolayı özgün değer taşıyan bu çalışmanın ileri araştırmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

XTT test sonuçlarına göre juglonun LNCaP hücre hattına 24 saatlik muamelesi ile IC_{50} değeri 57,621 ± 4,859 µM olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun 24 saat boyunca LNCaP hücre hattı ile muamelesi ile IC_{50} değeri hesaplanamadığından dolayı bu süre artırılarak 48 saate çıkarılmıştır. 5-FU'nun LNCaP hücre hattı üzerindeki IC_{50} değeri 218,863 ± 11,641 µM olarak belirlenmiştir.

Akciğer kanseri (A549) hücre hattında yapılan bir çalışmada 48 saat muamele sonrasında 5-Fluorourasil'in IC_{50} değeri 75 µM olarak belirlenmiştir. Kemoterapötik bir ajan olan trastuzumab ve 5-FU kombinasyonunun uygulandığı bu çalışmada 24 saat sonrasında hücre göçünün ve çoğalmasının engellendiği gözlenmiştir (Korkut, 2018).

Çalışmamızda 5-FU'nun normal hücreler üzerindeki olası toksik etkisini en düşük seviyeye indirmek ve aynı zamanda kanser hücrelerinde direnç oluşumuna engel olmak için yapılan kombine tedavide 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutulmuş ve juglon artan dozlarda uygulanmıştır. Bu kombinasyonun LNCaP hücre hattında canlılık üzerine etkisi XTT testi ile belirlenmiştir. 5-FU'nun $IC_{12,5}$ dozunun juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} değerleri ile kombinasyonu sonucunda canlılık oranları sırasıyla %67,26 %44,15 ve %5,45 olarak belirlenmiştir. 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonunun tek başına uygulandığı grupta canlılık oranının %72,13 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu ile juglon IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarının kombinasyon grupları

arasında ki canlılık düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalış olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

Juglonun kemoterapötik bir ajan olan 5-FU'nun etkinliğini artırdığı saptanan bu kombinasyon PC3 hücrelerine de uygulanmıştır. Juglon ve 5- FU'nun ayrı ayrı PC3 hücre hattında ayrı ayrı sitotoksik etkisini incelemek için XTT testi kullanılmıştır. Juglonun PC3 hücre hattı ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda IC_{50} değeri 59,271 ± 4,107 µM olarak hesaplanmıştır. LNCaP hücre hattında olduğu gibi 5- FU'nun PC3 hücre hattına 24 saat boyunca muamele edilmesi ile bir IC_{50} değeri hesaplanamamış ve bu süre 48 saate uzatılmıştır. Bu süre literatürde yer alan farklı çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

PC3 hücre hattında 5-FU'nun IC_{50} değeri 302,748 ± 4,842 µM olarak bulunmuştur. PC3 hücre hattında, 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile muamele edildiği kombine gruplarda canlılık değerleri sırasıyla %100,05, %95,15 ve %64,36 olarak belirlenmiştir. Ayrıca 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonunun tek başına uygulandığı grupta canlılık oranının %80,85 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu ile juglon IC_{50} konsantrasyonunun kombinasyon grubu arasında ki canlılık düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır (p<0,001).

Juglonun genotoksik etki oluşturma potansiyelinin tahmin edildiği bir çalışmada melanom hücreleri üzerindeki genotoksik etki mikronükleus testi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile juglonun melanom hücrelerinde sitokinezi bloke ederek proliferasyonun inhibisyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir (Aithal, Kumar, Rao, Udupa ve Rao, 2009).

Bu çalışmada juglon ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombine olarak genotoksik etkilerinin belirlenmesinde alkali komet testi kullanılmıştır. Bu test ile çalışmadaki hücre hatları juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Ayrıca 5-FU'nun genotoksik etkilerinin ortaya konulduğu bu çalışmada hücre hatları bu ilacın $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Sonrasında 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile

muamele edildiği kombine gruplardaki kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti gibi parametreler değerlendirilmiştir.

LNCaP hücre hattında juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarının kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti değerlerini artan dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırdığı saptanmıştır (p<0,001). LNCaP hücre hattında 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarının kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momenti değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı fakat kuyruk % DNA seviyesinde bir fark oluştuğu görülmüştür. Kontrol grubuna göre belirgin bir fark oluşturmayan kuyruk uzunluğu bulgularının yanı sıra kuyruk %DNA miktarındaki artış düşük düzeyde de olsa 5-FU'nun genetik hasara yol açtığını düşündürmektedir.

Juglon ve 5-FU kombinasyonlarının LNCaP hücre hattında kuyruk uzunluğu üzerine etkilerinin komet testiyle araştırılması için hücreler 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda kombinasyon gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılmasında artan dozlarda kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA ve olive kuyruk momenti değerlerinde anlamlı bir artış belirlenmiştir. Ayrıca 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonunun tek başına uygulandığı grup ile kombinasyon grupları kıyaslandığı zaman juglonun IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarının kullanıldığı kombine dozlarda kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA ve olive kuyruk momenti değerlerinde anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

PC3 hücre hattında yapılan komet testinde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarının kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti değerlerini artan dozlarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırdığı belirlenmiştir (p<0,001). 5-FU'nun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarına maruz bırakılan PC3 hücre hattında kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti değerlerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir (p<0,001).

