

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK



HATMI ÇİÇEĞİ (*Althaea officinalis* L.)'NİN PROSTAT
KANSERİNDE HÜCRE CANLILIĞI, GÖÇÜ VE APOPTOZ
ÜZERİNE ETKİLERİ

MUSTAFA SAİD ATALAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Ayla SOLMAZ AVCIKURT (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Erdal BALCAN
Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

BALIKESİR, KASIM- 2021

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Hatmi çiçeği (*Althaea officinalis* L.)'nin Prostat Kanserinde Hücre Canlılığı, Göçü ve Apoptoz Üzerine Etkileri**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Mustafa Said Atalay

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından
2021/014 nolu proje ile desteklenmiştir**

ÖZET

**HATMI ÇİÇEĞİ (*Althaea officinalis* L.)'NİN PROSTAT KANSERİNDE HÜCRE
CANLILIĞI, GÖÇÜ VE APOPTOZ ÜZERİNE
ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MUSTAFA SAİD ATALAY
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ DR. AYL A SOLMAZ AVCIKURT)**

BALIKESİR, KASIM - 2021

En sık görülen kanser türlerinden biri olan prostat kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Bitkisel ilaçların kanser aktive edici enzimleri ve hormonları inhibe etmek, DNA onarım mekanizmasını uyarmak ve koruyucu enzimlerin üretimi, hücre döngüsünü durdurma ve bağışıklık sistemini güçlendirme gibi etkileri vardır. *Althaea officinalis* L. Metanol ekstresinin çeşitli çalışmalarda oldukça antioksidan olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, *Althaea officinalis* L. ekstraktlarının insan prostat kanseri hücrelerinin hücre büyümesi, hücre ölümü ve hücre göçü üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Bu çalışmada *Althaea officinalis* L. 'ten elde edilen Metanol ve Etil asetat ekstraktları, hem androjenden bağımsız (PC3) prostat kanseri hücre hattı hemde androjene bağımlı (LNCaP) hücre hatlarına uygulanmıştır. Hücrelerin canlılık ve çoğalma üzerindeki etkisi MTT testi ile gözlemlendi. 24, 48 ve 72 saatlerdeki etkisi belirlendi. Yara iyileşme deneyi ile Metanol ve Etil asetat ekstraktlarının prostat kanseri büyümesinde iki kritik adım olan göç ve istilayı önleme potansiyeline sahip olduğu bulundu. Metanol ve Etil asetat uygulanmış PC3 ve LNCaP hücre hatlarında mRNA seviyesinde Bcl-2, Bcl-xL, Bax ve Bak genlerinin ifadesine Real-time PCR yöntemi ile bakıldı. Mevcut veriler, *Althaea officinalis* L. Metanol ve Etil asetat ekstraktlarının prostat kanserinde hücre canlılığını azalttığı ve ayrıca kontrole kıyasla hücre göçünü azalttığı gösterdi ve proapoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyonunda artış olduğu bulundu. Bu çalışmada elde edilen veriler *Althaea officinalis* L. 'in farklı kanser türleri üzerindeki etkisiyle genişletilebilir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Althaea officinalis* L., Prostat kanseri, Real time, MTT, Apoptozis, Yara iyileşme

Bilim Kodları: 20326, 20610, 92314

Sayfa Sayısı: 78

ABSTRACT

THE EFFECTS OF HATMI FLOWER (*Althaea officinalis* L.) ON CELL VIABILITY, MIGRATION AND APOPTOSIS IN PROSTATE CANCER

MSC THESIS

MUSTAFA SAİD ATALAY

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR AYLA SOLMAZ AVCIKURT)

BALIKESİR, NOVEMBER - 2021

Prostate cancer, one of the most common types of cancer, ranks second in cancer-related deaths in men. Herbal medicines have effects such as inhibiting cancer-activating enzymes and hormones, stimulating the DNA repair mechanism and production of protective enzymes, stopping the cell cycle and strengthening the immune system. *Althaea officinalis* L. Methanol extract has been shown to be highly antioxidant in various studies. This study aims to investigate the effects of *Althaea officinalis* L. extracts on cell growth, cell death and cell migration of human prostate cancer cells. In this study, Methanol and Ethyl acetate extracts from *Althaea officinalis* L. were applied to both androgen-independent (PC3) prostate cancer cell lines and androgen-dependent (LNCaP) cell lines. The effect of cells on viability and proliferation was observed by MTT test. The effect at 24, 48 and 72 hours was determined. Methanol and Ethyl acetate extracts were found to have the potential to inhibit migration and invasion, two critical steps in prostate cancer growth, by wound healing assay. The expression of Bcl-2, Bcl-xL, Bax and Bak genes at mRNA level in PC3 and LNCaP cell lines treated with methanol and ethyl acetate were analyzed by Real-time PCR method. Available data showed that *Althaea officinalis* L. Methanol and Ethyl acetate extracts reduced cell viability in prostate cancer and also reduced cell migration compared to control, and increased expression of proapoptotic and antiapoptotic genes was found. The data obtained in this study can be extended by the effect of *Althaea officinalis* L. on different types of cancer.

KEYWORDS: *Althaea officinalis* L., Prostate cancer, Real time, MTT, Apoptosis, Wound healing

Science Codes: 20326, 20610, 92314

Page Number: 78

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Prostat Bezi	1
1.2 Prostat Kanseri	1
1.2.1 Kanserinin Epidemolojisi.....	2
1.2.2 Prostat Kanserinde Risk Faktörleri	2
1.2.2.1 Yaş.....	4
1.2.2.2 İrk	4
1.2.2.3 Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler.....	5
1.2.2.4 Vücut Kitle İndeksi (BMI)	6
1.2.2.5 Fiziksel Aktivite	7
1.2.2.6 Diyet	7
1.2.2.6.1 Kırmızı Et	8
1.2.2.6.2 Sebze ve Meyveler.....	8
1.2.2.6.3 Balık.....	8
1.2.2.6.4 Yeşil Çay.	9
1.2.2.6.5 Tütün ve Alkol.....	9
1.2.3 Prostat Kanserinin Oluşumunda ve ilerlemesinde Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar.....	10
1.2.3.1 Androjen Reseptörü (AR).....	10
1.2.3.1.1 AR ile Spesifik Hücresel Fonksiyonların Düzenlenmesi	11
1.2.3.1.2 AR Mutasyonları ve Prostat Kanserindeki Etkileri	11
1.2.4 Prostat Kanserinde En Sık Rastlanan Genetik Değişiklikler.....	12
1.2.4.1 TGF-B (Dönüştürücü büyüme faktörü B) Yolu	12
1.2.4.2 BCL-2.....	12
1.2.4.3 P53.....	13
1.2.4.4 VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)	13
1.2.4.5 MMP.....	13
1.2.5 Prostat Kanserinde Belirti ve Semptomları	14
1.2.6 Prostat Kanserinin Tanısı	14
1.2.7 Prostat Kanserinin Tedavisi	15
1.3 Apoptosis	17
1.3.1 Ekstresek Yol	17
1.3.2 İnstresek (Mitokondriyal) Yol.....	18
1.3.3 Bcl-2 Ailesi Proteinleri	19
1.4 <i>Althaea officinalis</i> L.....	20
2. MATERYAL VE METOD.....	22

2.1 Materyal	22
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	22
2.2 Metod	25
2.2.1 <i>Althaea officinalis</i> L. Çiçeğinden Ekstrakt Elde Edilmesi	25
2.2.2 Hücre Kültürü.....	27
2.2.3 Prostat Kanseri Hücrelerin -80 °C'den Alınıp Açılması	27
2.2.4 Prostat Kanseri Hücrelerinin Büyütülmesi.....	28
2.2.5 Prostat Kanseri Hücrelerinin Pasajlanması	28
2.2.6 Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Sayılması.....	28
2.2.7 Kansere Hücre Hatlarının Dondurulması.....	29
2.2.8 Poliferasyon Deneyi (MTT Testi).....	29
2.2.9 Yara İyileşme Deneyi.....	30
2.2.10 eviyesinde Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi İçin Hücrelerin Elde Edilmesi30	
2.2.11 RNA İzolasyonu	31
2.2.12 Elde edilen RNA'ların ölçülmesi	31
2.2.13 cDNA Eldesi	32
2.2.14 Gerçek Zamanlı PCR Analizi	32
2.2.15 HPLC Analizi	33
2.2.16 İstatistiksel Analiz	34
3. BULGULAR.....	35
3.1 MTT Sonuçları.....	35
3.1.1 PC3 Hücre Hattının MTT Sonuçları	35
3.1.2 LNCaP Hücre Hattının MTT Sonuçları	37
3.2 Yara İyileşme Deneyi Sonuçları	39
3.2.1 PC3 Hücre Hattının Yara İyileşme Deneyi Sonuçları.....	39
3.2.2 LNCaP Hücre Hattının Yara İyileşme Deneyi Sonuçları.....	41
3.3 Real-Time PCR Sonuçları.....	43
3.3.1 PC3 Hücre Hattının Real-Time PCR Sonuçları	43
3.3.2 LNCaP Hücre Hattının Real-Time PCR Sonuçları	45
3.4 HPLC Analizi Sonuçları	47
3.4.1 <i>Althaea officinalis</i> L. Çiçeğinin Metanol Ekstraktının HPLC Analizi Sonuçları	47
3.4.2 <i>Althaea officinalis</i> L. Çiçeğinin Etil Asetat Ekstraktının HPLC Analizi Sonuçları... 48	
3.5 Bütün Bulguların Özet Şeması.....	49
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
5. KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Prostat ve mesane'nin koronal kesitteki şematik görünümü.....	1
Şekil 1.2: Apoptozun ekstresek yolunun temsili gösterimi.....	18
Şekil 1.3: Apoptozun intrinsek yolunun temsili gösterimi.....	19
Şekil 1.4: Bcl-2 ailesi proteinlerinin şematik gösterimi.....	20
Şekil 1.5: <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeği.....	21
Şekil 2.1: İzlenecek deney tasarımı.....	25
Şekil 2.2: Ekstrakt hazırlama özet şema.....	26
Şekil 2.3: PC3 ve LNCaP hücre hatlarının 100 µm skalada görüntüsü.....	27
Şekil 2.4: Neubauer lamı.....	29
Şekil 3.1: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğin Metanol ekstratının PC3 hücre hattına uygulanmış sitotoksisite değerleridir.....	35
Şekil 3.2: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğin Etil Asetat ekstratının PC3 hücre hattına uygulanmış sitotoksisite değerleridir.....	36
Şekil 3.3: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve Metanol ekstratı LNCaP hücre hattına uygulanmış sitotoksisite değerleridir.....	37
Şekil 3.4: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve Etil Asetat ekstratının LNCaP hücre hattına uygulanmış sitotoksisite değerleridir.....	38
Şekil 3.5: PC3 hücre hattına uygulanan <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin Metanol ve Etil Asetat ekstratının yara iyileşme deneyi görüntüsü.....	39
Şekil 3.6: PC3 hücre hattının Metanol ve Etil Asetat ekstraktların 0, 24 ve 48 saatlerde uygulanan IC ₅₀ değerlerinin yara iyileşme deneyindeki istatistiksel analizidir....	40
Şekil 3.7: LNCaP hücre hattına uygulanan <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin Metanol ve Etil Asetat ekstratının yara iyileşme deneyi görüntüsü.....	41
Şekil 3.8: LNCaP hücre hattının Metanol ve Etil Asetat ekstraktların 0, 24 ve 48 saatlerde uygulanan IC ₅₀ değerlerinin yara iyileşme deneyindeki istatistiksel analizidir....	42
Şekil 3.9: PC3 Prostat kanseri hücre hattının <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin 24 saatte Metanol ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.....	43
Şekil 3.10: PC3 Prostat kanseri hücre hattının <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin 24 saatte Etil Asetat ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.....	44
Şekil 3.11: LNCaP Prostat kanseri hücre hattının <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin 24 saatte Metanol ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.....	45
Şekil 3.12: LNCaP Prostat kanseri hücre hattının <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin 24 saatte Etil Asetat ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.....	46
Şekil 3.13: <i>Althaea officinalis</i> L. bitkisinin Metanol ekstratının HPLC analizi sonucu a) 1 numara vanilik asidi b) 2 numara kafeik asidi c) 3 numara ferulik asidi d) 4 numara quersetini göstermektedir.....	47
Şekil 3.14: <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin Etil asetat ekstratının HPLC analizi sonucu a) 1 numara vanilik asidi b) 2 numara p-kumarik asidi c) 3 numara ferulik asidi d) 4 numara rutin hidratı göstermektedir.....	48
Şekil 3.15: Bütün Bulguların özet şeması.....	49

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Total prostat kanserinin seçilmiş risk faktörlerine ilişkin kanıtların özeti	3
Tablo 1.2: İleri veya ölümcül prostat kanseri için seçilen risk faktörlerinin kanıtlarının özeti.....	3
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihaz listesi	22
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan Kimyasalların listesi	23
Tablo 2.3: cDNA eldesi için PCR koşulları.....	32
Tablo 2.4: Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu koşulları.....	33
Tablo 2.5: Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Bad, H β -2 primerlerinin DNA dizileri	33
Tablo 3.1: <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin Metanol ekstraktının HPLC analizi sonucu tespit edilen moleküllerin gelme zamanı, miktarı ve moleküllerin isimleri.....	47
Tablo 3.2: <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin Etil Asetat ekstraktının HPLC analizi sonucu tespit edilen moleküllerin gelme zamanı, miktarı ve moleküllerin isimleri.....	48

SEMBOL LİSTESİ

A. officinalis L.	: <i>Althaea officinalis</i> L.
A549	: İnsan akciğer kanseri hücre hattı
ADT	: Androjen deprivasyon tedavisi
AK	: Afro-Karayıpler
AKT	: Protein kinaz B
AMJ13	: Meme kanseri hücreleri
ANOVA	: Varyans analizi
AOEE	: <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin etil asetat ekstraktı
AOME	: <i>Althaea officinalis</i> L. çiçeğinin metanol ekstraktı
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
AR	: Androjen Reseptörü
AÜSS	: Alt üriner sistem semptomları
Bad	: Proapoptotik protein
Bak	: Proapoptotik protein
Bax	: Proapoptotik protein
Bcl-2	: B-cell CLL/Lymphoma 2 geni
Bcl-B	: B-cell CLL/Lymphoma B geni
Bcl-W	: B-cell CLL/Lymphoma W geni
Bcl-xL	: B-cell CLL/Lymphoma xL geni
BclA1	: B-cell CLL/Lymphoma A1 geni
BH3	: Etkileşen etki alanı ölüm agonisti
Bid	: Bcl-2 etkileşim alanı
Bik	: Bcl-2 Etkileşimli Katil
Bim	: Bcl-2 benzeri 11
Bmf	: Bcl-2 Değiştirici Faktör
BMI	: Vücut kitle indeksi
Bok	: Bcl-2 ailesi apoptoz düzenleyici bok
BPH-1	: İnsan iyi huylu prostat hiperplazisi hücreleri
BRCA1	: BRCA1 DNA Onarım İlişkili gen
BRCA2	: BRCA2 DNA Onarım İlişkili gen
BV-173	: Lösemik hücreleri
CAPB	: Kokamidopropil betain
CAPRA	: Onaylanmış prostat kanseri risk değerlendirmesi
CD95	: Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü
Cdk	: Siklin bağımlı kinazların
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
COLO 320	: İnsan kolorektal kanser hücresi
DES	: Dietilstilbesterol
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DU-145	: İnsan prostat karsinomu hücre hattı
DUCaP	: Prostatın dura mater kanseri
ECM	: Hücre dışı matris
EGCG	: Epigallocatechin-3-gallat
ELAC2	: ElaC ribonükleaz Z 2
EPHB2	: EPH reseptör B2
ER	: Östrojen reseptör

FADD	: Fas ile ilişkili ölüm alanı
FCS	: Fetal buzağı serum
GLC 4	: İnsan akciğer kanseri hücresi
GLOBOCAN	: Küresel Kanser İnsidansı, Mortalite ve Prevalans
Hep-2B	: İnsan epitel karsinoma hücresi
HIF1-α	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1 Alt Birimi Alfa
HPC1	: Kalıtsal prostat kanseri-1 geni
HPC2	: Kalıtsal prostat kanseri-2 geni
HPC20	: Kalıtsal prostat kanseri-20 geni
HPCX	: Kalıtsal prostat kanseri-X geni
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
Hβ-2	: Human beta 2 geni
IL6	: İnterlökin 6
L701H	: AR ekspresyon vektörü
LAPC-4	: Los Angeles Prostat Kanseri-4
LHRH	: Luteinize edici hormon salgılatıcı hormon
LNCaP	: Androjene duyarlı insan prostat adenokarsinom hücreleri
MCF-7	: İnsan meme kanseri hücre hattı
Mcl-1	: apoptoz düzenleyen gen, Bcl-2 ailesi üyesi
MDA	: Malondialdehid
Met	: Metionin
MMP	: Matris metaloproteinazlar
MOMP	: Mitokondriyal dış zar geçirgenliğini
MTT	: 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromürü
MΦ	: Makrofaj
NFkβ	: Nükleer Faktör kappa B
Noxa	: Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenmiş protein 1
P53	: Tümör proteini P53
pAkt	: AKT serin/treonin kinaz 1
PC12	: Farklılaşmış feokromositoma hücreleri
PC3	: Androjenden bağımsız insan prostat adenokarsinom hücreleri
Pca	: Kişisel bakım yardımı
PCAP	: Prostat kanseri için predispozan
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pEGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
PI3K	: Plazma zarı ile ilişkili lipid kinazlar
Ppi3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PrEC	: Tibet kurbağası hepatit B virüsü
PSA	: Prostat spesifik antijen
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
Puma	: Bcl-2 bağlama bileşeni 3
qPCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asid
RNase	: Ribonükleaz
RNASEL	: Ribonükleaz L
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SCNC	: Küçük hücreli nöroendokrin karsinoma
Smac	: İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü geni
SMAD2	: SMAD aile üyesi 2
Sp1	: Sp1 transkripsiyon faktörü

SSA	: Sub-saharan afrikalı
STAT-3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
SYBR	: Asimetrik siyanin boyası
T877A	: Ad-mtAR
TATA	: Adenin ve timin zengin bölge
TGF-B	: dönüştürücü büyüme faktörü B
TNFR-1	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	: TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı proteini
TRAIL	: Apoptoz indükleyici ligand
UV	: Ultraviyole
Val715	: Melanozomal transmembran proteini
VCaP	: İnsan prostat kanseri hücre hattı
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WPMY-1	: İnsan prostat stromal hücreleri



ÖNSÖZ

Yüksek lisans sürecimin her aşamasında sabrı, çalışma azmi, bilgi birikimi ve maddi manevi her daim desteğini sağlayan sevgili danışmanım Doç. Dr. Ayla SOLMAZ AVCIKURT' hocama,

Tez çalışmamda her türlü desteği sağlan Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü başkanı Prof. Dr. Feray KÖÇKAR hocama,

Özellikle Labaratuvarda zamanıyla, emeğiyle, sabrıyla ve maddi manevi desteğiyle her daim yanımda olan Ayça Derya ÇELİKÇEKEN'e,

Her daim danışabileceğim, her zaman bilgileriyle ve maddi manevi yardımlarıyla yanımda olan Burcu EFE DAŞKAN ve Fatma POYRAZLI hocalarıma,

Desteğini her daim hissettiğim Hatice TOKLU'ya,

Her ne olursa olsun beni her daim seven, şefkatleriyle, sonsuz sevgileriyle her daim yanımda olan, maddi manevi destekleriyle beni hiç bırakmayan sevgili annem Emine ATALAY'a ve babam Şevki ATALAY'a,

Teşekkürlerimi sunuyorum

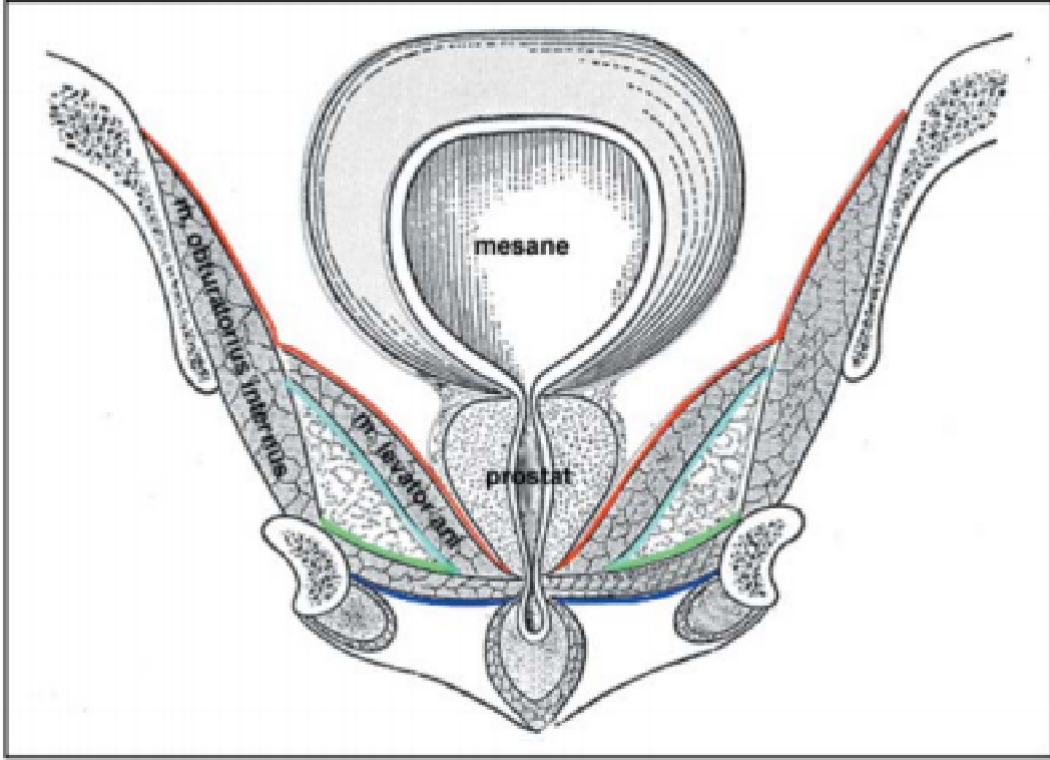
Balıkesir, 2021

Mustafa Said ATALAY

1. GİRİŞ

1.1 Prostat Bezi

Prostat bezi, rektumun önünde ve mesane ile penis arasında bulunan erkek cinsel bezidir (Daniyal ve diğerleri, 2014). Prostat, mesaneden idrar akışı için kanal olan prostatik üretrayı çevreler. Normal prostat yaklaşık 15-20 g ağırlığındadır. Seminal veziküller iki taraflı olarak prostatın tabanında bulunur. İnsan prostatı farklı histolojik bölgelere (periferik, geçiş ve merkezi bölgeler) sahip tek bir bezdir (Ittmann, 2018).



Şekil 1.1: Prostat ve mesane'nin koronal kesitteki şematik görünümü (Gençhellaç ve Yılmaz, 2015)

1.2 Prostat Kanseri

Global olarak 2015 yılında yaklaşık 1,6 milyon vaka ile prostat kanseri erkeklerde en sık teşhis edilen kanserdir. Ayrıca prostat kanseri yılda 366,000 ölüme sebep olmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2015 yılında 220,880 vaka teşhis edilirken 2016 yılında 180.890 yeni vaka teşhis edildiği bildirilmiştir bu da erkeklerde yeni kanser vakalarının %26'sını oluşturuyor. Prostat kanseri özellikle gelişmiş ülkelerde yaygındır. 79 yaşına kadar prostat kanseri tanısı olasılığı, düşük-orta sosyodemografik indekse sahip ülkeler arasında

47'de birdir, buna karşılık sosyodemografik indeksi yüksek olan ülkeler arasında altıda birdir (Rebbeck, 2017).

1.2.1 Kanserinin Epidemolojisi

Prostat kanseri, insidans ve mortalite oranları popülasyona göre önemli ölçüde değişmekle birlikte, dünyanın birçok yerinde erkeklerde önde gelen kanser türüdür. Prostat kanseri görülme oranları, dünyanın gelişmiş bölgelerinde (örneğin, Kuzey Amerika, Batı ve Kuzey Avrupa ve Avustralya), tarama ve erken teşhis de dahil olmak üzere tıbbi bakıma erişimi yüksek olan ülkelerde daha fazla görülmektedir (Rebbeck, 2017).

Prostat kanseri ölümleri Afrika kökenli erkeklerde daha yüksektir. Afro-Karayıplı (AK) ve Sub-Saharan Afrikalı (SSA) erkekler, dünyadaki en yüksek prostat kanseri mortalitesinden muzdariptir. 2012 Küresel Kanser İnsidansı, Mortalite ve Prevalans (GLOBOCAN) verilerine göre 100,000 kişide 18.7-29.3 ölüm oranı popülasyonda görülmektedir. Afrika kökenli Amerikalı erkekler 2008-2011 döneminde her 100.000'de 43 gibi yüksek bir ölüm oranına sahiptir. Bu oranlar, Beyazlar (100.000'de 19.8), Hispanikler (100.000'de 17.8) ve Asya / Pasifik Adalıları (100.000'de 9.4) dahil olmak üzere diğer ABD erkeklerinden önemli ölçüde daha yüksektir. Buna karşılık, Doğu, Güneydoğu ve Güney Orta Asya erkekleri en düşük prostat kanseri ölüm oranlarına sahiptir (100.000'de sırasıyla 2.9, 31 ve 6.7). Kuzey Afrikalı erkeklerin Asyalı erkeklere yakın ve küresel ortalamanın altında ölüm oranları vardır (100.000'de 7) (Rebbeck, 2017).

1.2.2 Prostat Kanseri Risk Faktörleri

Prostat kanseri epidemiyolojik çalışmaları, yaşam tarzı faktörlerinin prostat kanserinin gelişmesine ve bu hastalıktan sağkalım riskini etkilediği çeşitli çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Tablo 1.1 ve 1.2). Bu yaygın hastalığın etiyojisi hakkında birçok soru olmasına rağmen, mevcut risk faktörlerini belirlemek, yüksek risk altındaki bireyleri tanımlamak ve hastalık yükünü azaltmak son derece önemlidir. Prostat kanseri klinik olarak multifaktöriyel bir hastalıktır. Bazı erkekler agresif bir prostat kanseri formuna sahipken, çoğu yavaş büyüyen veya yavaş ilerleyen bir hastalık formuna sahiptir. Bu klinik heterojenlik, bu hastalığın altında yatan etiyojiye de yansır (Jahn, Giovannucci ve Stampfer, 2015). Bu nedenle, prostat kanseri epidemiyolojisinde, toplam prostat kanseri ve

ileri veya ölümcül hastalık için risk faktörleri arasında ayırım yapılması zorunludur (Pernar, Ebot, Wilson ve Mucci, 2018).

Tablo 1.1: Total prostat kanserinin seçilmiş risk faktörlerine ilişkin kanıtların özeti
(Pernar ve diğerleri, 2018)

Risk faktörü	Kanıt gücü
Riskli arttıran faktörler	
Yaşlılık	Güçlü
Afrika kökeni	Güçlü
Aile öyküsü	Güçlü
Genetik risk lokusu	Güçlü
Uzun boy	Muhtemel

Tablo 1.2: İleri veya ölümcül prostat kanseri için seçilen risk faktörlerinin kanıtlarının özeti (Pernar ve diğerleri, 2018)

Risk faktörü	Kanıtların gücü
Riskli arttıran faktörler	
Uzun boy	Güçlü
Lipid seviyeleri	Olası
Obezite	Güçlü
Sigara	Güçlü
Süt, kalsiyum	Mümkün
Riskli azaltan faktörler	
Fiziksel aktivite	Güçlü
Kahve	Sınırlı
Domates	Muhtemel
Balık	Olası
D vitamini	Olası
Staninler	Muhtemel

Yukarıda belirtilen faktörlere ilişkin kanıtları değerlendirmek için, Prostat Spesifik Antijen (PSA) taramasının epidemiyolojik çalışmalardaki rolü, risk faktörleri ile prostat kanseri arasında gözlenen ilişkileri etkileme potansiyeli göz önüne alındığında da dikkate alınmalıdır. Bir yandan, risk faktörleri, kanserin başlamasından metastazlara ve ölüme kadar hastalığın patogenezi boyunca prostat kanserini etkileyebilir. Bu nedenle, bir faktör ile prostat kanseri riski arasındaki ilişki, evre veya tümör derecesi gibi hastalığın klinik özelliklerine göre farklılık gösterebilir. Prostat kanserinde epidemiyolojik çalışmalar değerlendirilirken, bir çalışmanın PSA taraması hakkındaki bilgileri ne ölçüde bütünleştirdiğini araştırmak çok önemlidir (Brawley, 2012).

1.2.2.1 Yaş

50 yaşından önce prostat kanseri olan erkeklerin oranı çok düşüktür. Çoğu durumda, hastalık 65 yaş ve üzerinde teşhis edilir. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde, 55-64 yaş grubundaki erkeklerin %30,7'sinde prostat kanseri bulunurken, 35-44 yaş grubu için sadece %0,6'dır (Brawley, 2012). Prostat kanseri 40 yaşın üzerindeki erkeklerde daha fazla görülür. Dünya çapında otopsi çalışmalarından alınan doku örneklerinin histolojik muayenesinde prostat kanseri insidansının yaşla birlikte arttığı ve 80 yaşın üzerindeki erkeklerin yaklaşık %75'inin gizli hastalık belirtisi gösterdiği belirtilmektedir (Billis, 1986). Prostat kanseri insidansı 40-60 yaş grubundaki 55 erkekte yaklaşık 1'i iken, 60 yaş üzerinde bu durum neredeyse 8 kat artarak 7'de 1'e yükseldiği tahmin edilmektedir (Arcangeli, Pinzi ve Arcangeli, 2012). Yüksek riskli hastalar, onaylanmış Prostat Kanseri Risk Değerlendirmesi (CAPRA) skoru kullanılarak tanımlanmıştır. Rekabet riskleri regresyonu, yüksek riskli hastalığı olan yaşlı erkekler arasında yaşın kanserde hayatta kalma üzerindeki bağımsız etkisini tanımlamak için kullanılmıştır. Sonuçlar, 75 yaşlarındaki erkeklerin %26'sının yüksek riskli prostat kanseri ile başvurduğunu göstermiştir. (CAPRA skoru 6 ila 10) (Perdana, Mochtar, Umbas ve Hamid, 2016).

1.2.2.2 Irk

Son çalışmalar, etnik kökenin prostat kanseri için temel risk faktörü olduğunu göstermektedir (Jayadevappa, Chhatre, Johnson ve Malkowicz, 2011). Afrika kökenli Amerikalı erkeklerin prostat kanseri insidansı ve mortalitesinin beyaz erkeklerden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Prostat kanseri'nin en düşük insidansı tipik olarak sadece genetik duyarlılık ile değil, aynı zamanda diyet, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Wu ve Modlin, 2012). Ulusal Kanser Enstitüsü'nden elde edilen

veriler, Afro-Amerikan erkeklerin prostat kanseri'nin (54.2 / 100 000 ve 24.7 / 100 000) diğer etnik ırklardan oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (Bechis, Carroll ve Cooperberg, 2011).

Kromozom 8q24 varyantlarının prostat kanser riski ile ilişkili olduğu ve Afro-Amerikalı erkeklerde daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Bazı çalışmalar ayrıca Bcl-2 gibi hücre apoptoz genlerinde ve Afro-Amerikan erkeklerde EPHB2 gibi tümör supresyon genlerinde daha yüksek bir varyasyon oranı olduğunu göstermiştir (Whitman ve diğerleri, 2010).

Paylaşılan genetik benzerlik, ABD de dahil olmak üzere farklı ülkelerden siyah erkekler arasında benzer oranlarda yüksek dereceli prostat kanseri olgusu gösteren yeni bir çalışmada yapılmıştır (Carpenter ve diğerleri, 2010).

Prostat kanseri insidansı coğrafi konuma göre önemli ölçüde değişir. Globocan verilerine göre, prostat kanseri oranları Afrika ve Asya'da Avrupa ve ABD'den daha düşüktür. Ayrıca, insidans ulusal sınırlar içindeki etnik alt gruplar arasında da farklılık göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Afrika kökenli Amerikalı erkeklerde prostat kanseri geliştirme riski beyaz kökenli Amerikalılara göre %60 daha yüksektir. Bu eşitsizlik, hormonal düzenleme ve prostatın gelişiminde öncü rol alan genlerdeki polimorfizmlerle bağlantılı görünmektedir (Kheirandish ve Chingwundoh, 2011).

1.2.2.3 Aile Öyküsü ve Genetik Faktörler

Birçok çalışma, prostat kanseri riskinin ailesel veriler ile korelasyon gösterdiğini bildirmiştir. Prostat kanseri pozitif öyküsü olan birinci derece akrabası (baba, oğul, erkek kardeş) olan erkeklerde 2 ila 3 kat artmış prostat kanseri riski olduğunu göstermektedir. Ailede prostat kanseri öyküsünün prostat kanseri riskinin artmasıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur. Babaları veya erkek kardeşleri prostat kanseri hastası olan erkeklerin, aile öyküsü olmayanlara göre bu hastalığı geliştirme riskinin 3 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ek olarak, iki veya daha fazla birinci derece prostat kanseri öyküsü olan akrabalarını etkileyen erkeklerin, hastalığı geliştirme riski neredeyse 5 kat daha fazladır (Nemesure, Wu, Hennis ve Leske, 2013).

Erken başlangıçlı prostat kanseri vakalarının çoğunluğu (%64), bu hastalığın aile öyküsü olduğunu ve %40'tan fazlasının prostat kanseri için akrabalık bağının olduğu doğrulanmıştır (Zeegers, Jellema ve Ostrer, 2003).

Gen bağlantı çalışmaları, yedi farklı lokustaki genler üzerinde prostat karsinomu için büyük duyarlılık lokuslarını ortaya koymaktadır. HPC1 geni olarak adlandırılan kromozom 1q24-25, doğuştan gelen bağışıklık savunma mekanizmalarına ve interferon (IFN) aracılı sinyale dahil olan ribonükleaz L (RNASEL) enzimini kodlar (Chen ve diğerleri, 2003). Bu enzim antiviral aktivitenin azaltılmasında ve apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Dikkat çekici bir şekilde, RNASEL mutasyonları olan hastalardan insan prostat kanseri örneklerinin analizi, prostat kanseri gelişimine antiviral savunmaların önemini ortaya koyan retrovirüsün varlığını göstermiştir. Ayrıca, bazı prostat kanseri vakalarında retroviral enfeksiyonların tespiti, kronik retroviral enfeksiyonun ve bunun sonucunda ortaya çıkan doku iltihabının kanser başlangıcı ile potansiyel bağlantısını da göstermiştir (Eeles ve diğerleri, 2008). Kromozom 17p11 üzerinde başka bir HPC geni (HPC2 / ELAC2) tanımlandı ve TGF-beta sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla proliferasyonu düzenleyen SMAD2'yi bağlayarak prostat kanseri gelişimine katılan ELAC2, iyi anlaşılmamış bir fonksiyona sahip bir proteini kodlamaktadır. (Camp ve Tavtigian, 2002). Ek olarak, klinik olarak agresif bir prostat kanseri formu gösteren BRCA 1 ve 2 mutasyonu olan erkeklerde bir HPC alt kümesinin meydana geldiği bulunmuştur. Ayrıca, BRCA2 mutasyonları daha yüksek prostat kanseri insidansı ile ilişkilendirildi ve PALB2, BRCA2 ile etkileşen protein, ailesel prostat kanserine dahil edildi (Rawla, 2019).

1.2.2.4 Vücut Kitle İndeksi (BMI)

Yüksek vücut kitle indeksi (BMI, kilogram cinsinden ağırlık, metre kare cinsinden yüksekliğe bölünür, kg / m^2) ölümcül prostat kanseri gelişme riskinin artmasıyla güçlü bir şekilde ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada prostat kanseri teşhisi konan 2546 erkek arasında bir birim daha yüksek tanı öncesi BMI, prostat kanserine özgü mortalite riskinde yaklaşık %10'luk bir artış ile, ve $\geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ 'lik BMI, normal ağırlığa kıyasla yaklaşık iki kat artmış prostat kanseri ölümü riski ile ilişkilendirilmiştir (Ma ve diğerleri, 2008).

Bir meta-analiz çalışmasında prostat kanseri hastalarında yapılan altı çalışmanın BMI'da 5 kg / m²'lik bir artışın prostat kanserine özgü mortalite riskini %20 ve biyokimyasal nüks riskini %21 artırdığını bildirmiştir (Cao ve Ma, 2011).Yapılan bir başka çalışmada, stabil ağırlığı olan erkeklerle karşılaştırıldığında, 1 yıl boyunca ağırlığı 2,2 kg artanların prostat kanseri nüks riskinde %94 artış olduğunu bulmuştur. Ayrıca, daha yüksek BMI'si olan erkeklerin hastalık geçirme olasılığı yüksektir (Joshu ve diğerleri, 2011). Prostat kanseri tanısı sonrası kilo alımı, artan biyokimyasal nüks oranı ve prostat kanserine özgü mortalite ile ilişkilidir. Altta yatan biyolojik mekanizmalar, insülin / insülin benzeri büyüme faktörü eksenini değişen seks hormonları ve adipokinlerin sinyalizasyon değişikliklerini içerir (Roberts, Dive ve Renehan, 2010).

1.2.2.5 Fiziksel Aktivite

Egzersiz, birçok fayda ve nispeten az yan etki sunan yaşam tarzı terapisinden biridir. Egzersiz eksikliği de artan prostat kanseri riski ile bağlantılıdır. Egzersiz yapan gazilerin üzerinde yapılan bir çalışmada, prostat kanseri riskinin önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur (Keogh ve MacLeod, 2012).

Çeşitli çalışmalar, fiziksel olarak aktif prostat kanseri hastalarının önemli ölçüde daha yüksek yaşam kalitesine, daha az yorgunluğa ve daha düşük PSA seviyelerine sahip olduğunu ve daha az aktif yaşama sahip prostat kanseri hastalarına kıyasla androjen deprivasyon tedavisi (ADT) başlatmada iki yıl gecikme olduğunu göstermiştir. Ayrıca daha az aktif yaşama sahip olan prostat kanseri hastalarına kıyasla yüksek dereceli hastalık riski daha düşüktür (Keogh ve MacLeod, 2012).

1.2.2.6 Diyet

Diyet faktörleri, gelişmekte olan ülkelerden (düşük riskli bölgeler) sanayileşmiş ülkelere (daha yüksek risk) geçiş yapan göçmenler üzerinde yapılan çeşitli çalışmaların kanıtladığı gibi prostat kanserinin gelişiminde önemli bir rol oynayabilir ve bu da sanayi toplumunda prostat kanseri insidansının artmasına doğru bir kayma olduğunu gösterir (Rawla, 2019). Örneğin, Afrika'dakilere kıyasla Afrikalı Amerikalılar arasında prostat kanseri insidansı 40 kat daha yüksektir (Chu ve diğerleri, 2011). Çin'de yaşayan erkeklere kıyasla ABD'de

yaşayan Çinli erkekler için prostat kanseri insidansı 16 kat daha yüksektir. Bu bağlamda çevresel faktörlerin önemli bir rol oynadığını düşünülmektedir. Bazı gıdaların prostat kanserine yakalanmada daha yüksek risk ile ilişkili olduğuna dair birçok çalışma vardır (Hsing, Tsao ve Devesa, 2000).

1.2.2.6.1 Kırmızı Et

Kanser insidansı ve mortalitesinin kişi başına et tüketimi ile ilişkilendirildiği bir çok çalışmada et tüketiminin fazla olduğu erkeklerde prostat kanseri görülme oranının arttığı gösterilmiştir (Gibson, Ferrucci, Tangrea ve Schatzkin, 2010). Yapılan bir araştırmada haftada beş veya daha fazla porsiyon işlenmiş et tüketen erkeklerin, haftada bir veya daha az porsiyon tüketen erkeklere kıyasla daha yüksek prostat kanseri riskine sahip olduğu gösterilmiştir. Afrikalı-Amerikalı erkeklerde, yüksek kırmızı et tüketimi ve artan prostat riski ile bir ilişki gözlenmemiştir. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıkta pişirilen kırmızı et tüketenlerde ilerlememiş prostat kanseri riski %20 artmıştır (Major ve diğerleri, 2011). Eti daha yüksek sıcaklıklarda (125- 300 ° C) pişirmek aromatik hidrokarbonların ve mutajenik heterosiklik aminlerin oluşumuna neden olur. Izgara veya mangalda et, serbest radikallerin üretilmesiyle lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına neden olabilecek N-nitroso bileşiklerinin oluşumuna neden olabilir (Tappel, 2007).

1.2.2.6.2 Sebze ve Meyveler

Vitamin, mineral ve diğer ikincil bitki ürünleri içeren meyve ve sebzelerin sık tüketilmesinin kanser insidansını ve mortalitesini azalttığı düşünülmektedir. Prostat kanseri için, likopen veya turpgiller gibi meyve ve sebzelerin belirli bileşenlerinin veya alt gruplarının Prostat kanser riskinin azalmasıyla ilişkili olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (Leitzmann ve Rohrmann, 2012). Bazı çalışmalar, sebze ve meyve tüketiminin Prostat kanser riskinde bir azalmaya neden olduğunu bulmuştur (Subahir, Shah ve Zainuddin, 2009). Ancak, iki Japon çalışması sebze ve meyve alımı ile prostat kanser riski arasında bir ilişki olmadığını bulmuştur ve diğer bir çalışmada vejetaryen diyet tüketimi ile prostat kanser riski arasında bir ilişki bulunamamıştır (Umesawa ve diğerleri, 2014)(Thakur ve diğerleri, 2011).