Her iki maddeninde genetik hasar oluşturduğu belirlenen bu hücre hattı 5-FU konsantrasyonu $IC_{12,5}$ olarak sabit olacak şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonları ile kombinasyonuna maruz bırakılmıştır. Yapılan bu kombinasyondan

elde edilen kuyruk uzunluğu, kuyruk %DNA ve olive kuyruk momenti bulguları kontrol grubuyla kıyaslanmış ve anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Aynı parametreler için 5-FU'nun tek başına IC_{12} konsantrasyonunun uygulandığı grup ve kombinasyon grupları karşılaştırılmıştır. Bu kıyaslama ile 5-FU'nun $IC_{12,5}$ ve juglonun IC_{50} konsantrasyonunun kombine edildiği grupla 5-FU $IC_{12,5}$ dozunun tek başına kullanıldığı grup arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır (p<0,001).

Juglonun kanser hücre hatları ile yapılan bazı çalışmalarda reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini belirgin bir şekilde artırarak hücre içi tepkimelerin değişikliğe uğramasına neden olduğu gözlenmiştir. Bu olaylar sonucu apoptozun uyarılmasının nedeninin sitokrom c salınımınından kaynaklanan mitokondriyel zar potansiyel kaybı olduğu tahmin edilmektedir (Avcı, 2015).

Mide, pankreas, melanom, lösemi gibi kanserlerde etkinliği bildirilen juglonun C6 sıçan glioma hücrelerinde yapılan bir çalışmada ROS miktarını artırdığı ve apoptoza bağlı sinyal yolaklarını aktive ettiği bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada tümör hücrelerinde normal hücrelere göre daha fazla ROS üretimi olduğu ve bu durumda doz ve muamele edilen sürenin etkili olduğu bildirilmiştir (Wu ve diğerleri, 2017).

Yapılan literatür çalışmasında juglonun farklı kanser türlerindeki antitümör mekanizmasında hücre içi ROS miktarındaki artışta etkili olduğu gözlenmiştir. Bu doğrultuda prostat kanseri ile yapılan çalışmaların yetersiz olduğu düşünülerek juglon ve 5-FU'nun ayrı ayrı ve kombinasyonları ile ROS oluşumunu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. LNCaP ve PC3 hücre hatlarında ROS oluşumunun belirlenmesi için DCF-DA maddesi kullanılmıştır. Bu test için XTT yöntemi ile belirlenen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlar kullanılarak 1, 12 ve 24 saatlik muamele sonucunda oluşan ROS miktarları ölçülmüştür.

Juglon LNCaP hücre hattına $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarda 1 ve 12 saat boyunca muamele edilmesiyle ayrı ayrı yapılan ölçümlerle ROS miktarında artan dozlarda kontrol grubuna göre bir artış olduğu belirlenmiştir (p<0,001). Aynı konsantrasyonların hücrelerle 24 saat boyunca muamele edilmesiyle hücre ölümünün artması nedeniyle

ortamdaki ROS miktarında bir düşüş gözlenmiştir. 5-FU'nun aynı süre ve konsantrasyonlarda LNCaP hücre hattına uygulanması ile yapılan ölçümlerde kontrol grubuna kıyasla artan dozlarda bir ROS artışı olduğu saptanmıştır.

Juglon ve 5-FU'nun kombinasyonlarının ROS oluşumu üzerine etkilerinin araştırılması için 5-FU'nun $IC_{12,5}$ konsantrasyonu sabit tutularak juglon $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarda 1, 12 ve 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Kombinasyon gruplarından elde edilen ROS seviyeleri kontrol grubuna göre kıyaslandığı zaman 1 ve 12. saatlerde doza ve muamele süresine bağlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir. 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonu ile kombinasyon gruplarının karşılaştırılması ile 5-FU $IC_{12,5}$ ile juglon IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarında istatistiki olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (p<0,001). 24. saatte yapılan ölçümde maruziyet süresinin uzamasına ve ortam koşullarına bağlı olarak hücre ölümünün arttığı ve ROS miktarının azaldığı belirlenmiştir.

Juglonun PC3 hücre hattına $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarda 1 saat boyunca muamele edilmesiyle yapılan ölçümlerle ROS miktarında tüm dozlarda kontrol grubuna göre bir artış olduğu belirlenmiştir. Aynı dozların 12 saatlik muamele edilmesi sonucunda IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarında ROS seviyesinde anlamlı bir artış saptanmıştır (p<0,001). 24 saatlik muamelede hücre ölümünün artışından dolayı ROS düzeylerinde azalma olduğu tahmin edilmektedir.

5-FU'nun aynı konsantrasyonlarda ve sürelerde hücrelerle muamele edilmesi ile yapılan ölçümlerde 1. saatin sonunda kontrol grubuna göre tüm gruplardaki ROS miktarında anlamlı bir artış gözlenmemiştir (p>0,05). 12 saatlik muamele sonrasında 5-FU IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (p<0,001). 24 saatlik muamele sonrasında hücre ölümünün ortam koşullarına bağlı olarak artması ile ROS miktarında bir azalma olduğu düşünülmektedir.