1.2.2.6.3 Balık

Hindistan'da yapılan bir araştırmada, balık tüketimeinin prostat kanser riskini önemli ölçüde artırdığını, Japonya'da yapılan bir çalışmada ise yüksek bir balık alımının prostat kanserine bağlı ölüm riski ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. Balıklarda omega-3 yağ asitlerinin varlığının prostat kanser riskini azaltabileceği düşünölmektedir (Pham ve diğerleri, 2009).

1.2.2.6.4 Yeşil Çay

Yeşil çay Asya'da popüler bir içecektir ve kanserin önlenmesinde önemli bir rol oynayabilecek bir antioksidan olan epigallocatechin-3-gallat (EGCG) içerir. Yapılan bir araştırmada göre yeşil çay tüketimeinin (günde 3 ila 5 bardak) ileri prostat kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili olduğu ve prostat kanser riskinin artan yeşil çay tüketimi ile azaldığı gözlemlendi (Jian, Lee ve Binns, 2007). Bununla birlikte, bazı çalışmaları yeşil çay tüketimi ile prostat kanser riski arasında bir ilişki bulamamıştır (Montague ve diğerleri, 2012).

1.2.2.6.5 Tütün ve Alkol

Sigara içmek, steroid seviyelerini etkilediği ve sigara birden fazla kanserojen içerdiği için prostat kanser riskini artırabilir. Bununla birlikte, tütün içimi bulguları çelişkilidir. Birçok çalışma sigara içme ve prostat kanser riski arasında bir ilişki bulamamıştır, Pakistan ve Kuzey Hindistan'daki çalışmaları sigara içmenin prostat kanser riskini artırdığını bulmuştur (Thakur ve diğerleri, 2011).

Hindistan ve Çin'de yapılan çalışmalarda alkol tüketimi ile prostat kanser riskinde artış bulunmumuş olsa da, diğer bir çalışmada alkol tüketimi ile prostat kanser riski arasında bir ilişki bulamamıştır (Hu, Qiu, Zhang ve Cui, 2014). Prostat kanserinin alkolle ilişkisi doza bağlı olabilir. Hafif alkol tüketimi antiinflamatuvar ve antiandrojenik olabilirken, ağır alkol alımı prostat kanserinin görölme oranını arttırabilir. Ağır alkol alımı aynı zamanda enflamatuvar yanıtları artırabilir veya cinsiyet hormonu seviyelerini değiştirebilir (Fowke ve diğerleri, 2015).

1.2.3 Prostat Kanserinin Oluşumunda ve İlerlemesinde Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

1.2.3.1 Androjen Reseptörü (AR)

Huggins ve Hodges'in (1941) orşiektomi ameliyatı geçirenlerde önemli ölçüde tümör gerilemesine neden olduğunu göstererek androjen sinyalinin prostat kanserindeki merkezi rolünü ilk kez ortaya çıkarmalarının üzerinden 70 yıldan fazla bir süre geçti. Ufuk açıcı keşifleri 1966'da Medicine'deki Nobel Ödülü ile tanındı (Azzouni ve Mohler, 2012). Androjen reseptör geni 90 kb'den uzundur ve 3 ana fonksiyonel alana sahip bir proteini kodlar: N-terminal alanı, DNA bağlayıcı alan ve androjen bağlayıcı alan. Protein, steroid hormonu ile aktive edilmiş bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Hormon ligandının bağlanması üzerine, reseptör yardımcı proteinlerden ayrışır, çekirdeğe yer değiştirir, dimerize olur ve androjene duyarlı genlerin transkripsiyonunu uyarır (Tan, Li, Xu, Melcher ve Yong, 2015).

Prostat kanserlerinin çoğunluğunun hastalığın seyri boyunca androjen reseptörü (AR) ifade ettiği açıktır ve son yıllarda, androjen sinyalinin moleküler temeline daha derin bir sorgulama, AR'nin özellikle kanser hücresi davranışını nasıl yönlendirdiğinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Birlikte ele alındığında, bu bulgular prostat kanseri patogeneğinde androjen sinyalinin önemini arttırmaktadır (Sadi, Walsh ve Barrack, 1991).

Ligand kaynaklı transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörü (AR), primer prostat kanserinde ve metastazlarda eksprese edilir. AR birden fazla hücresel olayı, çoğalma, apoptoz, göç, istila ve farklılaşmayı düzenler. Prostat kanseri hücrelerindeki ifadesi steroid ve peptid hormonları tarafından düzenlenir. Meyve ve sebzelerde bulunan çeşitli bileşikler tarafından AR'nin aşağı regülasyonu prostat kanseri için kanser önleyici maddelerin bulunması için bir strateji olarak kabul edilir. Prostat kanserinde AR mutasyonları keşfedilmiştir ve tümör ilerlemesi ile görülme sıklığı artabilir. AR mutasyonları ve seçilmiş koaktivatörlerin artan ekspresyonu, anti-androjenlerin hayatta kalma özelliklerinin kazanılmasına katkıda bulunur. Bazı koaktivatörlerin ekspresyonu androjen üretiminin baskılanması sırasında geliştirilmiştir. AR aktivitesi, reseptörün maksimal uyarılması için gerekli androjen konsantrasyonunu azaltan sitokinler veya büyüme faktörleri gibi peptitler tarafından düzenlenir (Culig ve Santer, 2014).

1.2.3.1.1 AR ile Spesifik Hücresel Fonksiyonların Düzenlenmesi

Prostat kanseri araştırmalarında androjene duyarlı hücre hatlarının sayısı giderek artmaktadır. Androjen tarafından düzenlenen hücresel olayların anlaşılması, VCaP, DUCaP, LAPC-4 veya PC3 gibi hücre hatlarının kullanılmasıyla kolaylaşmıştır. Bu nedenle, LNCaP hücreleri yeni antiandrojenik bileşiklerin etkinliğini değerlendirmek için ön deneyler için sıklıkla kullanılır. Buna karşılık, PC3 hücreleri LNCaP hücrelerine kıyasla androjenlere karşı daha az yanıt gösterir (Attardi, Burgenson, Hild ve Reel, 2004).

Proliferatif ve farklılaşma yanıtlarındaki farklılıklar, AR ekspresyon seviyesinin hormona duyarlı kanser hücrelerinin büyümesinin tek belirleyicisi olmadığını göstermektedir. Programlanmış hücre ölümünün androjenik regülasyonu kullanılan tümör modeline bağlıdır. Endojen AR'yi ifade eden hücrelerin aksine, AR cDNA ile enfekte olan PC3 hücreleri apoptozun indüksiyonu konusunda daha hassastır (Heisler ve diğerleri, 1997). Androjene duyarlı hücrelerde apoptozun indüksiyonu, resveratrol gibi ajanlar androjene duyarlı hücrelerde apoptozu indükler (Hayes ve diğerleri, 2001).

1.2.3.1.2 AR Mutasyonları ve Prostat Kanserindeki Etkileri

Androjen reseptör geni 90 kb'den uzundur ve 3 ana fonksiyonel alana sahip bir proteini kodlar: N-terminal alanı, DNA bağlayıcı alan ve androjen bağlayıcı alan. Protein, steroid hormonu ile aktive edilmiş bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Hormon ligandının bağlanması üzerine, reseptör yardımcı proteinlerden ayrışır, çekirdeğe yer değiştirir, dimerize olur ve androjene duyarlı genlerin transkripsiyonunu uyarır (Veldscholte, Berrevoets, Brinkmann, Grootegoed ve Mulder, 1992). MDA prostat kanseri 2b hücre hattında iki AR mutasyonu (L701H ve T877A) tanımlanmıştır. Bir hastanın dokusunda fonksiyonel olarak karakterize edilen ilk AR mutasyonu, Met ile Val'in değişmesidir (Culig ve diğerleri, 1993). Mutasyona uğramış reseptör, hidrokisflutamid ile antiandrojen tedavisinde başarısız olan bir hastadan elde edilen bir örnekte keşfedilmiştir. Fonksiyonel çalışmalar, bunun progesteron, adrenal androjenler ve dihidrotestosteron metabolitleri tarafından AR'nin artan aktivasyonu ile karakterize edilen işlev mutasyonunun bir kazanımı olduğunu ortaya koymuştur. (Marcelli ve diğerleri, 2000).

1.2.4 Prostat Kanserinde En Sık Rastlanan Genetik Değişiklikler

Prostat kanserinin görülme sıklığı seçilmiş popülasyonlarda yüksek olmasına rağmen, nedeni bilinmemektedir. Bununla birlikte, açık olan şey, prostat kanserinin etiolojisinde birden fazla genetik ve çevresel faktör bulunan heterojen bir hastalık olduğudur. Birçok gen, hastalığın farklı nedenler ile gelişiminden sorumludur ve özellikle kalıtsal prostat kanseri genleri HPC1 (1q24–25), CAPB (1p36), PCAP (1q42–43), HPC2 (17p12), HPC20 (20q13) ve HPCX (Xq27–28) prostat kanseri gelişimde etkilidir. Bununla birlikte, hastalığın yüksek değişkenliği, birçok epidemiyolojik faktör ve tanı koymada prostat kanseri için bu genlerin iyi bir biyobelirteç olmasını zorlaştırmıştır (Domińska, 2009).

1.2.4.1 TGF- β (Dönüştürücü büyüme faktörü B) Yolu

TGF- β süper aile üyelerinin hücre çoğalması, apoptoz, hücre farklılaşması ve hücre göçünü düzenlemede rolleri vardır. TGF- β hücre çoğalmasını engellemek ve apoptozu indüklemek için normal prostat epitel hücrelerine ve bazı prostat kanseri hücrelerine etki eder. Androjen duyarlı prostat kanseri hücre hattında TGF- β sinyalinin aktivasyonu, TGF- β tümör süpresif özelliklerini oluşturur (Guo ve Kyprianou, 1998).

TGF- β sinyal yolunun aktivasyonu, sağlıklı kanserleşmemiş hücrelerde ve erken evre kanserli hücrelerde hücre döngüsünün durmasına neden olur ve bu yolun tümör baskılamada önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, birçok kanserde TGF- β ekspresyonu ve TGF- β reseptör tarafından başlatılan hücre içi sinyalizasyonun aktivasyonu sıklıkla tümör ve stromal hücreler tarafından yüksek miktarlarda üretilir ve buna karşılık angiogenezi uyarır ve bağışıklık sistemini baskılayarak tümör oluşmasını da uyarabilir. Bu durum, kanserin ilerlemesinde TGF- β sinyalinin tümör baskılayıcı olmaktan ziyade tümör oluşumunu tetiklediğini göstermektedir (Colak ve Ten Dijke, 2017).

1.2.4.2 BCL-2

BCL-2, hücre sağ kalımını, proliferasyonunu destekler ve öncelikle dış mitokondriyal membran, endoplazmik retikulumun membranı ve nükleer zarfda yer alır. BCL-2, PTEN kaybı ve p53 inaktivasyonu, PI3K / AKT fosforilasyonu ve aktivasyonu gibi moleküler ve

sinyal yollarının kombinasyonu yoluyla prostat kanserlerini apoptozdan korur (Kim ve diğeri, 2017).

1.2.4.3 P53

P53, kanserlerde sıklıkla mutasyona uğramış bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsü, yaşlanma ve apoptoz gibi önemli hücresel aktivitelerin düzenlenmesinde görev alır. Enflamasyon ve kanser ortak yollarla güçlü bir şekilde ilişkilendirildiğinden, P53 çok sayıda insan dokusunda enflamasyonu baskılayabilir (Barabutiş, Schally ve Siejka, 2018). P53'ün birçok hastalığa karşı önemi, P53'ün epitel ve stromal prostat hücrelerinden gelen çapraz koşullandırılmış ortamda Cetrorelix'in (LHRH antagonisti) sağlam etkilerine kısmen aracılık ettiği gerçeğiyle vurgulanmaktadır. Bir çalışmada WPMY-1 insan prostat stromal hücreleri ve BPH-1 insan iyi huylu prostat hiperplazisi hücreleri, Cetrorelix ile tedaviye tabi tutulmuş ve bu antagonistin P53 ekspresyonunu indüklediği ve STAT-3 yolunu inhibe ederken her iki hücre hattının da büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (Siejka, Schally ve Barabutiş, 2014).

1.2.4.4 VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)

VEGF regülasyonu karmaşıktır ve hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde meydana gelir. VEGF promoterinde bir TATA-bağlanma kutusu bulunmamasıyla birlikte, bir GC-zengin çekirdek promoter bölgesi ve HIF1- α 'yı bağlayan hipoksi cevap elemanlarını içeren ilave distal güçlendirici alanlar bulundurulur. VEGF'nin transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası regülasyonu iyi çalışılmış ve hem genetik hem de epigenetik mekanizmalar tanımlanmıştır (Hanson, Gorman, Reese ve Fraizer, 2007). Mekanik olarak, VEGF'nin androjen indüksiyonunun, distal VEGF promoterindeki ARE bağlanma bölgeleri yoluyla değil, prostat kanseri hücrelerinde çekirdek promoter bölgesinde Sp1 ile AR kompleksi oluşumu yoluyla düzenlendiği görülmektedir (Eisermann ve Fraizer, 2017).

1.2.4.5 MMP

Matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), hücre dışı matriksin (ECM) çeşitli bileşenlerini parçalayabilen bir enzim ailesidir. Membranın yeniden şekillenmesi ve onarımı sırasında meydana gelen fizyolojik süreçlerde yer alırlar ve bazı durumlarda çok önemli bir rol oynarlar. Romatoid artrit, aort anevrizmaları, miyokard enfarktüsü, septik şok, karaciğer

hastalığı, tümör invazyonu ve neoplastik metastaz gibi malign olmayan ve malign patolojilerde önemli işlevlere sahiptir (Young ve diğerleri, 1996).

Plazma MMP aktivitesi (MMP-2, MMP-9) ve protein konsantrasyonu (MMP-2, MMP-9, MMP-13) ELISA yöntemi kullanılarak metastatik prostat kanseri hastalarında daha belirgin şekilde arttığı bulunmuştur (Morgia ve diğerleri, 2005).

1.2.5 Prostat Kanserinde Belirti ve Semptomları

“Prostat kanseri belirtileri şöyle sıralanabilir; İdrar yapma gücü, idrar akışında kuvvet azalması, menide ya da idrarda kan görülmesi, boşalma esnasında ağrı, kasık bölgesinde rahatsızlık hissi, kemik ağrıları, sertleşme bozukluğu” (Grubu, 2017).

Erkeklerde prostat kanseri çeşitli şekillerde tespit edilir. Bazı ülkelerde prostat kanseri için bir tarama testi olarak PSA'nın yaygın kullanımı, asemptomatik erkeklerde tanı konulmasına yol açmıştır. Erkekler, alt üriner sistem semptomları (AÜSS) veya diğer genito-üriner semptomlardan şikâyet ederek doktorlarına başvurabilirler ve bu nedenle prostat kanseri için araştırılırlar. Ayrıca, yaşamlarını sürdüren ve teşhis edilmemiş prostat kanseri nedeniyle ölen önemli sayıda erkek olduğundan şüphelenilmektedir. Bu şüphe, otopsi çalışmalarının, 85 yaşın üzerindeki erkeklerin dörtte üçüne kadar prostatta neoplastik değişiklikler olduğunu ve bunların hepsine ölümlerinden önce teşhis konulmadığını gösteren bulgulara dayanmaktadır (Sakr, Haas, Cassin, Pontes ve Crissman, 1993).

1.2.6 Prostat Kanserin Tanısı

Gleason skoru, prostat kanseri hücrelerinin üreme ve yayılım hızları hakkında fikir veren ve kanserli hücrelerin normal hücrelerden farklılaşma derecesini değerlendiren skorlamadır. Gleason skoru, 2-10 arasında değişir ve skor arttıkça kanserin daha agresif, ilerlemesinin daha hızlı olduğu anlamına gelmektedir. Prostatın manyetik rezonans görüntülemesi ve prostat biyopsisi Multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme, prostat kanserini saptamak için %89 duyarlılık ve %73 özgüllük sunar; prostat biyopsisinin doğruluğunu artırmak için kullanılabilir. Daha önce negatif biyopsi almış erkekler için önerilir. Prognostik biyobelirteçler; Serum, doku ve görüntü tabanlı biyobelirteçler kanser

davranışı için prognostik bilgiler sunar. Pozitron emisyon tomografisi ile fonksiyonel görüntüleme lokal nüks, bölgesel lenf nodu metastazları ve uzak metastazların tespitini içerir (Litwin ve Tan, 2017).

Kallikrein-3 olarak da adlandırılan PSA, prostat bezinin oluşturduğu bir glikoproteindir. Serumunu sıvılaştırmak, sperm hareketliliğini arttırmak ve servikal mukusu çözmek için kullanılır. 1991'de Catalona ve arkadaşları, PSA'nın prostat kanseri bulguları olmayan erkeklerde PCa için birinci basamak tarama testi olarak kullanılabileceğini gösterdi. Daha sonra, PSA testi yaygın olarak benimsendi ve daha önceki envantere olduğu gibi PCa insidans oranlarında bir artışa neden oldu. Bu, yeni bir klinik evre sınıflandırmasının, yani pratikte en yaygın evre haline gelen normal prostat kanserli bireylerin ortaya çıkmasına yol açtı (Catalona, Loeb ve Han, 2006).

1.2.7 Prostat Kanserinin Tedavisi

Prostat kanserinin tedavisi, androjen ablasyon tedavisi (androjen reseptör baskılanması), prostatektomi, radyasyon ve sitotoksik veya kemoterapötikler dahil olmak üzere birçok yaklaşımı kapsar. Androjen ablasyon terapisi, 1941'de Huggins ve Hodges tarafından tanımlanmıştır. Cerrahi veya kimyasal olarak kısırlaştırılmış ilerlemiş prostat kanseri hastalarında klinik bir iyileşme kaydetmişlerdir. Bu klinik iyileşme, ağrıda azalma ile birlikte kilo, iştah ve hematokritte artış olarak tanımlandı. İlk kimyasal kastrasyon terapisinde, keşfedilen ilk oral olarak aktif östrojen olan, 1938'de Charles Dodd tarafından sentezlenen dietilstilbesterol (DES) kullanılmıştır (Martino, Nevadunsky, Magliaro ve Goldberg, 2002). İlginç bir şekilde, bu, ilk tersine çevrilebilir hadım yöntemi olarak ortaya çıktı. DES, serum testosteron düzeylerini düşürmede oldukça etkiliydi, ancak daha yüksek dozlarda kardiyotoksik ve kanserojen etkilere sahip olduğu keşfedildi (Seidenfeld ve diğerleri, 2000). Bu nedenle, bu yaklaşımların ileriye dönük uygulanabilir bir seçenek olması için daha az toksik alternatiflerin geliştirilmesi gerekiyordu. Bilim insanları 1960'larda androjen reseptörünün keşfedilmesiyle, anti-androjen tedaviler geliştirilmeye yöneldi. Saf anti-androjenlerin, sonunda luteinize edici hormonda bir artışa yol açtığı ve daha sonra androjen reseptörü doluluğu için anti-androjenleri geride bırakabilecek şekilde dolaşımdaki testosteronda bir artışa yol açtığı için geçerli bir seçenek olmadığı hemen anlaşıldı. Birkaç on yıllık klinik kanıtı sahip olunan, androjen ablasyon yaklaşımlarının, sıklıkla hormona dirençli hastalık geliştirdikleri için ilerlemiş hastalığı olan hastalar için iyileştirici olmadığı

fark edilmeye başlandı. Bu farkındalık, ek tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini teşvik etti (Denmeade ve Isaacs, 2004).

Prostat kanseri için en erken tedavi prostatektomiydi. Bu ilk kez 1904'te Hugh Hampton Young tarafından Johns Hopkins'teyken perineal yaklaşım kullanılarak gerçekleştirildi. Bu prostatektomi yöntemi, Millin'in retropubik prostatektomiyi geliştirdiği 1940'ların ortalarına kadar standarttı. Bu yaklaşımın başlıca avantajları, öğrenmenin daha kolay olması ve evrelemenin pelvik lenf düğümlerinin incelenmesiyle belirlenmesine izin vermesiydi. Prostatektomi vakalarında, bu yeni teknik, 1980'lere kadar küçük iyileştirmelerle kullanıldı (Denmeade ve Isaacs, 2004). İktidarsızlık ve diğer üriner ve bağırsak disfonksiyon semptomları dahil olmak üzere onunla ilişkili başka riskler olduğu için hala çok sık kullanılmıyordu. Bu potansiyel komplikasyonların, Johns Hopkins'de Patrick Walsh tarafından penise zarar veren nörovasküler demetlerin önlendiği modifiye bir retropubik prostatektomi geliştirilinceye kadar üstesinden gelinememişti (Vickers, Roobol ve Lilja, 2012).