PC3 hücre hattında juglon ve 5-FU kombinasyonu ile elde edilen hücre içi ROS seviyelerini belirlemek için 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonu, juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile bir arada uygulanmıştır. 1, 12 ve 24 saatlik muamele sonrasında yapılan ölçümlerde kontrol gurubuna kıyasla 1. saatteki ROS seviyelerinde 5-FU'nun

$IC_{12,5}$ değeri ile juglonun IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarının kombine edildiği gruplarda bir artış belirlenmiştir.

12 saatlik muamele sonrasında kontrol grubu ile yapılan kıyaslamada 5-FU'nun $IC_{12,5}$ değerinin juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile kombine edildiği gruplardaki ROS miktarlarında anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (p<0,001). 24 saat sonrasında yapılan ölçümlerde tüm gruplarda hücre ölümünden kaynaklanan ROS miktarında bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Kombinasyon gruplarından elde edilen ölçümlerin 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonunun tek başına uygulandığı grupla kıyaslanmasıyla 1. saatte juglon IC_{25} ve IC_{50} ile yapılan kombinasyon gruplarında, 12. saatte ise juglon $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonları ile yapılan kombinasyon gruplarındaki ROS miktarında anlamlı bir artış olduğu ortaya konulmuştur (p>0,001). 24 saatlik muamele sonrasında artan hücre ölümü nedeniyle ROS seviyelerinde bir düşme olduğu belirlenmiştir.

İki hücre hattında da hücre içi ROS seviyelerinin ölçüldüğü tüm gruplara genel olarak bakıldığında 12 saatlik muamele gruplarında bir artış olduğu saptanmıştır. Juglonun farklı kanser hücrelerinde ROS miktarının artırarak sitotoksik ve genotoksik hasara neden olduğu bilinmektedir.

Çalışmamızda prostat kanseri ile yapılan bu test literatürdeki bulgulara katkı sağlayacak niteliktedir. Ayrıca kemoterapötik bir ajan olan 5-FU'nun düşük konsantrasyonuyla kombine edilen juglonun zaman ve konsantrasyona bağlı olarak ilacın antikanser etkinliğini arttığı belirlenmiştir. Doğal bir bileşik olan juglonun LS-174T kolon kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada konsantrasyon ve muamele edildiği süreye bağlı olarak kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonunu artırdığı ve Bcl-2'yi baskıladığı belirtilmektedir (Li, Zhao, Sun, Jiang ve Gong, 2013).

Juglonun reaktif oksijen türlerini artırması ve sinyal yolakları üzerinde etkinlik göstermesi ile kanser tedavisinde etkili olabileceğini ileri süren bazı çalışmalar mevcuttur.

Kanser tedavisinde p53 aktivasyonu, tümör reseptörleri veya mitokondriyel yolla apoptozun indüklenmesi hedeflenerek kanser hücre proliferasyonun baskılanması sağlanır. Bu amaçla uygulanan kemoterapi ajanlarıyla DNA sentezi ve hücre bölünmesi baskılanmaktadır. Kemoterapi sonrasında tümör hücrelerinin ilaca karşı direnç oluşturması ile başlayan duyarsızlık bu tedaviyi olumsuz etkileyen durumlardan biridir. Bu durumu ortadan kaldırmak için çeşitli faktörlerle kanser hücrelerinde apoptozu hızlandırmanın doğru olacağı düşünülmektedir (Kaya, Çalışkan ve Yönden, 2012).

Çalışmamızda kemoterapik ajanların uygulanmasından kaynaklanan yan etki ve direnç oluşumunu azaltmak için LNCaP ve PC3 hatları naftakinon grubundan olan juglonun 5-Florourasil ile farklı konsantrasyonlarda kombinasyonlarına maruz bırakılmıştır. Maddelerin tek başına ve kombine bir şekilde prostat kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkinin belirlenmesi için Muse Annexin V & Dead Cell Assay (Millipore, Almanya) kullanılmıştır.

LNCaP hücre hattının juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen total apoptotik hücre oranlarının doz artışına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlenmiştir. Aynı hücre hattı 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonu ile kombine bir şekilde juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Bu kombinasyondan elde edilen apoptotik hücre oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonunun tek başına uygulandığı grup ile kombinasyon gruplarının kıyaslanmasıyla istatistiki olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır (p<0,001).

Juglonun ve 5-FU ile kombinasyonunun PC3 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisini ortaya koymak için yapılan analizlerde hücreler öncelikle, juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Yapılan ölçümlerle elde edilen verilerin kontrol grubuyla karşılaştırılmasında juglonun doz artışına bağlı olarak apoptotik bir etki gösterdiği belirlenmiştir.