X-ışınlarının keşfedilmesinden sonra, ilk klinik kullanımlardan biri prostat kanseri ile ilişkili pelvik kemik metastazların ağrısını hafifletmekti ve böylece hastalığın tedavisinde radyasyon için bir imkân doğdu. Rektum veya üretraya radyum kaynaklarının sokulmasıyla, hastalığı lokal olarak tedavi etme girişimleri kısa sürede gerçekleştirildi. Prostata radyoaktif atomlar implante edildiği diğer teknikler de tasarlandı. Bu teknikle ilgili en büyük sorun implantların dozajlanması ve yeri idi. 1980'lerde ultrason, atomlar daha hassas bir şekilde yerleştirilmesine izin verdi ve çevre dokulara olan olumsuz etkileri azalttı. Erken evre kanser tedavisi için artık prostatektomiye göre radyasyon tedavileri tercih edilmektedir (Denmeade ve Isaacs, 2004). Prostat kanseri için son ana tedavi yöntemleri sistemik yaklaşımlar veya sitotoksik (kemoterapötik) yaklaşımlardır. Bu yaklaşım, bazı prostat kanserlerinin androjen-ablasyon yaklaşımlarına dirençli olduğunun anlaşılması nedeniyle ortaya çıktı (Vickers ve diğerleri, 2012).

Kemoterapötikler, hücrelere doğrudan toksisite ve apoptoza neden olma olmak üzere iki şekilde etki ederler. Bu bileşikler, DNA replikasyonu, mRNA üretimi ve protein üretimi dahil olmak üzere kanser büyümesi için gerekli süreçleri bloke eder. Bu yaklaşımın

arkasındaki fikir, kanserlerin hızla çoğalması ve bu nedenle bu ilaçların etkilerine daha duyarlı olmasıdır. Normal hücreler ise daha yavaş büyür ve bu olumsuz etkilere karşı daha az duyarlıdır ve aynı zamanda sağlam onarım mekanizmalarına sahiptir. Buna rağmen, vücutta kemoterapötiklerin etkilerine duyarlı bazı hızlı bölünen hücreler (örn. Gastrointestinal hücreler, kemik iliği hücreleri ve saç folikülü hücreleri) olduğu için bir denge sağlanmalıdır (Gerl ve Vaux, 2005). Tüm kanserlerin yaklaşık üçte birinin diyet değişikliği ve egzersiz yoluyla ideal vücut ağırlığının korunmasıyla önlenbilir olduğu tahmin edilmektedir. Bu nedenle, "süper yiyecekler", yararlı olduğu düşünülen yüksek bileşik konsantrasyonları nedeniyle sıcak bir konu haline gelmiştir. Bu bileşikler selenyum, D ve E vitaminleri, likopen ve polifenoller içerir. Bu bileşiklerin her birinin, birçok kanserde düzensiz olduğu bilinen sinyal yollarını (androjen reseptörü, Akt, NFkB, Wnt, Hedgehog, notch, vb.) devre dışı bıraktığı ya da aktive ettiği gösterilmiştir. Bu yolların ortak teması, bunların büyüme, apoptoz, farklılaşma ve çoğalmayla olan bağlantılarıdır (Sarkar, Li, Wang ve Kong, 2010).

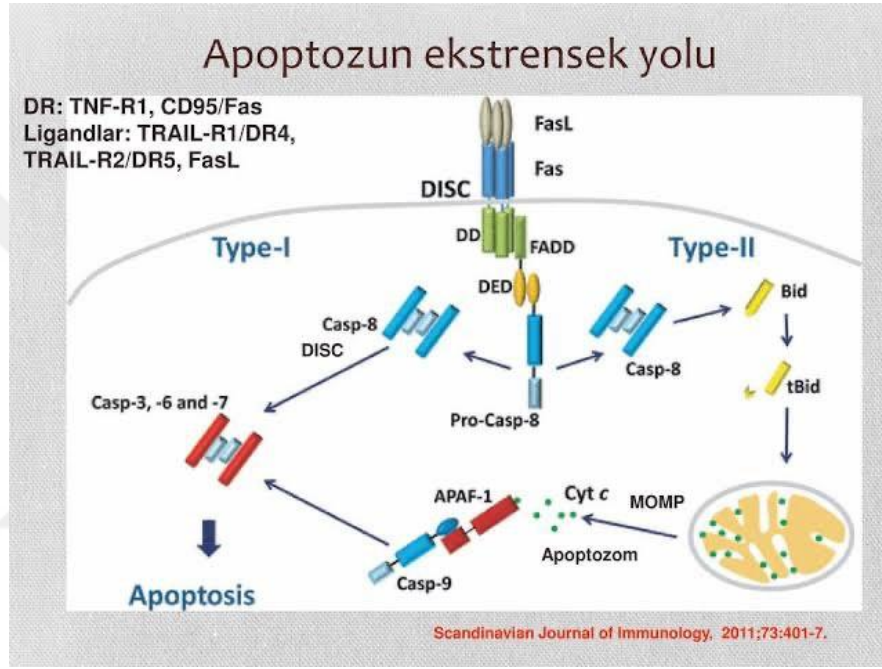
1.3 Apoptosis

Apoptoz programlanmış hücre ölüm mekanizmasına verilen isimdir (El-Khattouti, Selimovic, Haikel ve Hassan, 2013). Apoptotik süreç mutant, hasar görmüş, yaşlanmış ve bağlanmamış hücreleri ortadan kaldırır. Apoptotik yolun başarısızlığı kanser, otoimmün ve dejeneratif hastalıkları içeren çok sayıda hastalığa neden olur. Kaspazlar, apoptotik hücre ölümünde çok önemli bir rol oynarlar ve büyük hücre içi sistein proteazları ailesine aittirler. Sitozolda bulunan prokaspazlar adı verilen kaspazların inaktif formları, apoptotik sinyali takiben aspartik asit kalıntıları üzerindeki peptid bağının bölünmesi yoluyla aktive olurlar. Başlatıcı kaspazlar (2, 8, 9 ve 10) apoptozu başlatır. Apoptotik hücre ölümü için iki tür yol vardır, bunlar Ekstresek ve İnsterensek yollardır (Khan, Blanco-Codesido ve Molife, 2014). Kaspaz 8, ekstrinsik apoptotik yol için gerekliken, kaspaz 9, mitokondri aracılı apoptoz için gereklidir. Her iki yol da kaspaz-3'ü etkinleştirir, böylece kaspaz kaskadını tetikler. Etektör kaspaz 3, 6 ve 7 apoptozu yürütür.

1.3.1 Ekstresek Yol

Reseptör aracılı yol, dışsal yol, Fas / CD95, TNFR-1 ve tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörlerini içeren tümör nekroz faktör reseptörü

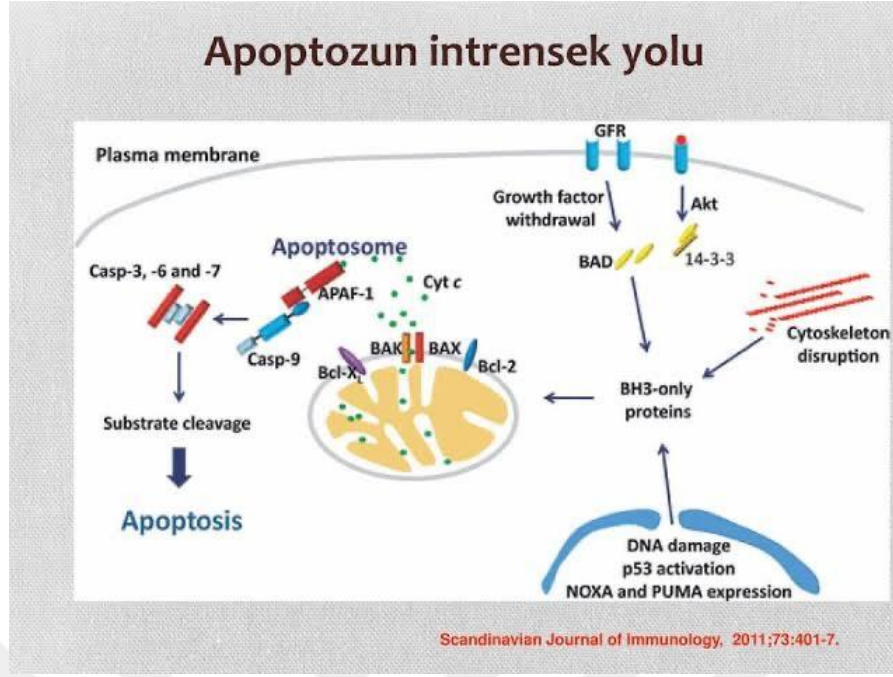
(TNFR) gen ailesine ait reseptörler tarafından başlatılır. Ligandların kendi ölüm reseptörlerine bağlanması ve TNFR ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) veya Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) adaptör proteinini uyarır ve sonuç olarak procaspase 8'i etkinleştirir. Başlatıcı kaspaz8, dolayısıyla sinyal yolunun transdüksiyonu. Aktif kaspaz 8, kaspaz kademeli aktivasyonunu tetikler. Aşağı akış efektör kaspazları, kaspaz 3, 6 ve 7, kaspaz 8 tarafından aktive edilir ve apoptoza yol açar (Şekil 1.3). Ek olarak kaspaz 8, pro-apoptotik Bid proteininin bölünmesiyle mitokondri aracılı yolu dolaylı olarak aktive eder. Daha sonra sitokrom c mitokondriden salınır (Ghobrial, Witzig ve Adjei, 2005).



Şekil 1.2: Apoptozun ekstrinsek yolunun temsili gösterimi (Demchenko, 2012)

1.3.2 İnstrensek (Mitokondriyal) Yol

Mitokondri aracılı veya içsel yol, pro-apoptotik proteinler, hipoksi, antikanser ilaçlar, DNA hasarı, metabolik stres ve kusurlu bir hücre döngüsü gibi apoptoz uyarıcıları tarafından tetiklenir. Bu sinyaller, mitokondriden sitozole kadar ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörünün (Smac) ve sitokrom c mitokondriyal membranlar arası boşluk proteinlerinin salınmasını tetikler. Ek olarak, apoptozom kompleksi sitokrom c, prokaspaz 9 ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) tarafından oluşturulur. Daha sonra, mitokondri aracılı yolun omurgası olan aktive kaspaz 9, aşağı akış efektör kaspazları 3, 6, 7'yi uyarır ve apoptotik hücre ölümünü tetikler. Smac, kaspazların işlevini bloke eden Apoptoz İnhibitörü (IAP) proteinlerini inhibe eder (Khan ve diğerleri, 2014).

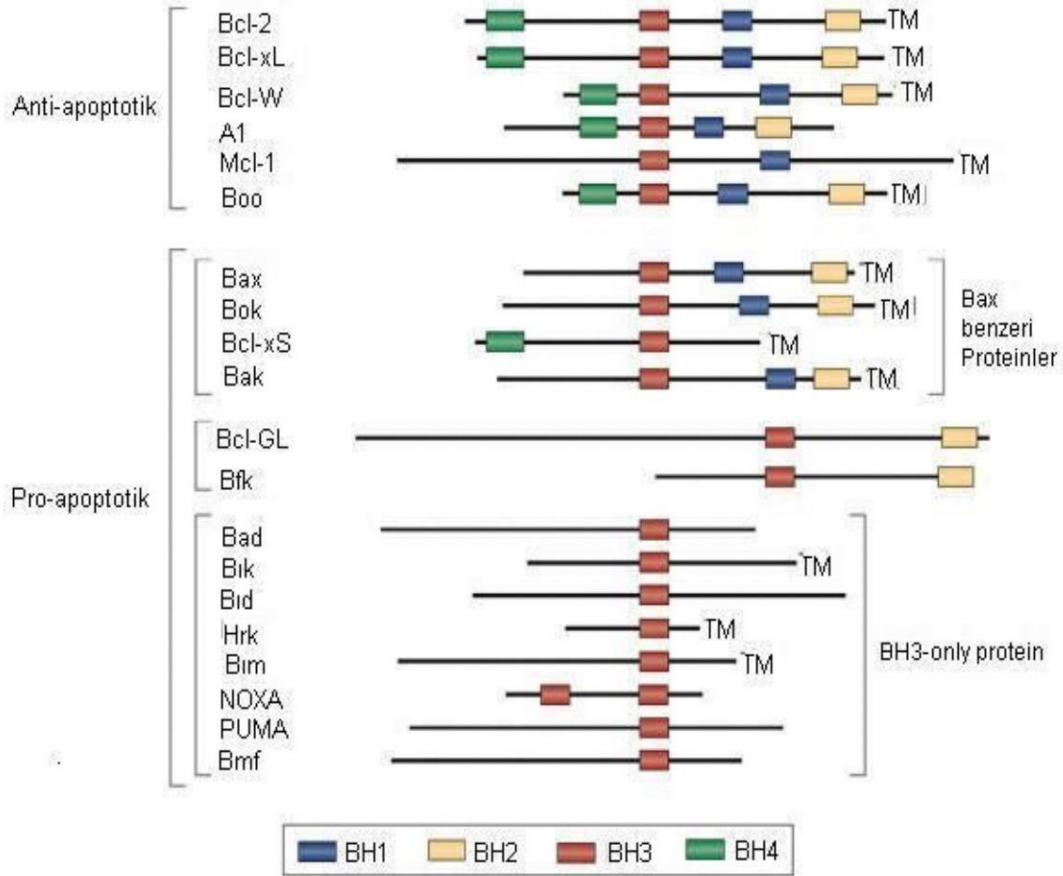


Şekil 1.3: Apoptozun intrensek yolunun temsili gösterimi (Demchenko, 2012)

1.3.3 Bcl-2 Ailesi Proteinleri

Bcl-2 aile üyeleri, mitokondri aracılı apoptotik yolda önemli bir rol oynar. Bcl-2 geni, foliküler lenfomalarda 14 ve 18. kromozomlarda karşılıklı bir translokasyonu olan bir genidir. Bu proteinler mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) kontrol eder. Endoplazmik retikulum, mitokondri ve sitozolde sunulan 25'ten fazla anti- ve pro-apoptotik protein üyesi tanımlanmıştır. Yapılarına ve işlevlerine göre üç ana gruba ayrılırlar. Bcl-2, Bcl-W, Bcl-xL, Bcl-B, Mcl-1 ve BclA1 gibi anti-apoptotik proteinler dört BH (1-4) homoloji alanının tamamına sahiptir. Bax, Bok ve Bak pro-apoptotik proteinler üç BH (1-3) alanına sahiptir. "Yalnızca BH3 proteinleri" olarak bilinen Noxa, Puma, Bad, Bim, Bmf, Bid, Hrk ve Bik pro-apoptotik proteinler yalnızca bir BH3 alanı içerir. İki apoptotik yol arasında bir köprü oluşturur. Anti-apoptotik proteinlerin yüksek oranda eksprese edilmesinden ziyade anti-ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengesizliğin karsinogenezin nedeni olduğu ileri sürülmektedir (Hall, Troutman, Price, Figg ve Kang, 2013). Sadece BH3 proteinleri, duyarlılaştırıcılar (Bad, Bik ve Noxa) ve aktivatörler (Bim, tBid) olarak iki alt grupta sınıflandırılır. Bax ve Bak aktiviteli çok alanlı proteinler için iki model sunulmuştur. Doğrudan aktivasyon modelinde, Bim ve tBid aktivatör proteinleri, aktivasyonlarını başlatmak için doğrudan Bax ve Bak ile etkileşime girerken, Bad, Bik ve Noxa duyarlılaştırıcı proteinler, Bax ve Bak'ı doğrudan uyaramazlar, ancak anti-apoptotik Bcl-2'ye

bağlanırlar ve bloke ederler, Bcl-xL, Bcl-W, BclA1 ve Mcl-1 proteinleri. Dolaylı aktivasyon modelinde, tüm aktivatör ve duyarlılaştırıcı proteinler antiapoptotik proteinlerle etkileşir ve inhibe eder. Sonuç olarak, apoptotik süreci başlatmak için Bax ve Bak aktive edilir (Adams ve Cory, 2007).



Şekil 1.4: Bcl-2 ailesi genlerinin şematik gösterimi (Shamas-Din, Brahmhbhatt, Leber ve Andrews, 2011)

1.4 *Althaea officinalis* L.

Althaea officinalis L. Asya, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ne özgü bir bitki olmakla birlikte geleneksel olarak oral, farengel mukoza tahrişinin tedavisinde kuru öksürük, hafif gastrit, cilt yanıkları, böcek ısırıkları, nezle, gastrointestinal sistem ve idrar yolu şikayetlerinde kullanılır. Anti-enflamatuar, immünostimulan ve fagositik aktivitesinin

olması ve diş ve diş eti enfeksiyonlarına karşı etkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Buna ek olarak antibakteriyel etkisi mevcuttur (Mroueh, Daher ve Hage-Sleiman, 2011). Ali Esmail, *A. officinalis* L.'in farklı kısımlarından birçok bileşik ekstrakte etmiştir. Bunlar pektinler % 11, nişasta % 25-35, mono ve di-sakarit sakkaroz % 10, uucilage % 5, flavonoidler (Hypolaetin-8-glukozit, izooktitrin, kaempferol, kafeik, pcoumarik asit), kumarinler, skopoletin, fitosteroller, tanenler, asparajin ve birçok amino asittir (Al-Snafi, 2013).

Bu çalışmadaki amacımız, *Althaea officinalis* L. ieğinden elde ettiğimiz Etil Asetat ve Metanol ekstraktlarının prostat kanser hücre hattı olan PC3 ve LNCaP'teki sitotoksik ve hücre göçüne olan etkilerinin araştırılması ve hücre apoptozunda rol alan Bcl-2, Bcl-xL, Bax ve Bak genlerinin mRNA seviyesinde ifadesinin araştırılmasıdır. Ayrıca HPLC analizi ile Ekstraktların içerik analizi yapılması çalışmanın amaçları arasındadır.



şekil 1.5: *Althaea officinalis* L. ieği (Nosal'ova ve diğerleri, 1992)

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan cihazlar ve deneysel malzemeler; Fermantes, Sigma ve Biolabs'dan temin edilmiştir.

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan tüm laboratuvar cihazları aşağıda **Tablo 2.1:** ve **2.2:**'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan cihaz listesi

Kullanılan Cihazlar	Model
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientific i, italya
Buzdolabı, derin dondurucu	Beko, Türkiye, Uğur, Türkiye
CO2'li inkübatör	Memmert in 55
Görüntüleme Cihazı	Fusion FX VILBER LOURMAT
Hassas Terazı	Denver instrument
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	IKA C-MAG HS10, Almanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Almanya
96 kuyulu plaka okuyucu spektrofotometre	Thermo
Laminar Air Flow	Logic Labconco
Otomatik pipetler	Thermo
Otoklav	Hirayama HV85, Japonya
pH Metre	Hanna Instrument
PZR cihazı	Techne TC-3000x, Applied Biosystems Veriti 96 Well
RNA elektroforezi	Thermo

Tablo 1.2: (Devam)

+4°C Soğutmalı Makro santrifüj (Falkon)	Sigma
Santrifüj (Ependorf)	Mikro 120 Hettich
Saf su cihaz,	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa)
-80°C dondurucu	Thermo
UV Visible spektrofotometre	Thermo
Vorteks	Elektromag, Türkiye
qRT PZR	Roche
Bilgisayar	Casper

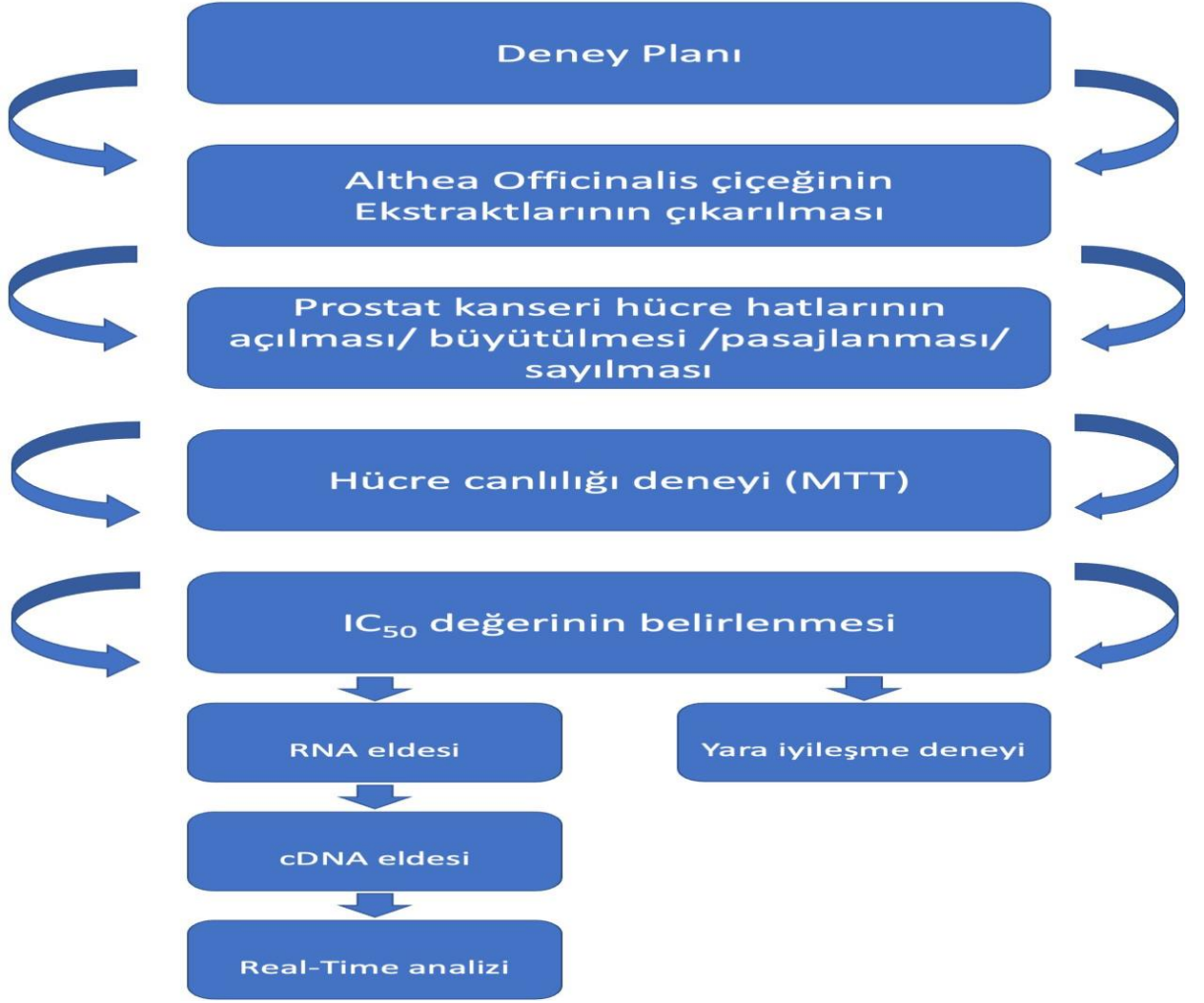
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan Kimyasalların listesi

Malzeme ismi	Firması
Dulbecco's Modified Eagle 's Medyurn (DMEM)/F12 Gibco™	Thermo Scientific
RPMI 1640 Medium	Thermo Scientific
Fetal Sığır Serum (FCS)	Sigma
Fosfat tampon tabletleri (PBS)	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma
L-glutamin, Tripsin-EDTA	Sigma
GeneJET™ RNA Purification Kit	Thermo Scientific
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma

Tablo 2.2: (Devam)

SYBR® Green PCR Master Kan 1ml	Sigma
Formaldehit, P-Merkaptoetanol	Sigma
Reverse Transkriptaz	Thermo Scientific
MTT	Biolabs
Metanol	Sigma-Aldrich
Etil Asetat	Sigma-Aldrich
Kristal Viyole boyası	Sigma-Aldrich
Metilen Mavisi boyası	Sigma-Aldrich

2.2 Metod



Şekil 2.1: İzlenecek deney tasarımı

2.2.1 *Althaea officinalis* L. Çiçeğinden Ekstrakt Elde Edilmesi

Bitki yerel bir aktardan satın alındı. Bitki ekstraktının hazırlanmasında şu basamaklar izlendi.