İki maddenin kombinasyonlarının PC3 hücre hattı üzerindeki apoptotik potansiyelini belirlemek için yapılan deneyde 5-FU $IC_{12,5}$ konsantrasyonu ile juglonun $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonları bir arada uygulanmıştır. Bu analiz sonucunda kontrol grubuna göre tüm kombinasyon gruplarında anlamlı bir artış saptanmıştır (p<0,001). PC3 hücre hattına 5-$FU_{12,5}$ konsantrasyonunun tek başına uygulandığı grup ile kombinasyon gruplarının kıyaslanmasıyla juglonun artan dozlarına bağlı olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

Sonuç olarak bu çalışmada fenolik bir bileşik olan juglonun (5-Hydroxy-1,4-naftakinon), prostat kanseri üzerindeki antikanser potansiyelinin belirlenmesi için hücre hatlarına tek başına ve ilk kez kemoterapötik bir ajan olan 5-Florourasil ile kombine bir şekilde uygulanmıştır. Literatürde juglon ve 5-FU kombinasyonunun metastatik prostat kanseri üzerindeki etkilerini belirleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır ve prostat kanserinde yapılan bu *in vitro* kombinasyon çalışma ilk olması açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada LNCaP (prostat kanseri lenf metastazı) ve PC3 (prostat kanseri kemik metastazı) hücre hatlarına juglon ve 5-FU'nun ayrı ayrı uygulanmasıyla sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca ROS oluşumunu artırma ve apoptotik etkilerinin olduğu da saptanan bu iki maddeden kemoterapi ajanı olarak kullanılan 5-FU'nun düşük dozları ile kombine bir şekilde uygulanan juglonun prostat kanseri üzerinde ilacın etkinliğini artırıcı bir potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Bir *in vitro* kombinasyon terapi modeli oluşturulan bu çalışmada juglonun metastatik prostat kanseri üzerinde 5-FU'nun apoptotik etkisini artırarak ve hızlandırarak olası yan etkileri azaltmak için yüksek potansiyele sahip olduğu gösterilmiş olup daha sonra ki çalışmalar için bir temel oluşturulmuştur.

Prostat kanseri üzerinde yapılan bu *in vitro* kombinasyon çalışması ilk kez araştırılmış olmasından dolayı özgün bir değer taşımaktadır. İlerleyen çalışmalarda bu kombinasyonun sinyal yolakları ve gen ekspresyonları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi bu etkinliğin daha kapsamlı bir şekilde araştırılması bakımından önemli olacaktır.

Antikanser ilaç geliştirmede bir kaynak olabileceği düşünülen juglonun son dönemlerde sıkça araştırılan kanser tedavisinde kombinasyon uygulamaları için yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ağca, C. A., Kırıcı, M., Can, A. Y., Yumak. (2019). 5-Florouracil Ve Resveratrol Kombinasyonunun İnsan Akciğer Kanseri A549 Hücre Hattında Apoptozis Üzerine Etkisi. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 21(3), 359-368. doi: 10.24938/kutfd.465470

Ahmad, T., Suzuki, Y. J. (2019). Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. *Antioxidants*, 8(91), 1-13. doi:10.3390/antiox8040091.

Aithal, B. K., Kumar, M. R. S., Rao, B. N., Udupa, N., Rao, B. S. S. (2009). Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biology International*, 33(10), 1039-1049. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2009.06.018

Aithal, K. B., Kumar, S., Rao, B. N., Udupa, N., Rao, S. B. S. (2012). Tumor Growth Inhibitory Effect of Juglone and Its Radiation Sensitizing Potential: *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *Integrative Cancer Therapies*, 11(1), 68-80. doi: 10.1177/1534735411403477.

Akar, R. O. (2020). *Naftakinon Türevli Yeni Sentez Bileşiklerin Kanser Hücre Hatları Üzerine Etkisinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Erişim adresi: https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12713/1219?locale-attribute=en

Akdur, R. (1993). Kanser epidemiyolojisi ve kanserden korunma ilkeleri. *Sağlık ve Sosyal Yardım Vakfı Dergisi*, 4.

Aksel, M. (2017). *Prostat Kanseri Hücre Dizininde Fotodinamik Ve Sonodinamik Tedavilerin Etkisi*. (Doktora Tezi). Erişim adresi: http://adudspace.adu.edu.tr:8080/jspui/bitstream/11607/3663/1/tez%20-16.pdf

Alkan, Ş. B., Rakıcıoğlu, N. (2021). Kanserin Önlenmesi ve Tedavisinde Polifenollerin Rolü. *Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2), 372-379.

Altınbaş, M. (2005). *Onkoloji el kitabı*. Ankara: MN Medikal&Nobel.

American Type Culture Collection. (t.y.). ATCC: The Global Bioresource Center. Erişim adresi: https://www.atcc.org/

American Type Culture Collection. (t.y.). LNCaP clone FGC. ATCC: The Global Bioresource Center. Erişim adresi: https://www.atcc.org/products/crl-1740

American Type Culture Collection. (t.y.). PC-3. ATCC: The Global Bioresource Center. Erişim adresi: https://www.atcc.org/products/crl-1435

Anonim (2020). GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data. https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data#.

Anonim. (2017). Prostat Kanseri. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı, https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-turleri/kanser-turleri/prostat-kanseri.html Erişim Tarihi 26.02.2021.

Aras, N., Kadıoğlu, A., Tunç, M. (1989). İlerlemiş prostat kanseri tedavisinde LH-RH analogları ile tedavi. *Türk Üroloji Dergisi,* 15(4), 641-644.

Arı M., Öğüt S., Döğer F.K. (2017). Kanserin Önlenmesinde Antioksidanların Rolü. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 1 (2), 67-74.

Ata, N. (2005). *Kanser hakkında bilmeniz gerekenler*. Ankara: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi.