1- Kurutulmuş *A. officinalis* L. çiçeği blender ile toz haline getirildi ve iki eşit miktara ayrıldı.

2- Her miktar ayrı kaplarda Metanol (Lichrosolv) ve Etil Asetat (Sigma-Aldrich) ile karıştırıldı.

3- Her iki karışım 72 saat 40°C'de ısıtmalı karıştırıcıda manyetik balık ile karıştırmaya bırakıldı.

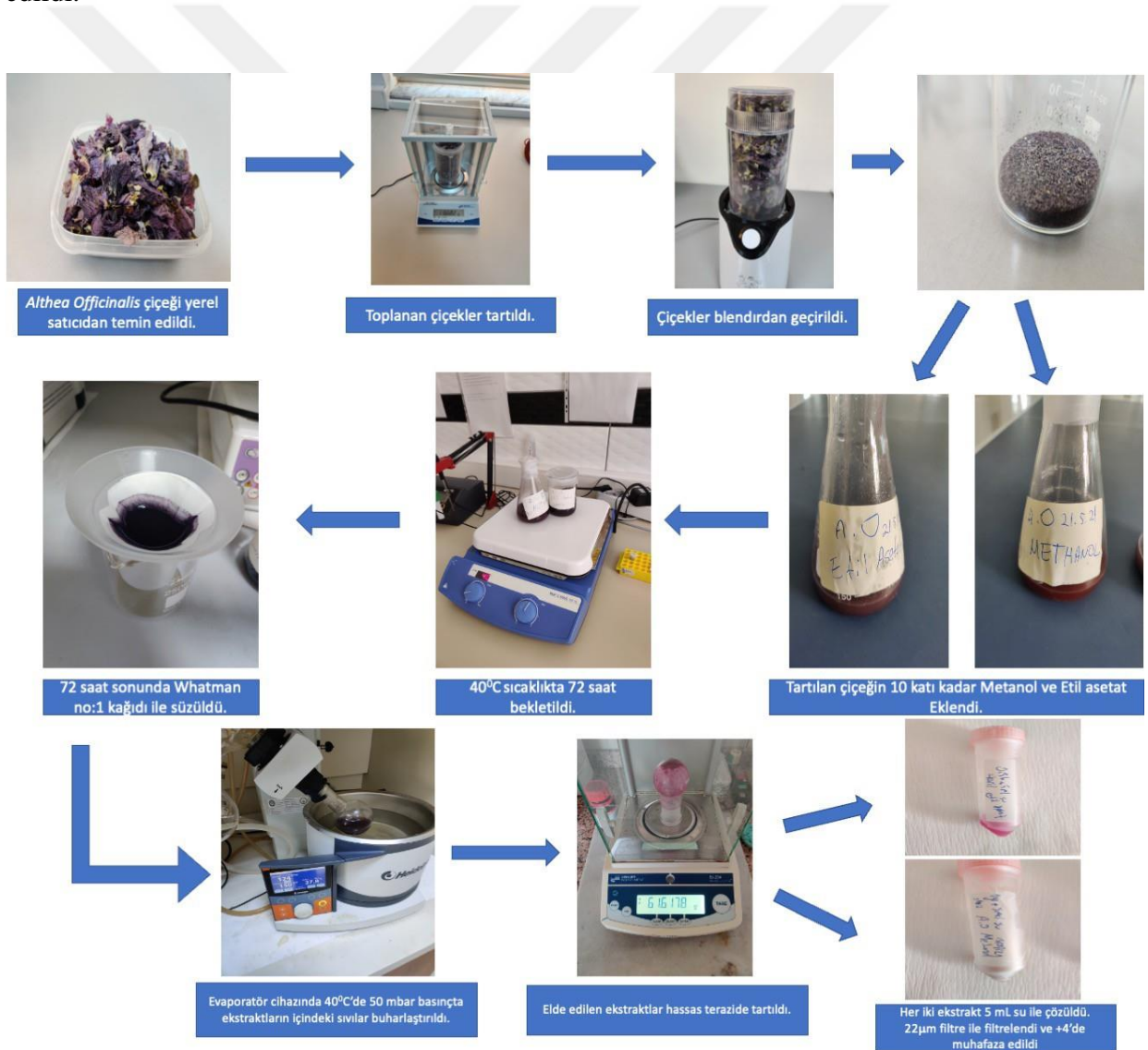
4- Her iki karışım Macherey-Nagel (125mm) filtre kâğıdı yardımıyla süzüldü.

5- Süzülen karışımlar evaporatör cihazı (Heidolph, Almanya) ile 50 mbar da 40°C sıcaklıkta içindeki sıvılar buharlaştırıldı.

6- Elde edilen maddeler tartıldı ve su ile çözüldü.

7- Çözölmüş ekstraktlar -20°C'de muhafaza edildi.

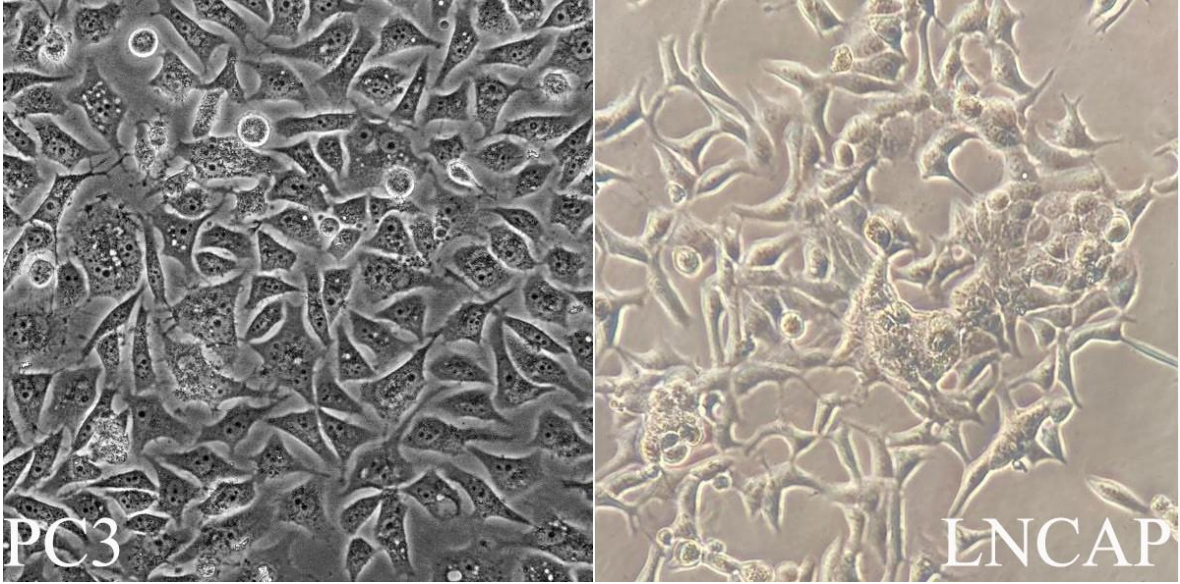
Metanol ile muamele edilen 15 gram çiçek tozundan 2gram ekstrakt elde edildi ve 5 mL su ile çözüldü. Etil Asetat ile muamele edilen 15 gram çiçek tozundan 1,12 gram ekstrakt elde edildi.



Şekil 2.2:Ekstrakt hazırlama özet şema

2.2.2 Hücre Kültürü

ATCC'den temin edilen insan prostat kanseri hücre hattı olan PC3 ve İnsan androjene duyarlı prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücreleri çalışmada kullanıldı. Hücreler -80 °C derin dondurucuda saklandı. FCS 55 °C'de bir saat boyunca inaktive edildi, 22 µm'lik bir filtreden geçirildi, -20 °C'de saklandı ve gerektiğinde kullanıldı. PC3 hücre hattı F12 (Gibco, Almanya) besiyerine %10 FCS (Fetal Calf Serum) eklenerek 50 mL lik falkon tüplerinde hazırlandı ve +4 °C'de saklandı. LNCaP hücre hattı RPMI (Gibco, Almanya) besiyerine %10 FCS eklenerek 50 mL lik falkon tüplerinde hazırlandı ve +4 °C' de saklandı.



Şekil 2.3: PC3 ve LNCaP hücre hatlarının 100 µm skalada görüntüsü

2.2.3 Prostat Kanseri Hücrelerin -80 °C'den Alınıp Açılması

-80 °C'den alınan prostat kanseri hücre hatları önce 37 °C'de çözündü. Daha sonra 15 mL'lik falkon tüplerine alındı. Tüplerin içine 5 mL besiyeri koyuldu. 1000 rpmde 5 dakika santrifüj edildi. Üste kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletine göre 25 cm²'lik ya da 75 cm²'lik flasklara aktarıldı.

2.2.4 Prostat Kanseri Hücrelerinin Büyütülmesi

Prostat kanseri hücreleri hücre peletine göre 25 cm² veya 75 cm²'lik flasklara alındıktan sonra 25 cm² flask için 5 mL, 75 cm² flask için 15 mL son hacim olacak şekilde PC3 hücre hattı için F12 besiyerine %10 FCS eklenip 37 °C de %5 CO² koşullarında etüvde büyümeye bırakıldı. LNCaP hücre hattı için RPMI besiyerine %10 FCS eklenip aynı şekilde 37⁰C de %5 CO² koşullarında etüvde büyümeye bırakıldı. Haftada 2 pasaj yapılacak şekilde hücreler çoğaltıldı.

2.2.5 Prostat Kanseri Hücrelerinin Pasajlanması

25 cm² veya 75 cm²'lik flaskları %90 hücreler doldurduğu zaman pasajlama işlemine geçilir. Pasajlamaya hazır prostat kanseri hücre hatlarında önce flask içindeki besiyeri tamamen içinden çekildi. Flaskı temizlemek için PBS kullanılır. 25 cm² flask için 2 mL 75 cm² flask için 5 mL PBS kullanılır ve işlem 2 kere tekrar edildi. Hücreleri yüzeyden kaldırmak için Tripsin-EDTA kullanıldı. 25 cm² flask için 1 mL 75 cm² flask için 3 mL Tripsin-EDTA kullanılır ve 2 dakika etüvde hücrelerin kalkması için beklenir. Süre sonunda Tripsin-EDTA'yı inaktive etmek için kullanılan Tripsin-EDTA'nın iki katı hacim olacak şekilde besiyeri eklendi. Flaskların içerisindeki bütün sıvılar 15 mL'lik falkon tüplerine aktararak 5 dakika 1000 rpmde santrifüj edildi. Üste kalan süpernatant uzaklaştırılır ve pelete göre 2 flaska veya daha fazla sayıda flaska aktarıldı.

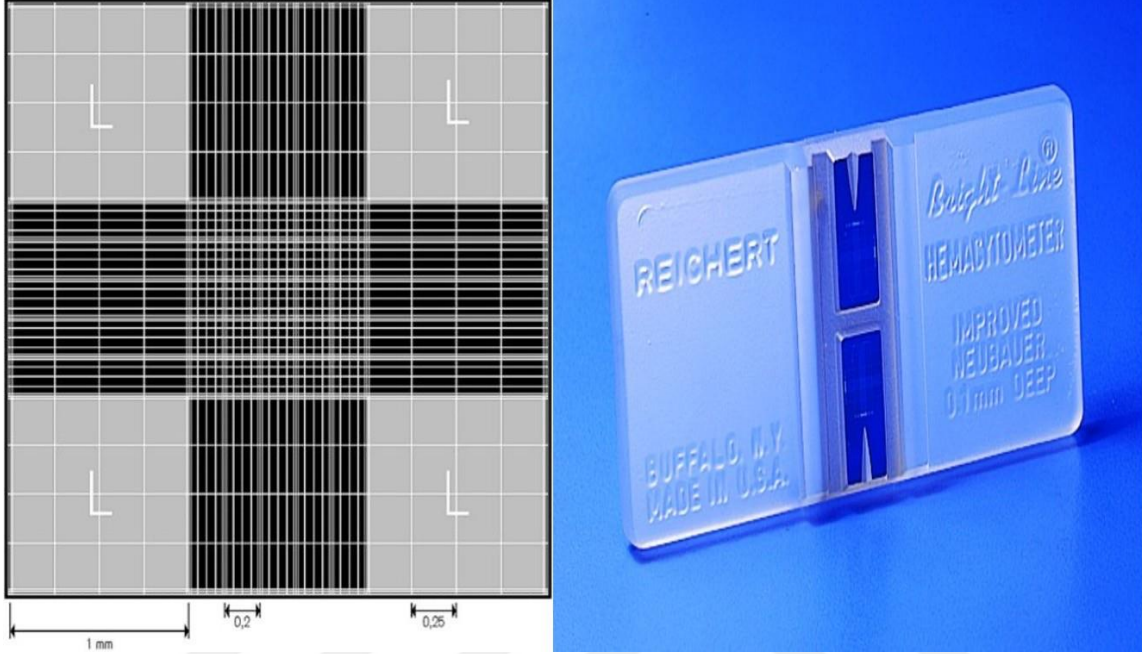
2.2.6 Prostat Kanseri Hücre Hatlarının Sayılması

Prostat kanseri hücre hatları Neubauer lamı ile sayıldı. Neubauer lamını oluşturan 25 karelik alan 1 mm² alana ve 0.1 mm² derinliğe sahiptir.

15 mL'lik falkon tüpünde olan besiyerin içinde homojen bir şekilde karışmış olan hücreler 10 µL hacimde ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf tüpüne aktarılan hücre besiyeri karışımının içine 10 µL triptan mavisi boyası eklendi ve karıştırıldı. Neubauer lamı üzerine koyulan lamın altına gelecek şekilde 10 µl karışım eklendi ve bu sayım 3 defa tekrarlandı. Maviye boyanan hücreler ölü kabul edildi ve ona göre sayım yapıldı.

25 karelik alanda olan hücre sayısına göre 1 mL'deki hücre sayısı aşağıdaki formülle belirlendi.

Hücre sayısı ortalaması $\times 2 \times 10^3 = 1$ mL hacimdeki canlı hücre sayısı



Şekil 2.4: Neubauer lamı (‘Bright-Line™ Hemacytometer supplied with two cover slips | Sigma-Aldrich’, t.y.)

2.2.7 Kanser Hücre Hatlarının Dondurulması

Prostat kanseri hücre hatları 75 cm²'lik flaskları %90 hücre ile doldurduğu zaman içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 2 defa PBS ile yıkanır. 3 mL Tripsin-EDTA flaskın içine aktarılır. 2 dakika etüvde bekletilir. Süre sonunda içerisinde 6 mL besiyeri eklendi. Flaskın içerisindeki besiyerili karışım 15 mL'lik falcon tüpüne aktarılır. 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Üste kalan süpernatant uzaklaştırılır. 15 mL'lik falcon tüpüne %90 FCS %10 DMSO olacak şekilde kimyasallar aktarıldı. Homojen olana kadar pastör pipeti ile karıştırıldı. Oluşan karışım Cryon tüplerine aktarılır. Cryon tüpleri -80 °C'de saklandı.

2.2.8 Poliferasyon Deneyi (MTT Testi)

MTT testi, suda çözünen sarı boya MTT'nin [3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromürü] mitokondriyal redüktaz etkisiyle çözünmeyen mor bir

formazan'a dönüştürülmesini içerir. Formazan daha sonra çözülür. Bu çözülme hücre canlılığını ve sitotoksititeyi göstermektedir ve 550 nm'de optik yoğunlukla belirlenir (Kumar, Nagarajan ve Uchil, 2018). Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT testi kullanıldı. PC3 ve LNCaP hücre hatlarında *Althaea officinalis* L. çiçeğinden elde ettiğimiz Metanol ve Etil Asetat ekstraktları farklı dozlarda uygulandı. 96 kuyucuklu plakaya, her bir kuyucuğa 5000 hücre gelecek şekilde hücreler paylaştırıldı. Bir gece hücrelerin yüzeye yapışması için etüvde bekletildi. Bir sonraki gün yüzeye yapışmış olan PC3 hücreleri için *Althaea officinalis* L.'in Metanol ekstarktı için şu dozlar uygulandı $\mu\text{g/mL}$; $0,23 \cdot 10^{-3}$, $1,3 \cdot 10^{-3}$, $2,7 \cdot 10^{-3}$, $5,4 \cdot 10^{-3}$, $10 \cdot 10^{-3}$, $13 \cdot 10^{-3}$, $20 \cdot 10^{-3}$, $27 \cdot 10^{-3}$ ve $34 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. *Althaea officinalis* L.'in Etil asetat ekstraktı için dozlar şu şekildedir; $0,28 \cdot 10^{-3}$, $0,56 \cdot 10^{-3}$, $1,12 \cdot 10^{-3}$, $2,24 \cdot 10^{-3}$, $4,48 \cdot 10^{-3}$, $5,6 \cdot 10^{-3}$, $8,4 \cdot 10^{-3}$, $11,2 \cdot 10^{-3}$, $14 \cdot 10^{-3}$ ve $28 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. LNCaP prostat hücre hattı için *Althaea officinalis* L.'in Metanol ekstarktı uygulanan dozlar şu şekildedir; $0,5 \cdot 10^{-3}$, $0,75 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ $1,5 \cdot 10^{-3}$ ve $1,75 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir. *Althaea officinalis* L.'in Etil asetat ekstraktı için dozlar şu şekildedir; $6,25 \cdot 10^{-3}$, $12,5 \cdot 10^{-3}$, $25 \cdot 10^{-3}$, $50 \cdot 10^{-3}$ ve $62,5 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ 'dir.

2.2.9 Yara İyileşme Deneyi

LNCaP ve PC3 hücreleri kuyu başına 5×10^5 hücre olacak şekilde iki adet 12 kuyu plakasına ekildi ve bir gece inkübe edildi. Maksimum 200 μL kapasiteli pipet ucu ile her kuyuya çizikler çizildi ve hücrelerin durumu 0, 24 ve 48. saatlerde *Althaea officinalis* L.'in Metanol ve *Althaea officinalis* L.'in Etil Asetat ekstraktlarının IC_{50} dozları uygulandıktan sonra, 0, 24 ve 48. saatler fotoğraflandı ve fotoğraflar ImageJ programı ile düzenlendi. Daha sonra Minitab 14 programı ile tek yönlü ANOVA analizi yapıldı. Kontrol grubuna madde eklenmedi. İstila yeteneği % alan ve % doluluk oranları belirlenerek ölçüldü.

2.2.10 RNA Seviyesinde Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi İçin Hücrelerin Elde Edilmesi

LNCaP ve PC3 hücrelerin RNA izolasyonu için 25 cm^2 flasklara 1×10^6 hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Hazırlanan flasklardaki hücreler bir gece yüzeye tutunmaları için bekletildi. Diğer gün 24 saatlik IC_{50} değeri her iki ekstrakt içinde uygulandı. Kontrol grubuna hiçbir madde uygulanmadı. 24 saat sonunda hücreler kaldırıldı ve pelletler $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de dondurucuya muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

2.2.11 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Thermo Scientific™ GeneJET RNA purification Kitine göre yapıldı. RNA kitinin basamakları şu şekildedir;

1. Yüzeye yapışan hücreler için: medyumunu uzaklaştırın PBS ile yıka medyum kalıntılarından arındırın. PBS ekle 5 dakika 250 g de santrifüj et süpernatantı atın.
2. 600 µl lizis buffer için 20 µl B-mercaptaethanol kullan 10 sn vortexle eğer numune yoğun ise 14000 rpmde 5 dakika santrifüj edin sonra kolon tüpüne ilave edin.
3. 360 µl %96'lık Etanol numuneye ilave edin. Pipetleyerek karıştırın.
4. 700 µl lizati RNA arıtma kolon tüplerine aktarın 12.000 rpmde 1 dakika santrifüj edin. Tüm lizati toplama kolonuna (altta kalan tüp) aktarana kadar santrifüjleyin sonra toplama tüpünü atın yeni toplama tüpü koyun.
5. 700 µl yıkama tamponu 1 (ethanol eklenmiş olacak) ekleyin 12.000 rpmde 1 dakika santrifüj edin toplama kolonunu atın yeni toplama kolonu koyun.
6. 600 µl yıkama tamponu 2 (ethanol eklenmiş) ekleyin. 12.000 rpmde 1 dakika santrifüj edin. Toplama kolonunu atın yeni koyun.
7. Arıtma kolonuna 250 µl yıkama tamponu 2 ekleyin. 12.000 rpmde 2 dakika santrifüj edin. Toplama tüpünü atın RNAaz içermeyen steril ependorf arıtma tüpünün altına koyun.
8. 100 µl RNAaz içermeyen su ekleyin 12.000 rpmde 1 dakika santrifüj edin.
9. RNA'yı kullanın ya da -80 °C'de saklayabilirsiniz.

2.2.12 Elde edilen RNA'ların ölçülmesi

Elde edilen RNA'lar Thermo Scientific NanoDrop cihazı ile konsantrasyon belirlendi. Cihaz önce kendi solüsyonu ile referans değeri belirlendi. RNA'lardan 1 µl alıp cihaza verildi ve ölçüm değeri kaydedildi.

2.2.13 cDNA Eldesi

Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Amerika Birleşik Devletleri) protolüne göre her bir hücre hattından toplam RNA (1µg, oligo(dT), primer (1µL), 20µL toplam hacim olacak şekilde RNase içermeyen su eklendi. Her bir hücre hattına gelecek şekilde 5X reaksiyon tamponu (4 µL), RNase inhibitörü (20U/µL, 1µL), 10mM dNTP (2 µL), RevertAid M-MuLV RT (200U/µl, 1 µL) ilave edildi. 3 dakika 94⁰C’de ve sonra 35 döngü olacak şekilde 94⁰C’de 30 saniye, 58⁰C’de 30 saniye ve 72⁰C 45 saniye olacak şekilde PCR kuruldu. Elde edilen cDNA -20⁰C’de saklandı. Gerçek zamanlı PCR için spesifik primerler kullanıldı.

Tablo 2.3: cDNA eldesi için PCR koşulları

Sıcaklık	Zaman	Döngü
94 ⁰ C	3 dakika	1 döngü
94 ⁰ C	30 saniye	35 döngü
58 ⁰ C	30 saniye	
72 ⁰ C	45 saniye	

2.2.14 Gerçek Zamanlı PCR Analizi

Gerçek zamanlı PCR'nin temel amacı, çok küçük bir miktar olsa bile bir numunedeki spesifik nükleik asit dizilerini kesin olarak ayırt etmek ve ölçmektir. Gerçek zamanlı PCR, bir numunedeki belirli bir hedef diziyi çoğaltır ve ardından floresan teknolojisini kullanarak amplifikasyon sürecini izler. Amplifikasyon sırasında, floresan sinyalinin bir eşik seviyesine ne kadar hızlı ulaştığı, orijinal hedef dizinin miktarı ile ilişkilidir ve böylece ölçmeyi mümkün kılar (Valasek ve Repa, 2005).

A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (with ROX, Türkiye) kitine göre Bcl-2, Bcl-xl, Bak, Bax, ve kontrol olarak Hβ-2 genleri primerleri ile şirketin protokolüne uygun yapılmıştır. Kısacası her bir örnekten 1 µL cDNA alındı. Her bir örneğe 10 µL RT-PCR 2X master mix, 10 µM Forward primer (1 µL), 10 µM Reverse primer (1 µL), su (RNase içermeyen, 7 µL) eklendi. Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Cihazı (Foster City,

CA, USA) ile 95⁰C’de 10 dakika sonra 40 döngü olacak şekilde 95⁰C’de 30 saniye, 60⁰C’de 20 saniye, 72⁰C’de 1 dakika olacak şekilde kuruldu. En son 72⁰C’de 5 dakika inkübe edildi. Gerçek zamanlı PCR sonuçları Livak metoduna göre değerlendirildi (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 2.4: Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu koşulları

Sıcaklık	Zaman	Döngü
95 ⁰ C	10 dakika	1 döngü
95 ⁰ C	30 saniye	30 döngü
60 ⁰ C	20 saniye	
72 ⁰ C	60 saniye	
72 ⁰ C	5 dakika	1 döngü

Tablo 2.5: Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Bad, H β -2 primerlerinin DNA dizileri

mRNA	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Bcl-2	CTGCACCTGACGCCCTTCACC	CACATGACCCCACCGAACTCAA AGA
Bcl-xL	GATCCCCATGGCAGCAGTAAAG CAAG	CCCCATCCCGGAAGAGTTCATC TACT
Bax	TTTGCTTCAGGGTTTCATC	TCCTCTGCAGCTCCATGTTA
Bak	ACCAGCCTGTTTGAGAGTGG	AGTGATGCAGCATGAAGTCG
H β -2	CCTGACTGACTACCTCATGAAG ATCCTC	CGTAGCACAGCTTCTCCTTAAT GTCAC

2.2.15 HPLC Analizi

Bir HPLC sisteminde dedektör, fiziksel veya kimyasal bir özelliği, konsantrasyon veya özdeşliğe karşılık gelen ölçülebilir bir sinyale dönüştürmekten sorumlu bileşendir (Swartz, 2010). Diğer analitik tahlillerle karşılaştırıldığında, uygun bir HPLC yönteminin geliştirilmesi nispeten basittir. Çalışılan maddelerin, yani ana ilaç ve seçilen farmakolojik

olarak aktif metabolitlerin, kullanılan iç standardın ve izlenen endojenlerin piklerinin yüksek çözünürlüğüne izin veren deneysel koşullar oluşturulacaktır (Šoltés, 1989).

Balıkesir Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma merkezi tarafından *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ve Etil Asetat ekstraktlarının HPLC analizi yapılmıştır.

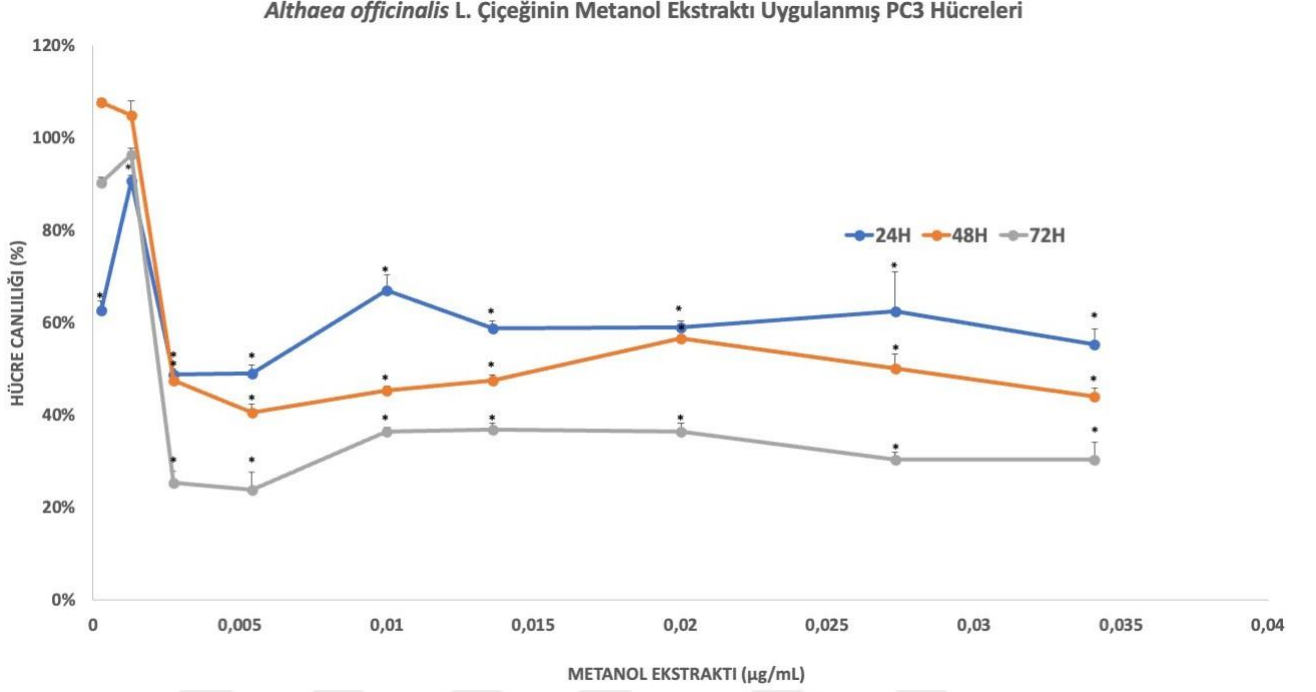
2.2.16 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme MTT testi, mRNA ve yara iyileşme deneyi için Minitab 14 programı kullanılarak yapıldı. MTT testi için UV Spektro ile alınan sayısal verilerin ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı ve ANOVA oneway analizi kullanılarak kontrol hücreleri ile karşılaştırıldı. $p \leq 0.05$ anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

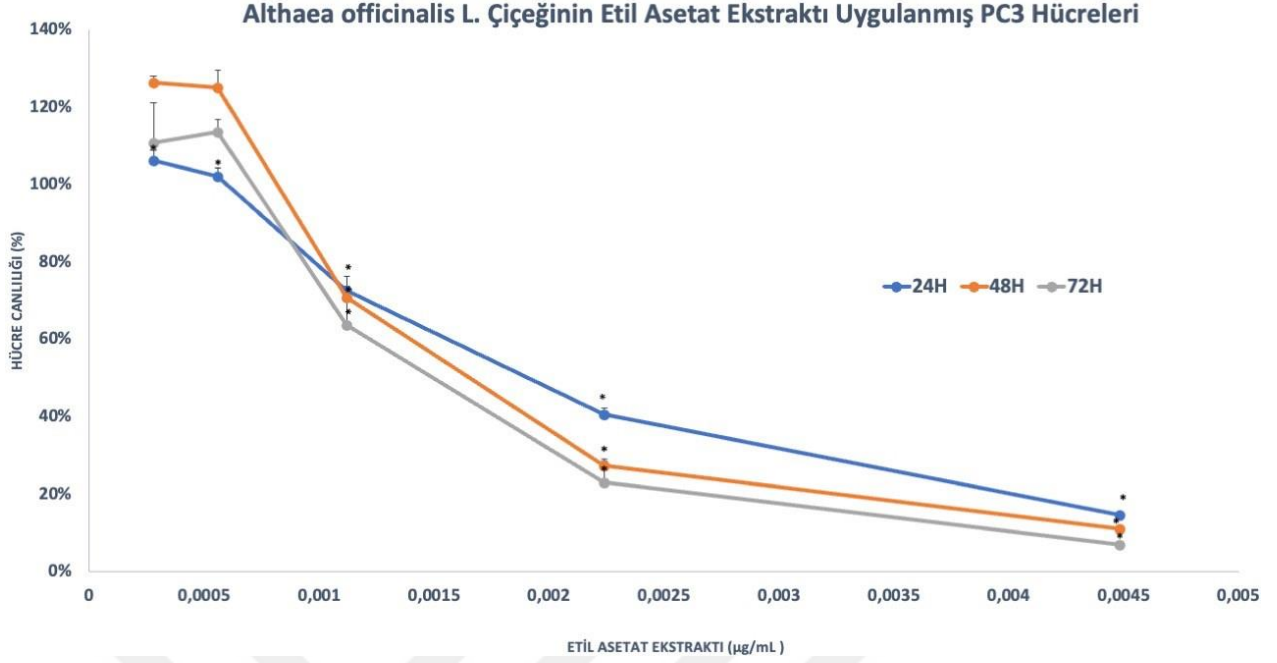
3.1 MTT Sonuçları

3.1.1 PC3 Hücre Hattının MTT Sonuçları



Şekil 3.1: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ekstraktının PC3 hücre hattına uygulanmış sitotoksosite değerleridir.

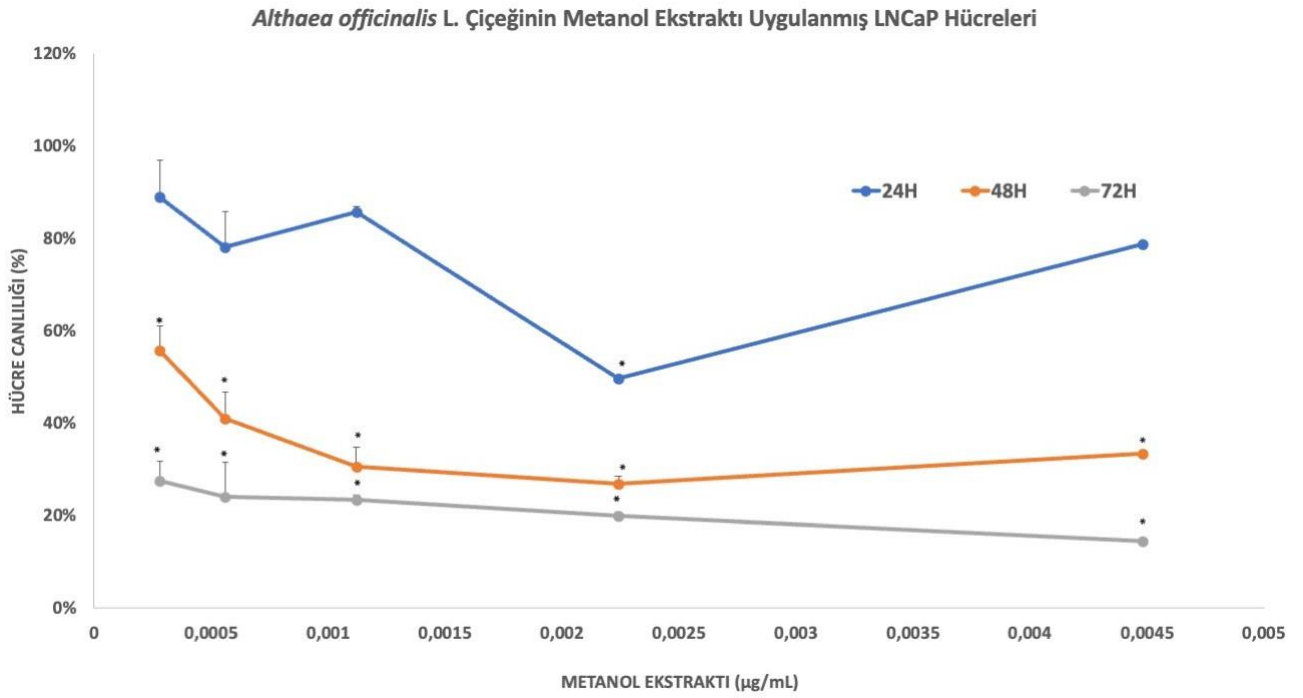
(Şekil 3.1) Kontrol grupları, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücreler hiçbir madde uygulanmamış kontrol gruplarını temsil etmektedir. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. PC3 prostat kanseri hücre hattı 24 saat için *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ekstraktının IC_{50} değeri $2,75 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 48 saat için IC_{50} değeri $2,87 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 72 saat için IC_{50} değeri $5,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.2: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Etil Asetat ekstraktının PC3 hücre hattına uygulanmış sitotoksosite değerleridir.

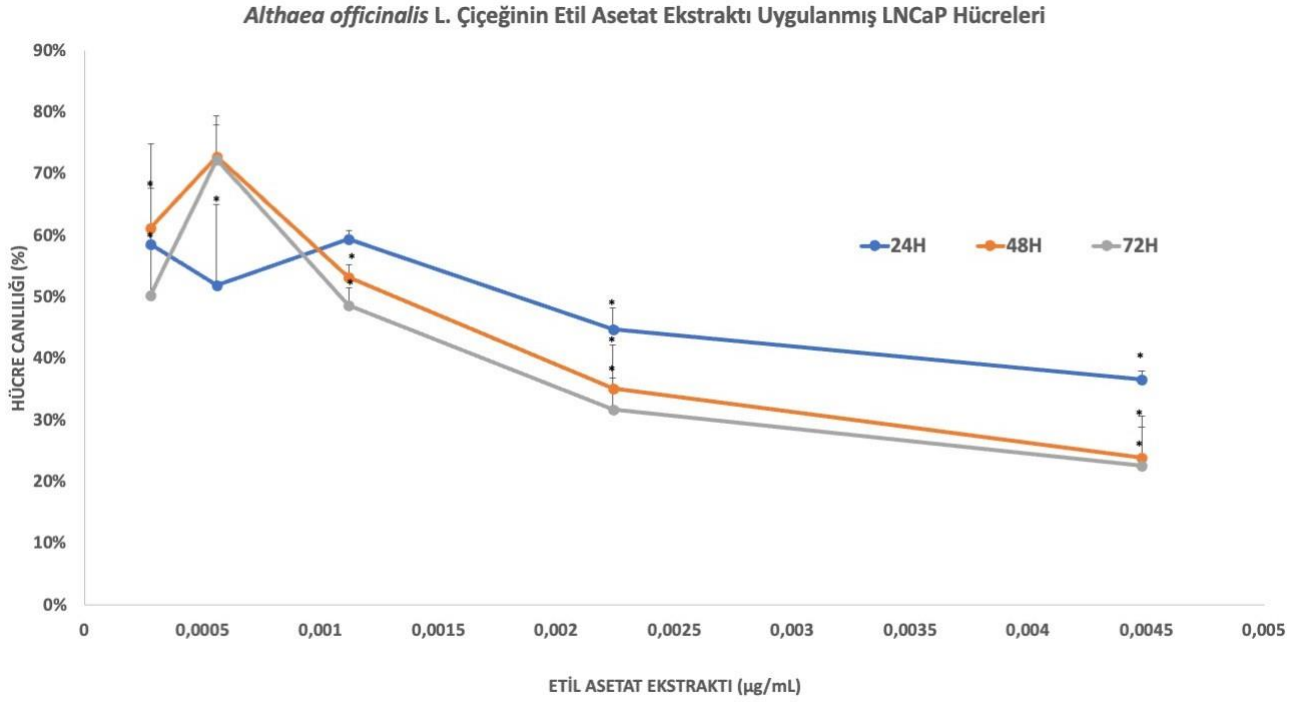
(Şekil 3.2) Kontrol grupları, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücreler hiçbir madde uygulanmamış kontrol gruplarını temsil etmektedir. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. PC3 prostat kanseri hücre hattı 24 saat için *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Etil Asetat ekstraktının IC_{50} değeri $2,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 48 saat için IC_{50} değeri $4,14 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 72 saat için IC_{50} değeri $4,86 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

3.1.2 LNCaP Hücre Hattının MTT Sonuçları



Şekil 3.3: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve Metanol ekstraktı LNCaP hücre hattına uygulanmış sitotoksosite değerleridir.