Avcı, E. (2015). Juglonun Bxpc-3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Sitotoksisitesinin Değerlendirilmesi, İnvazyon Ve Anjiyogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Erişim adresi: http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4274/409338.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Aybek, H., Ağca, C. A., Çiftçi, M. (2020). 5-Fluorourasil (5-FU) ve C60 Nanopartikülünün Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattı Üzerine Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(2), 35-41.

Aydemir, S. (2019). *Mcf-7 Ve Mda-Mb-231 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Juglon Ve Kurkumin Uygulamasının Mt-Atp6 Ve Sitokrom P450 Moleküllerine Etkilerinin İncelenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Erişim adresi: https://acikerisim.erbakan.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12452/6637/saliha%20aydemir.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Babula, P., Adam, V., Kizek, R., Sladky, Z., Havel, L. (2009). Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environmental and Experimental Botany*, 65(2-3), 330-337.

Bai, B., Chen, Q., Jing, R., He, X., Wang, H., Ban, Y., Ye, Q., Xu, W., Zheng, C. (2021). Molecular Basis of Prostate Cancer and Natural Products as Potential Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Frontiers in Pharmacology*. doi: 10.3389/fphar.2021.738235.

Bakar C. (2017). Dünyada ve Türkiye'de kanser epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri*. 2(2), 49-59.

Banerjee, S., Kaseb, A. O., Wang, Z., Kong, D., Mohammad, M., Padhye, S., Sarkar, F. H., Mohammad, R. M. (2009). Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 69(13), 5575-5583. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4235.

Bang Zhang, X., Lin Zou, C., Xia Duan, Yu., Wu, F., Li, G. (2015). Activity guided isolation and modification of juglone from Juglans regia as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(396), 1-8.

Bannurah, S. R. L., Gazdocich, S., Budäus, L., Zaffuto, E., Briganti, A., Abdollah, F., Montorsi, F., Schiffmann, J., Menon, M., Sharita, S. F., Fisch, M., Chun, F., Steuber, T., Huland, H., Graefen, M., Karaiewicz, P. I. (2017). Local Therapy Improves Survival in Metastatic Prostate Cancer. *European Urology*, 72(1), 118-124.

Bassetto, M., Ferla, S., Pertusati, F., Kandil, S., Westwell, A.D., Brancale, A., McGuigan, C. (2016). Design and synthesis of novel bicalutamide and enzalutamide derivatives as antiproliferative agents for the treatment of prostate cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 118, 230-243.

Başaran, A. (2008). Lokalize Prostat Adenokarsinomunda Vegf, E-Cadherin Ve BIM Ekspresyonlarının Prognostik Faktörler İle İlişkisi (Uzmanlık Tezi). Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, İstanbul.

Bayram, D., Özgöçmen, M., Armağan, İ., Sevimli, M., Türel, G. Y., Şenol, N. (2019). Investigation of apoptotic effect of juglone on CCL-228-SW 480 colon cancer cell line. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 15(1), 68-74. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_880_17.

Betrouni, N., Iancu, P., Puech, P., Mordon, S., Makni, N. (2012). ProstAtlas: A digital morphologic atlas of the prostate. *European Journal of Radiology*, 81(9), 1969- 1975.

Bitkin, A., Taşçı, A. İ., Sönmezay, E., Sökmen, D., Şimşek, A., Tuğcu, V. (2013). Modern tedavi yöntemleriyle metastatik prostat kanserli hastaların seyri değişti mi?. *Yeni Üroloji Dergisi*, 8(39, 12-18.

Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 13, 135–60.

Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J., Timms, B. (2004). Human Prostate Cancer Risk Factors. *Cancer*, 101(10), 2371–2490.

Brooke, G.N., Parker, M.G., Bevan, C.L. (2008). Mechanisms of androgen receptor activation in advanced prostate cancer: differential co-activator recruitment and gene expression. *Oncogene*, 27, 2941-2959.

Casciato, D.A., Lowitz B. B. (2004). *Klinik onkoloji el kitabı*, Ed.: Manavoğlu O. Ankara: Palme Yayıncılık.

Catanzaro, E., Greco, G., Potenza, L., Calcabrini, C., Fimognari, C. (2018). Natural Products to Fight Cancer: A Focus on Juglans regia. *Toxins*, 10(11), 1- 38.

Cho, H.D., Lee, J. H., Moon, K. D., Park, K. H., Lee, M. K., Seo, K. I. (2018). Auriculasin-induced ros causes prostate cancer cell death via induction of apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 660–669.

Coarfa, H., Floransalı, D., Putluri, N., Ding, Y., Au, J., Dandan, O., Ragheb, A., Frolov, A., Michailidis, G., Lee, M. J., Kadmon, D., Miles, B., Smith, C., Ittmann, M., Rowley, D., Sreekumar, A., Creighton, Ç. J., Ayal, G. (2017). Influence of the neural microenvironment on prostate cancer. *The Prostate*, 78(2), 128-139.

Cooper G.M., Hausman R.E. (2006). *Hücre Moleküler Yaklaşım*. Edt: Sakızlı, M., Kalay, E., Atabey, N. İzmir Tıp Kitabevi.

Cordier, P. Y., Nau, A., Ciccolini, J., Oliver, M., Mercier, C., Lacarelle, B., Peytel, E. (2011). 5-FU-induced neurotoxicity in cancer patients with profound DPD deficiency syndrome: a report of two cases. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68, 823–826.