(Şekil 3.3) $0,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, $0,75 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, $1,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ ve $1,75 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ LNCaP insan prostat karsinoma kanser hücre hattına uygulanmış sitotoksosite değerleri. Kontrol grupları, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücreler hiçbir madde uygulanmamış kontrol gruplarını temsil etmektedir. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. LNCaP prostat kanseri hücre hattı 24 saat için *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ekstraktının IC_{50} değeri $1,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 48 saat için IC_{50} değeri $2,88 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 72 saat için IC_{50} değeri $3,75 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

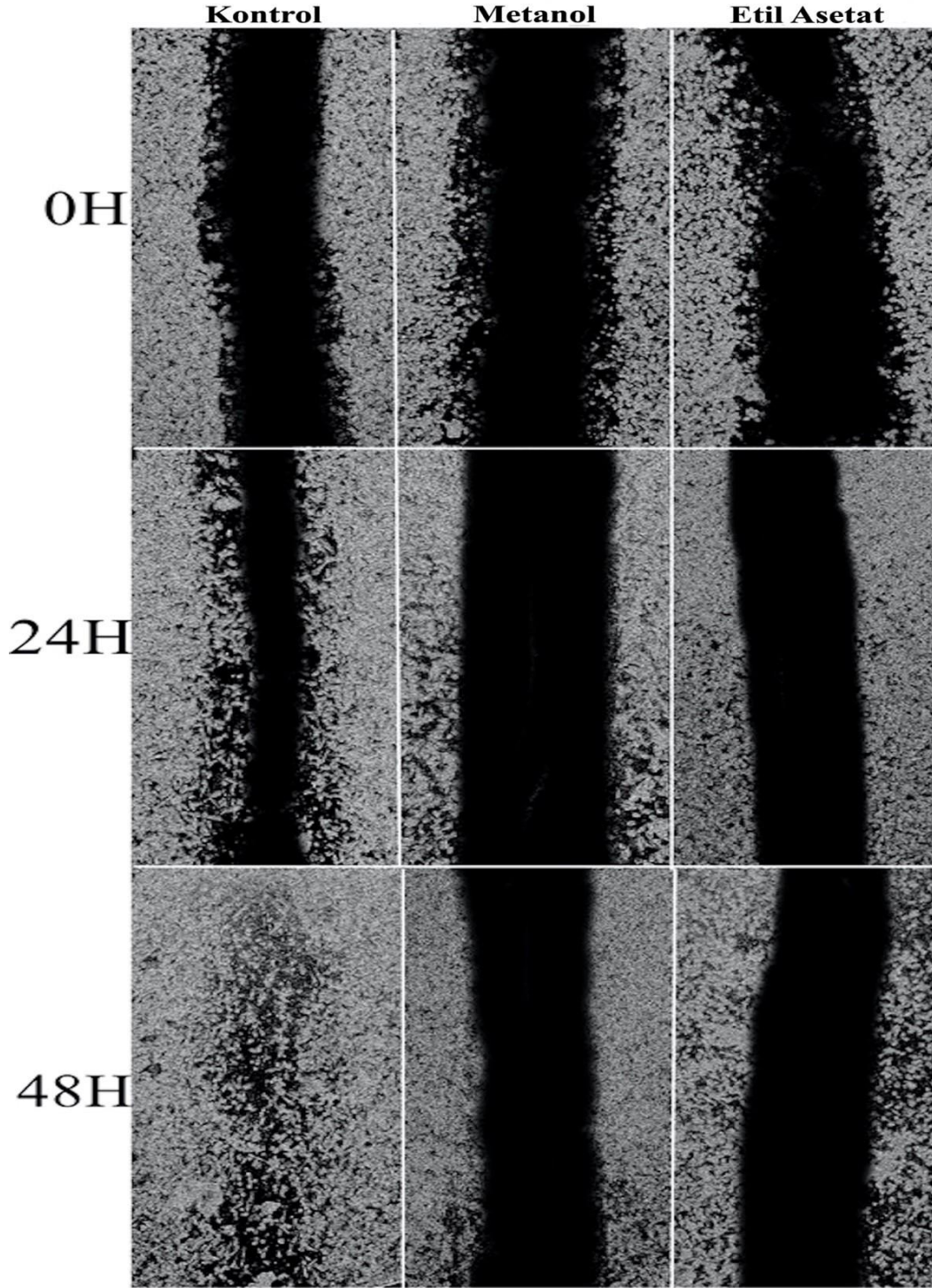


Şekil 3.4: 24,48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve Etil Asetat ekstraktının LNCaP hücre hattına uygulanmış sitotoksosite değerleridir.

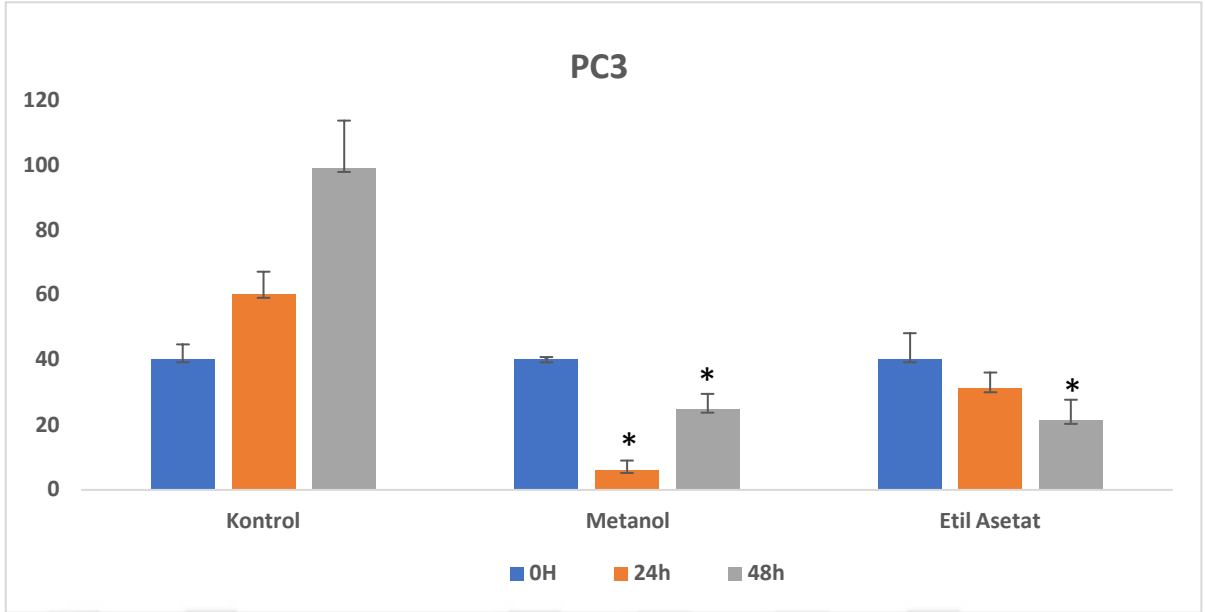
(Şekil 3.4) $6,25 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ $12,5 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ $25 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ $50 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ ve $62,5 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ LNCaP insan prostat kansinoma kanser hücre hattına uygulanmış sitotoksosite değerleridir. Kontrol grupları, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücreler hiçbir madde uygulanmamış kontrol gruplarını temsil etmektedir. * $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerlerdir. LNCaP prostat kanseri hücre hattı 24 saat için *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Etil Asetat ekstraktının IC_{50} değeri $2,11 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 48 saat için IC_{50} değeri $2,35 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, 72 saat için IC_{50} değeri $2,6 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

3.2 Yara İyileşme Deneyi Sonuçları

3.2.1 PC3 Hücre Hattının Yara İyileşme Deneyi Sonuçları



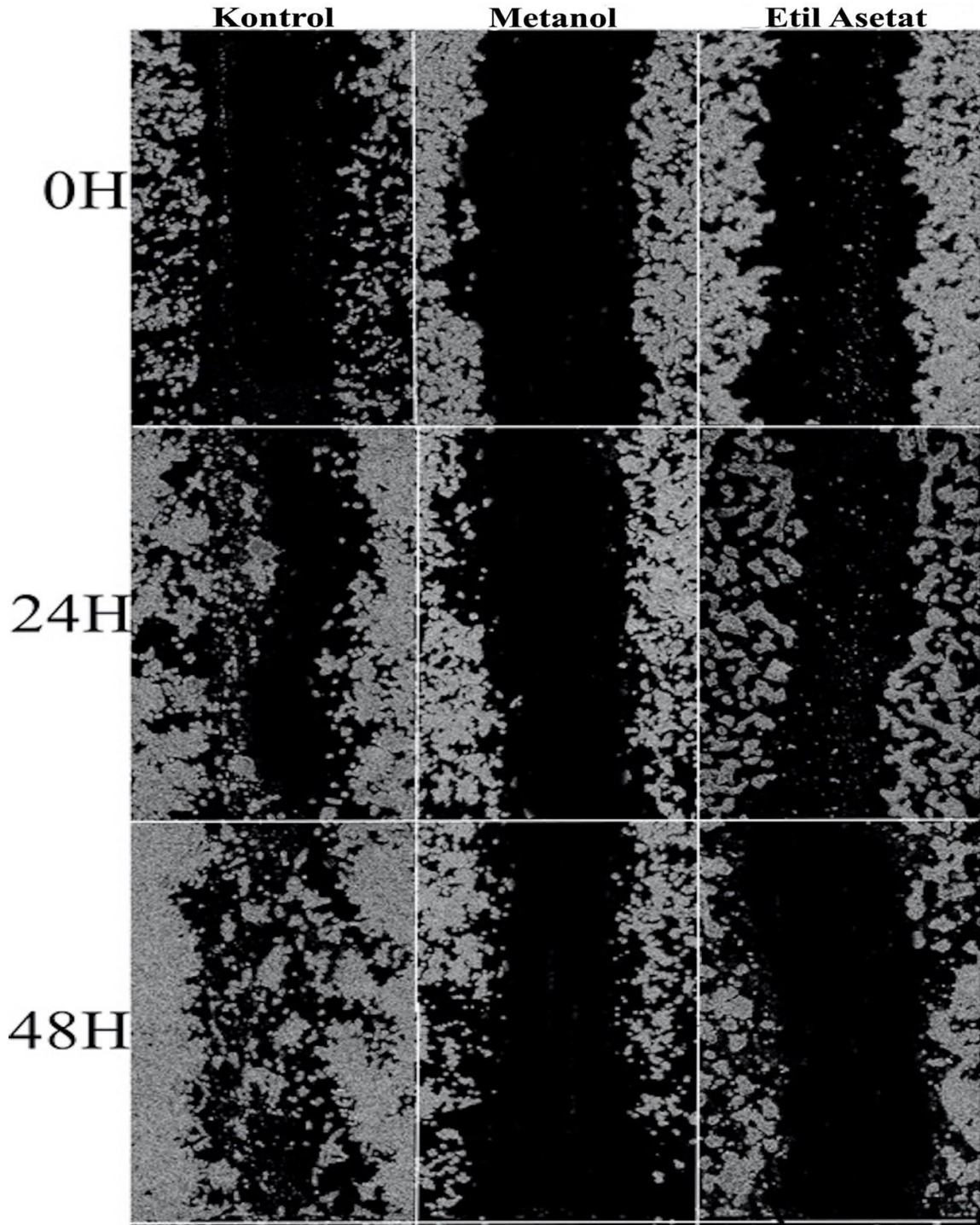
Şekil 3.5: PC3 hücre hattına uygulanan *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ve Etil Asetat ekstraktının yara iyileşme deneyi görüntüsü



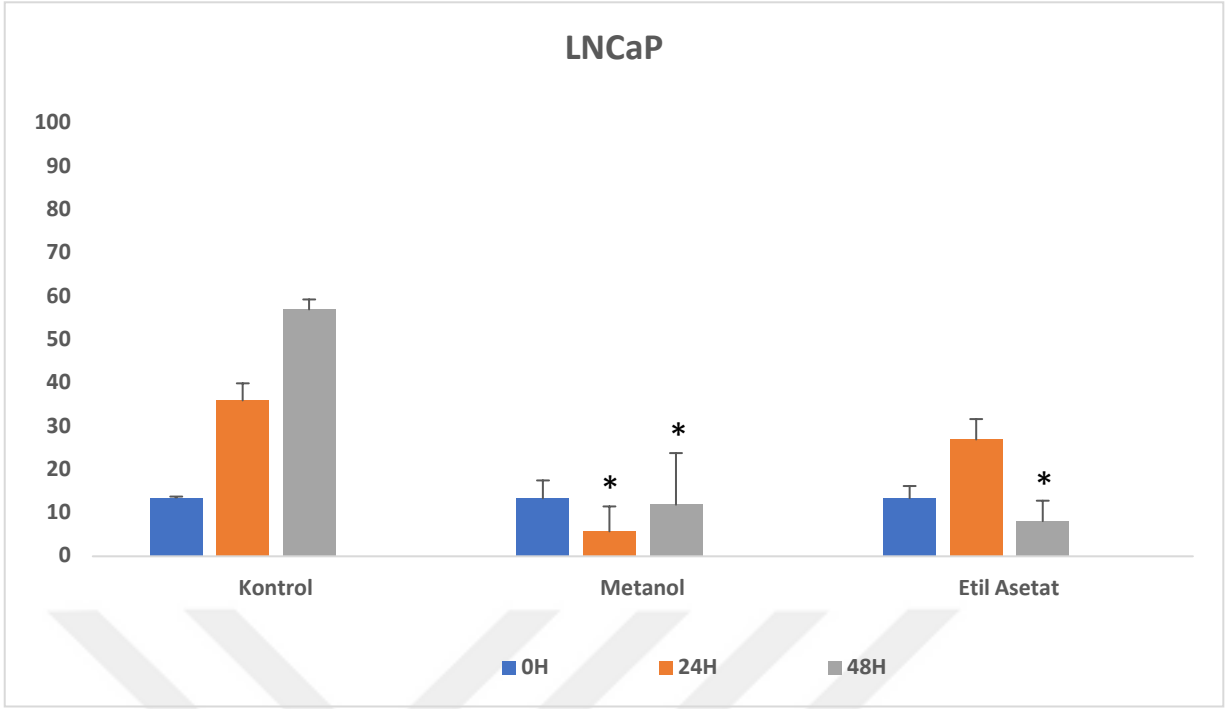
Şekil 3.6: PC3 hücre hattının Metanol ve Etil Asetat ekstraktların 0, 24 ve 48 saatlerde uygulanan IC₅₀ değerlerinin yara iyileşme deneyindeki istatistiksel analizidir.

(Şekil 3.6) Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmamıştır. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir PC3 hücre hattında yara iyileşme deneyinde kullandığımız sitotoksik değerlerde ise Metanol ekstraktının 24 saatte kontrol grubuna göre %90 hücre göçünü azaltmıştır. 48 saatte ise %75 oranında hücre göçünü azaltmıştır. Etil Asetat ekstraktında ise 24 saatte anlamlı değer bulunamamıştır. 48 saatte ise %78,48 oranında hücre göçünü azaltmıştır.

3.2.2 LNCaP Hücre Hattının Yara İyileşme Deneyi Sonuçları



Şekil 3.7: LNCaP hücre hattına uygulanan *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ve Etil Asetat ekstraktının yara iyileşme deneyi görüntüsü

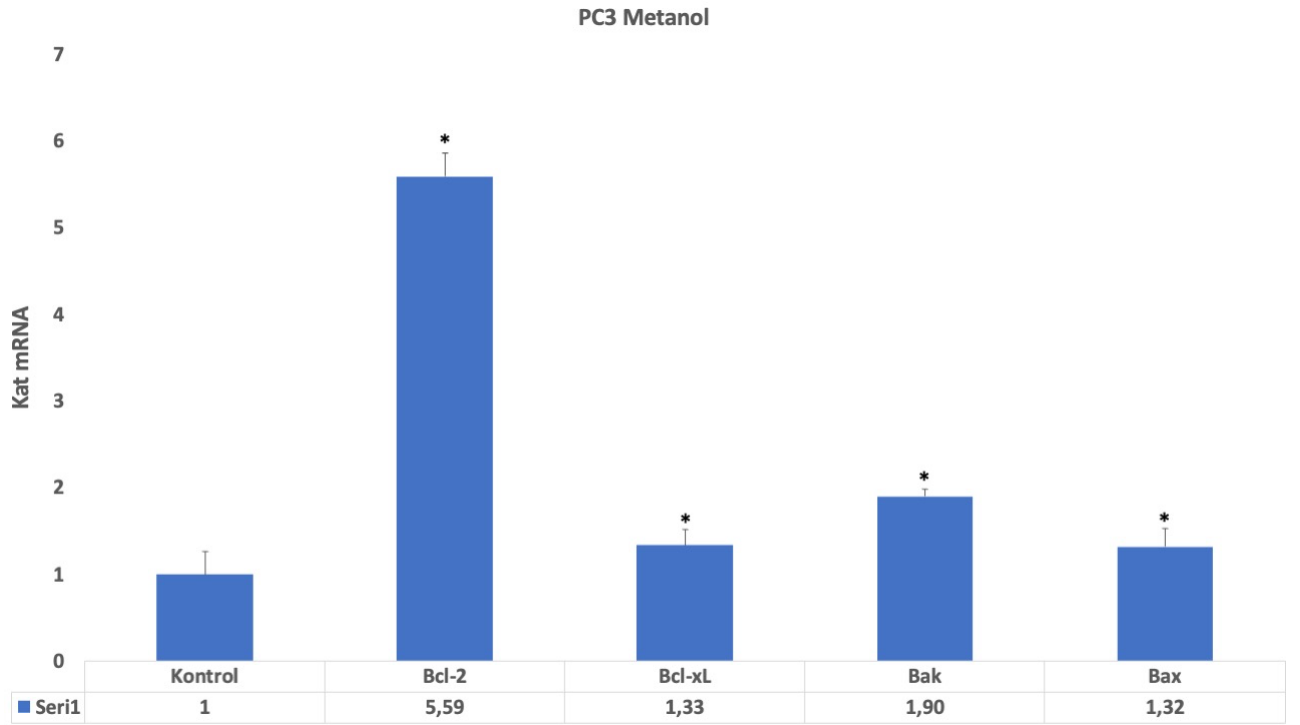


Şekil 3.8: LNCaP hücre hattının Metanol ve Etil Asetat ekstraktların 0, 24 ve 48 saatlerde uygulanan IC₅₀ değerlerinin yara iyileşme deneyindeki istatistiksel analizidir.

(Şekil 3.8) Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulanmamıştır. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. LNCaP hücre hattına Metanol ekstraktı IC₅₀ değeri uygulandı ve 24 saatte kontrol grubuna göre %85,72 oranında hücre göçünü azaltmıştır. 48 saatte ise kontrol grubuna göre Metanol ekstraktı %80,71 oranında hücre göçünü azaltmıştır. Etil asetat ekstraktı ise sadece 48 saatte anlamlı değere ulaşmıştır. 48 saatte kontrol grubuna göre %86 oranında hücre göçünü azaltmıştır.

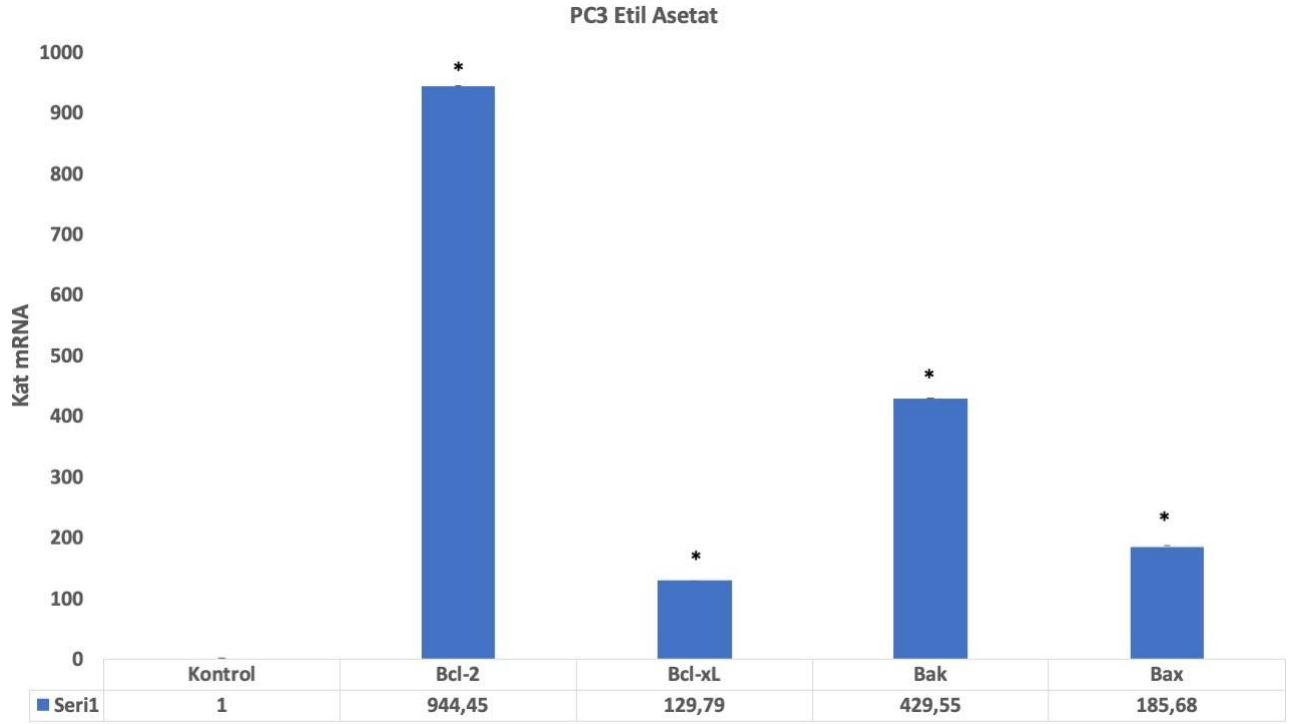
3.3 Real-Time PCR Sonuçları

3.3.1 PC3 Hücre Hattının Real-Time PCR Sonuçları



Şekil 3.9: PC3 Prostat kanseri hücre hattının *Althaea officinalis* L. çiçeğinin 24 saatte Metanol ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.