Çoban Z.D., Güran Ş. (2013). Hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 35, 302-310.

Devereux, T. R., Risinger, J. I., Barrett, J. C. (1999). Mutations and altered expression of the human cancer genes: What they tell us about causes. *IARC Scientific Publications*, 146, 19-42.

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda "Tek Hücre Jel Elektroforez" Yöntemi İle Dna Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2), 77-89.

Donar, G.B. (2021). Türkiye'de Kanser İnsidansı ve Farkındalık Etkinlikleri ile Google Çevrimiçi Arama Hacmi Arasındaki İlişki: Retrospektif Bir Araştırma. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi*, 12(2), 353-360.

Edderkaoui, M., Lugea, A., Hui, H., Eibl, G., Lu, Q. Y., Moro, A., Lu, X., Li, G., Go, V. L., J. Pandol1, S. J. (2013). Ellagic Acid and Embelin Affect Key Cellular Components of Pancreatic Adenocarcinoma, Cancer and Stellate Cells. *Nutrition and Cancer*, 65(8), 1232–1244. doi: 10.1080/01635581.2013.832779.

Erzurumlu, Y. (2021). Prostat Kanseri: Androjen Reseptörü Sinyal Mekanizması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 28(1), 187-198. doi: 10.17343/sdutfd.726163.

Fang, F., Chen, S., Ma, J., Cui, J., Li, Q., Meng, G., Wang, L. (2018). Juglone suppresses epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells via the protein kinase B/glycogen synthase kinase-3β/Snail signaling pathway. *Oncology Letters*, 16(2), 2579-2584. https://doi.org/10.3892/ol.2018.8885.

Fenton, J. J., Weyrich, M. S., Durbin, S., Liu, Y., Bang, H., Melnikow, J. (2018). Prostate-Specific Antigen-Based Screening for Prostate Cancer. *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 319(18), 1914-1931.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136 (5),359-86.

Fila, C., Metz, C., Van Der Sluijs, P. (2008). Juglone inactivates cysteine-rich proteins required for progression through mitosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21714-21724. doi: https://doi.org/10.1074/jbc.M710264200.

Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli M., Domizio, A. D., Limonta, P. (2020). Natural Compounds in Prostate Cancer Prevention and Treatment: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Cells*, 9(460), 1-31. doi:10.3390/cells9020460.

Franz, M.C., Anderle, S., Bürzle, M., Suzuki, Y., Freeman, M. R., Hediger, M.A., Kovacs, G. (2013). Zinc transporters in prostate cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 735-741.

Gajskia, G., Langie, S., Zhanataev, A. (2020). Recent applications of the Comet Assay: A report from the International Comet Assay Workshop 2019. *Toxicology Letters*, 333, 1-3. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.022.

Gann, P. H. (2002). Risk Factors for Prostate Cancer. *Reviews in Urology*, 4(5), 3-10.
Ghosh, S., Hazra, J., Pal, K., Nelson, V. K., Pal, M. (2021). Prostate cancer: Therapeutic prospect with herbal medicine. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 2, 1-20.

Gómez, L. J. V., Medina, A. S., Martínez, E. J. T., González, G. L. P., Bravo, J. M. C. (2018). Polymeric advanced delivery systems for antineoplasic drugs: doxorubicin and 5-fluorouracil. *De Gruyter*, 18(4), 359- 372.

Grolig, J., Wagner, R. (2005). *Naphthoquinones*. Weinheim: Wiley-VCH.

Gupta, A., Behl, T., Panichayupakaranan, P. (2019). A review of phytochemistry and pharmacology profile of *Juglans regia*. *Obesity Medicine*, 16, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.obmed.2019.100142.

Güler, E. M., Hira, H. B., Kaleli, H. N., Koçyiğit, A. (2020). Dialil Disülfit ve Dialil Trisülfit'in İnsan Prostat Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksik, Genotoksik ve Apoptotik Etkileri. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2), 266-277.

Güneş, S., Bağcı, H., Sarıkaya, Ş. (2003). Prostat Kanseri Genetiği. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(3),152-158.

Hacıbekiroğlu, İ., Kodaz, H., Türkmen, E. (2015). İleri evre prostat kanserinde hormon tedavisi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 30(1), 25-33. doi: 10.5505/tjoncol.2015.1088.

Hafeez, B. B., Jamal, M. S., Fischer, J. W., Mustafa, A., Verma, A. K. (2012). Plumbagin, a plant derived natural agent inhibits the growth of pancreatic cancer cells in *in vitro* and *in vivo* via targeting EGFR, Stat3 and NF-κB signaling pathways. *International Journal of Cancer*, 131(9), 2175-2186. Doi: 10.1002/ijc.27478.

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., Sakuragi, N. (2020). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, doi: 10.1155/2014/150845.

Hua Ge, Z., Xue Wang, Z., Li Yu, T., Yang, N., Sun, Y., Lai Hao, C., Xin Sun, L. (2014). Morphine improved the antitumor effects on MCF-7 cells in combination with 5-Fluorouracil. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(3), 299- 305. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.09.006.

Humphrey, P.A. (2014). Cancers of the male reproductive organs. *In: World Cancer Report*, 5(11), 453-463.

Ji, Y. B., Qu, Z. Y., Zou, X. (2011). Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(1-2), 69-78. doi: 10.1016/j.etp.2009.09.010

Joseph, D. B., Turco, A. E., Vezina, C. M., Strand, D. W. (2021). Progenitors in prostate development and disease. *Developmental Biology*, 473, 50-58.

Kamei, H., Koide, T., Kojima, T., Hashimoto, Y., Hasegawa, M. (1998). Inhibition of Cell Growth in Culture by Quinones. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 13(3), 185-188.

Karki, N., Aggarwal, S., Laine, R. A., Greenway, F., Losso, J. N. (2020). Cytotoxicity of juglone and thymoquinone against pancreatic cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 327, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109142.

Kasap M, Pazarbaşı A, Alptekin D. (2010). *Tıbbi Biyoloji ve Genetik*. Adana: Nobel Kitabevi.

Kaya, C., Çalışkan, Y., Yönden, Z. (2012). Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3(11), 26-37.

Keeton, W. T, Gould, J. L. (2003). Büyüme ve kötü huylu gelişme. *Genel Biyoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık.

Kendi, S. (1980). *Prostat ve hastalıkları*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

Korkut, E. (2018). *A549 İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında Trastuzumab Ve 5-Fluorourasil Kombine İlaç Tedavisinin Etkisinin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Erişim adresi: http://acikkaynak.bilecik.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11552/545/10206166.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Koyuncu, İ. (2018). Urfa fıstığından (Pistacia Vera L.) elde edilen çeşitli ekstraktların antikanser özelliklerinin incelenmesi. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 15(2), 72-75.

Kutluk, T, Kars, A. (1992). *Kanser konusunda genel bilgiler*. Ankara: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları.

Küçüksu, M. N., Ruacan, Ş. A. (1978). *Klinik Onkoloji*. Ankara: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları.

Kwan, H. Y., Chao, X., Su, T., Fu, X., Tse, A.K.W., Fong, W.F., Ling Yu, Z. (2017). The anticancer and antiobesity effects of Mediterranean diet. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 57 (1), 82–94.

Lee, C. H. Akin-Olugbade, O. Kirschenbaum, A. (2011). Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology&Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 565-575.

Li, Q., Zhao, X. L., Sun, J., Jiang, S. G. Gong, X. F. (2013). Anti-proliferative and apoptosis-inducing activities of juglone in LS-174T cells. *Bangladesh Journal Of Pharmacology*, 8(1), 61-72.

Loeb, S., Catalona, W. J. (2010). Prostate-specific antigen screening: pro. *Current Opinion in Urology*, 20(3), 185-188. doi: 10.1097/MOU.0b013e3283384047.

Lu, J. J., Wu, G. S., Xu, W. S., Huang, M. Q., Chen, X. P., Wang, Y. T. (2013). Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 456-463.

Mahdavi, M., Azadbakht, M., Vahdati, A., Shokrzadeh, M., Farhadi, A. (2019). Cytotoxic Effects of Juglone and Pterocarya fraxinifolia on Prostate Cancer Cells. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 11(3), 195-204.

Mammadov, E. (2018). *Multiparametrik prostat MRG'nin radikal prostatektomi histopatolojisi ile korelasyonu* (Uzmanlık Tezi). Erişim adresi: http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/4559/Emin%20%20Mammadov%20Tez%200555%20651%2000%2033%20emin_lenko%40yahoo.pdf?sequence=1&isAllowed=n

McCormick F. (1999). Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*. 12, 53-6.

Nadler, R.B., Humphrey, P. A., Smith, D. S., Catalona, W.J., Ratliff, T.L. (1995). Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *The Journal of Urology*, 154(2-1), 407- 413. doi: 10.1097/00005392-199508000-00023.

Nayak, K. A., Pal, D. (2010) Nanotechnology for Targeted Delivery in Cancer Therapeutics. *Seemanta Institute of Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 1-7.

Nelson, W. G., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B. (2003). *Prostate cancer. N. Engl. J. Med*, 349, 366–381.

Noh, S., Choi, E., Hwang C. H., Jung J. H., Kim, S. H., Kim, B. (2019). Dietary Compounds for Targeting Prostate Cancer. *Nutrients*, 11(10), 2401.

Nurbaki, H. (1983). *Kanser*. İstanbul: Yeni Asya Yayıncılık.

Oksidatif Stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(2), 137-150.

Ortiz, L. M. G., Orellana, M. I. R., Ratovitski, E. A. (2017). Natural Compounds As Modulators of Non-apoptotic Cell Death in Cancer Cells. *Current Genomics*, 18(2), 132-155.

Oylar, Ö., Tekin, İ. (2011). Kanserin Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 16(1), 147-154.

Özen, H., Türkeri, L. (2007). *Üroonkoloji*. Cilt 1, Ankara: Üroonkoloji Derneği.

Özkan, A D., Kaleli, S. (2020). Antiinflamatuvar Etkili Doğal Kaynaklı Bileşiklerin Potansiyel Antikanser Etkileri: Deneysel Kanıtların İncelenmesi. *Geleneksel ve Tamamlayıcı Anadolu Tıbbı Dergisi*, 2(1), 6-10.

Parkin, D. M., Whelan, S. L., Ferlay, J., Raymond L., Young, J. (1997). Cancer Incidence in Five Continents. International Agency for Research on Cancer. *IARC Scientific Publications*, 143.

Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., Mucci, L. A. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12), 1-18.

Rubin, M.,A, De Marzo, A.,M. (2004). Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol*,17(3), 380–388.

Russo, G. I., Campisi, D., Di Mauro, M., Regis, F., Reale, G., Marranzano, M., Ragusa, R., Solinas, T., Madonia, M., Cimino, S., Morgia, G. (2017). Dietary Consumption of Phenolic Acids and Prostate Cancer: A Case-Control Study in Sicily, Southern Italy. *Molecules*, 22(12), 2159.

Sabuncuoğlu, S., Özgüneş, H. (2011). Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(2), 137-150.

Satari, A., Amini, S. A., Raeisi, E., Lemoigne, Y., Hiedarian, E. (2019). Synergetic Impact of Combined 5-Fluorouracil and Rutin on Apoptosis in PC3 Cancer Cells through the Modulation of P53 Gene Expression. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(3), 462-469. doi: 10.15171/apb.2019.055.

Sauter, E. R. (2020). Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 13(3).
Schulz W.A. (2007). *Molecular Biology of Human Cancers*. The Netherlands: Springer.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 48, 4827–4833.

Sebastiano, K.M., Mourtzakis, M. (2014). The Role of Dietary Fat throughout the Prostate Cancer Trajectory. *Nutrients*, 6(12), 6095–6109.

Sharon, P. E., Ephrat, L. L. (2003). A Risky Business. *Accessing Breast Cancer Risks, Science*, 302, 574 – 575.

Stetler-Stevenson W.G., Aznavoorian S., Liotta L.A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol*, 9, 541-573.

Story, M.T., Hopp, K.A., Meier, D.A., Begun F.P., Lawson R.K. (1993). Influence of transforming growth factor beta 1 and other growth factors on basic fibroblast growth factor level and proliferation of cultured human prostate-derived fibroblasts. *Prostate*, 22, 183-197.

Şahin, M. O., Canda, A. E., Mungan, M. U., Kırkalı, Z. (2000). 1,25-dihidroksi vitamin D3 ve reseptörlerinin insan kanserlerindeki yeri. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*, 6(1-2), 73-79.

Thalambedu, N., Khan, Y. (2019). Fluorouracil (5-FU)-induced Cardiomyopathy. *Cureus*, 11(7), 1- 7.

Türkeri, L. (2007). Kronik Prostatit, Enflamasyon Ve Prostat Kanseri. *Üroonkoloji Bülteni,* 3, 11-15.

Vermes, I., Haanen, C., Nakken, H. S., Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51.

Visakorpi, T., Hyytinen, E., Kallioniemi, A., Isola, J., Kallioniemi, O.P. (1994). Sensitive detection of chromosome copy number aberrations in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *The American Journal of Pathology*, 145(3), 624–630.

Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the ımmune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6, 24-37.

Walsh, P.C. (1975). Physiologic basis for hormonal theapy in carcinoma of the prostate. *Urologic Clinics of North America*, 2(1), 125-140.

Wang, J., Liu, K., Wang, X. F., Sun, D. J. (2017). Juglone reduces growth and migration of U251 glioblastoma cells and disrupts angiogenesis. *Oncology Reports*, 38(4), 1959-1966. https://doi.org/10.3892/or.2017.5878.

Wang, J., Waxman, J. (2000). Chemotherapy for prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 5(3), 93-96.

Wu, J., Zhang, H., Xu, Y., Zhang, J., Zhu, W., Zhang, Y., Chen, L., Hua, W., Mao, Y. (2017). Juglone induces apoptosis of tumor stem-like cells through ROS-p38 pathway in glioblastoma. *BMC Neurology*, 17(70), 1-7.

Xu, H. L., Yu, X. F., Qu, S. C., Qu, X. R., Jiang, Y. F., Sui, D. Y. (2012). Juglone, from Juglans mandshruica Maxim, inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cell HL-60 through a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 590-596. doi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.002.

Xu, H., Yu, X., Qu, S., Sui, D. (2013). Juglone, isolated from Juglans mandshurica Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(12), 3631-3634. doi: https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.007.

Yıldırım, I. (2019). Kanser Gelişiminde İnflamasyonun Rolü. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi,* 8(1), 121- 140.

Yılmaz B, Sarıkaya D. Prostat Kanseri İnsidansı ve Risk Faktörleri. (2017). *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics*, 10(4), 337-342.

Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*,1(2), 7-15.

Yun Liu, X., Ran Zhang, F., Yan Shang, J., Ying Liu, Y., Fei Lv, X., Ni Yuan, J., Ting Zhang, T., Li, K., Chun Lin, X., Liu, X., Lei, Q., Dong Fu, X., Guo Zhou, J. Jia Liang, S. (2018). Renal inhibition of miR-181a ameliorates 5-fluorouracil-induced mesangial cell apoptosis and nephrotoxicity. *Cell Death & Disease*, 9(6), 1-14.

Zembruski, N. C. L., Stache, V., Haefeli, W. E., Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, 429(1), 79-81.

Zhao, X., Song, X., Zhao, J., Zhu, W., Hou, J., Wang, Y., Zhang, W. (2019). Juglone Inhibits Proliferation of HPV-Positive Cervical Cancer Cells Specifically. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(3), 475-480.