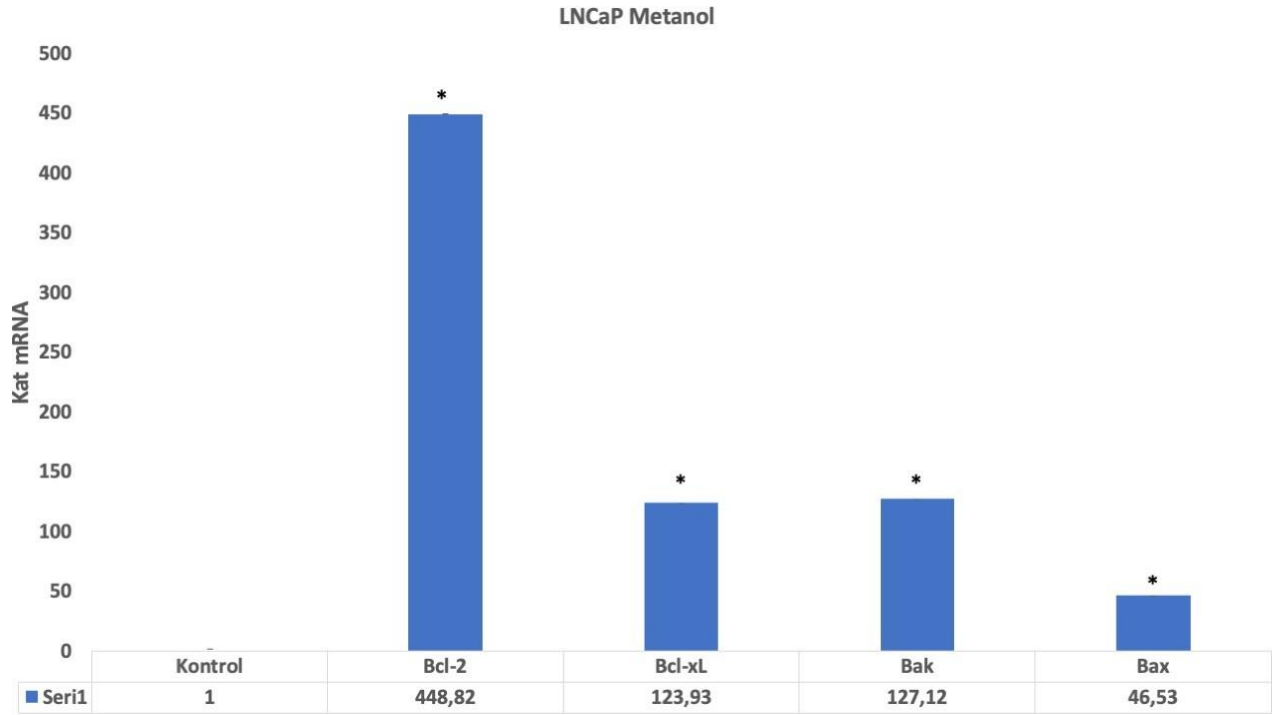
(Şekil 3.9) H β -2 kontrol genine göre, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin ifadesi gösterilmiştir. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ekstraktının 24 saatte IC₅₀ değeri uygulanmış olan PC3 hücre hattının, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin mRNA seviyesinde etkileri gösterilmiştir (Şekil 3.9). QRT-PCR analizi sonuçlarını kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu Metanol ekstraktının Bcl-2 geni 5,59 kat, Bcl-xL geni 1,33 kat , Bak geni 1,9 kat ve Bax geni 1,32 kat ekspresyon artışı olmuştur.



Şekil 3.10: PC3 Prostat kanseri hücre hattının *Althaea officinalis* L. çiçeğinin 24 saatte Etil Asetat ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.

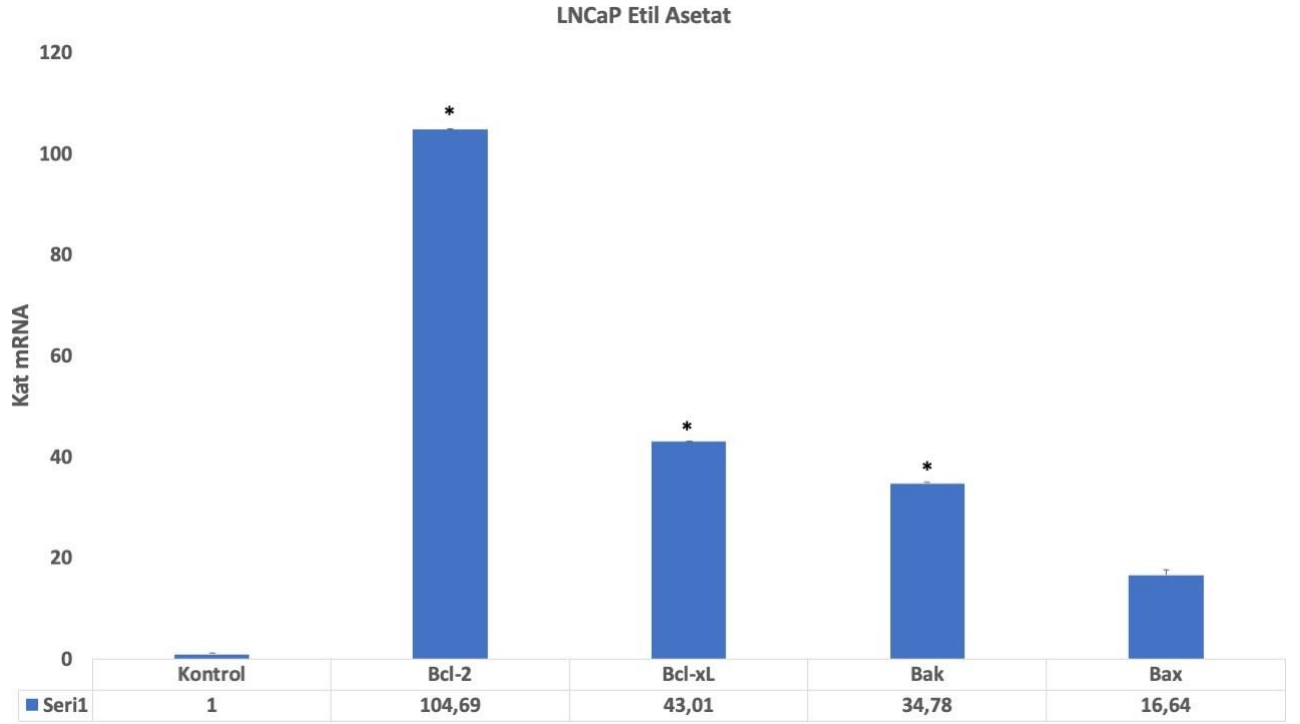
(Şekil 3.10) H β -2 kontrol genine göre, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin ifadesi gösterilmiştir. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Etil Asetat ekstraktının 24 saatte IC₅₀ değeri uygulanmış olan PC3 hücre hattının, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin mRNA seviyesinde etkileri gösterilmiştir (Şekil 3.10). QRT-PCR analizi sonuçlarını kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu Etil asetat ekstraktının Bcl-2 geni 944,45 kat, Bcl-xL geni 129,79 kat , Bak geni 429,55 kat ve Bax geni 185,68 kat ekspresyon artışı olmuştur.

3.3.2 LNCaP Hücre Hattının Real-Time PCR Sonuçları



Şekil 3.11: LNCaP Prostat kanseri hücre hattının *Althaea officinalis* L. çiçeğinin 24 saatte Metanol ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.

(Şekil 3.11) H β -2 kontrol genine göre, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin ifadesi gösterilmiştir. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ekstraktının 24 saatte IC₅₀ değeri uygulanmış olan LNCaP hücre hattının, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin mRNA seviyesinde etkileri gösterilmiştir (Şekil 3.11). QRT-PCR analizi sonuçlarını kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu Metanol ekstraktının Bcl-2 geni 448,82 kat, Bcl-xL geni 123,93 kat , Bak geni 127,12 kat ve Bax geni 46,53 kat ekspresyon artışı olmuştur.

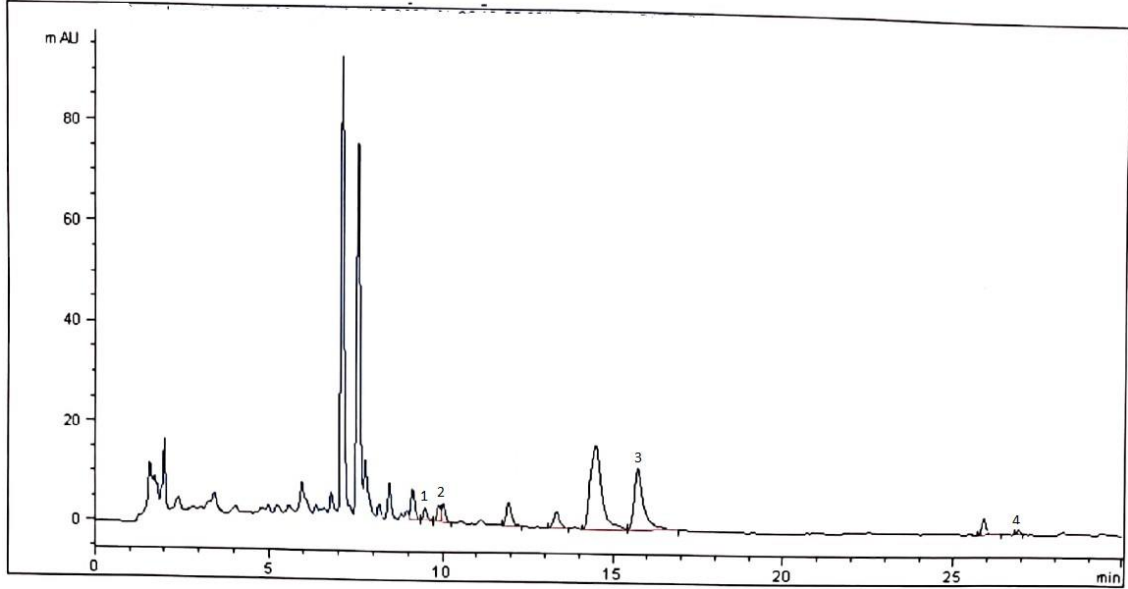


Şekil 3.12: LNCaP Prostat kanseri hücre hattının *Althaea officinalis* L. çiçeğinin 24 saatte Etil Asetat ekstraktı uygulanmış hücrelerin mRNA analizi sonuçlarıdır.

(Şekil 3.12) H β -2 kontrol genine göre, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin ifadesi gösterilmiştir. * $p \leq 0.05$ 'in altında olan değerlerdir. *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Etil Asetat ekstraktının 24 saatte IC₅₀ değeri uygulanmış olan LNCaP hücre hattının, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax genlerinin mRNA seviyesinde etkileri gösterilmiştir (Şekil 3.12). QRT-PCR analizi sonuçlarını kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu Etil asetat ekstraktının Bcl-2 geni 104,69 kat, Bcl-xL geni 43,01 kat, Bak geni 34,78 kat ve Bax geni 16,64 kat ekspresyon artışı olmuştur.

3.4 HPLC Analizi Sonuçları

3.4.1 *Althaea officinalis* L. Çiçeğinin Metanol Ekstraktının HPLC Analizi Sonuçları



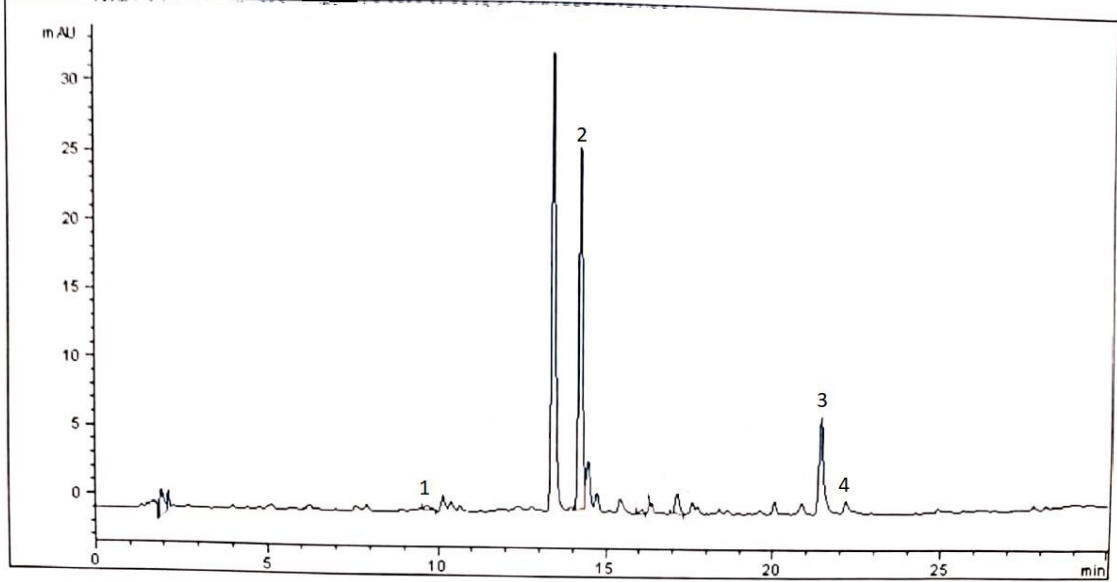
Şekil 3.13: *Althaea officinalis* L. bitkisinin Metanol ekstraktının HPLC analizi sonucu a) 1 numara vanilik asidi b) 2 numara kaffeik asidi c) 3 numara ferulik asidi d) 4 numara quersetini göstermektedir.

Tablo 3.1: *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Metanol ekstraktının HPLC analizi sonucu tespit edilen moleküllerin gelme zamanı, miktarı ve moleküllerin isimleri

Gelme zamanı(dakika)	Miktar(ng/μl)	Molekülün ismi
9,502	4,84	vanilik asid
9,902	4,19	caffeik asid
15,710	38,7	ferulik asid
26,919	6,99	quersetin

3.4.2 *Althaea officinalis* L. Çiçeğinin Etil Asetat Ekstraktının HPLC Analizi

Sonuçları



Şekil 3.14: *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Etil asetat ekstraktının HPLC analizi sonucu a) 1 numara vanilik asidi b) 2 numara p-kumarik asidi c) 3 numara ferulik asidi d) 4 numara rutin hidratı göstermektedir.

Tablo 3.2: *Althaea officinalis* L. çiçeğinin Etil Asetat ekstraktının HPLC analizi sonucu tespit edilen moleküllerin gelme zamanı, miktarı ve moleküllerin isimleri

Gelme zamanı(dakika)	Miktar(ng/µl)	Molekülün ismi
9,665	0,989	Vanilik asid
14,227	23,14	p-kumarik asid
16,085	0,404	Ferulik asid
17,129	8,6	Rutin hidrat

3.5 Bütün Bulguların Özet Şeması

	PC3	LNCaP			
MTT Sonuçları Metanol Ekstraktı					
24 saat	2,75.10 ⁻³ µg/mL IC ₅₀ değeri	1,5.10 ⁻³ µg/mL IC ₅₀ değeri			
48 saat	2,87.10 ⁻³ µg/mL IC ₅₀ değeri	2,88.10 ⁻³ µg/mL IC ₅₀ değeri			
72 saat	5,4.10 ⁻³ µg/mL IC ₅₀ değeri	3,75.10 ⁻³ µg/mL IC ₅₀ değeri			
MTT Sonuçları Etil Asetat Ekstraktı					
24 saat	2,8.10 ⁻³ µg/mL	2,11.10 ⁻³ µg/mL			
48 saat	4,14.10 ⁻³ µg/mL	2,35.10 ⁻³ µg/mL			
72 saat	4,86.10 ⁻³ µg/mL	2,6 .10 ⁻³ µg/mL			
Yara İyileşme Deneyi Metanol Ekstraktı					
24 saat	%90 hücre göçünü azaltmıştır.	%85,72 hücre göçünü azaltmıştır.			
48 saat	%75 hücre göçünü azaltmıştır.	%80,71 hücre göçünü azaltmıştır.			
Yara İyileşme Deneyi Etil Asetat Ekstraktı					
24 saat	%68,84 hücre göçünü azaltmıştır.	%75,05 hücre göçünü azaltmıştır .			
48 saat	%78,48 hücre göçünü azaltmıştır.	%86 hücre göçünü azaltmıştır.			
Real-time Analizi Metanol Ekstraktı					
Bcl-2	5,59 kat ↑	448,82 kat ↑			
Bcl-xL	1,33 kat ↑	123,93 kat ↑			
Bak	1,90 kat ↑	127,12 kat ↑			
Bax	1,32 kat ↑	46,53 kat ↑			
Real-time Analizi Etil Asetat Ekstraktı					
Bcl-2	944,45 kat ↑	104,69 kat ↑			
Bcl-xL	129,79 kat ↑	43,01 kat ↑			
Bak	429,95 kat ↑	34,78 kat ↑			
Bax	185,68 kat ↑	16,64 kat ↑			
HPLC analizi sonuçları					
Metanol Ekstarktı			Etil Asetat Ekstarktı		
Gelme zamanı(dakika)	Miktar(ng/µl)	Molekülün ismi	Gelme zamanı(dakika)	Miktar(ng/µl)	Molekülün ismi
9,502	4,84	Vanilik asid	9,665	0,989	Vanilik asid
9,902	4,19	Kaffeik asid	14,227	23,14	p-kumarik asid
15,710	38,7	Ferulik asid	16,085	0,404	Ferulik asid
26,919	6,99	Quersetin	17,129	8,6	Rutin hidrat

Şekil 3.15: Bütün Bulguların özet şeması

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

A. officinalis L. bitkisi yüksek oranda antioksidan içermesi nedeniyle potansiyel bir anti-tümör ajan olarak düşünülmektedir. Elmas Tas. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre *A. officinalis* L. etanol ekstraktı peroksidasyonu inhibe etmektedir. Öte yandan *A. officinalis* L. serbest oksijen radikalleri ve süper oksit anyonları ortadan kaldırma ve metal şelatlama aktivitelere sahiptir (Elmastas, Erenler, Demirtas ve Ozturk, 2003; Elmastas, Ozturk, Gokce, Erenler ve Aboul-Enein, 2004). *A. officinalis* L. çiçeğinin AOME ekstrakt içeriğinde flavonoid grubuna dahil olan A vitamini, Rutin, apigenin, isorhmetin, scopoletin, kumarinler ve Kaempferol maddelerinin olduğu bulunmuştur. Flavonoidler, kanser oluşumunun önlenmesinde etkilidir (Kobayashi, Nakata ve Kuzumaki, 2002)-(Shah ve diğerleri, t.y.). Açık renkli çiçeklerde flavonoid oranı yüksektir. Bu yüzden tıbbi açıdan kullanımı en uygun *A. officinalis* L. çiçeği açık renkli olanlardır (Sadighara, Gharibi, Jafari, Khaniki ve Salari, 2012). Bizim çalışmamızda hem mor hem de beyaz renkli çiçekler kullanılmıştır.

İnsan akciğer kanser hücre hattı olan A549 üzerinde yapılan hücre proliferasyonu deneylerinde *A. officinalis* L. bitkisi ekstraktlarının hücre çoğalması ve büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang, Kong, Zhang, Li ve Zhang, 2017). Bir başka çalışmada karaciğer kanseri hücre hattı olan Hep-2B'ye uygulanan *A. officinalis* L. ekstraktlarının yine canlılığı inhibe ettiği gösterilmiştir (Ciobanu ve diğerleri, 2019). Bizim çalışmamızda da LNCaP ve PC3 prostat kanser hücre hattında 24, 48 ve 72 saatlerde hücre canlılığını inhibe etmiştir.

Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972) Bcl-2 ailesinin genlerinin apoptozu düzenlediği bilinmektedir (Li ve diğerleri, 2001). Bcl-2 gen ailesinde anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve pro-apoptotik (Bax, Bad) genleri apoptoz olayını kontrol eder. Bu sebeplerden dolayı Bcl-2, Bcl-xL ve Bax, Bad genlerinin oranlarındaki değişiklik, hücrenin hayatta kalmasını ve ölümü için önemli bir göstergedir (Chaabane ve diğerleri, 2013; Elmore, 2007; Koff, Ramachandiran ve Bernal-Mizrachi, 2015). Bcl-2 ailesinin üyeleri olan Bax ve Bak, apoptoz yolunun mitokondriyal çekirdek düzenleyicileri olarak işlev görmektedirler (Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018). AOEE ve AOME LNCaP prostat kanseri hücre hattında Bcl-2, Bcl-xL ve Bak ve Bax genlerinin ifadelerine baktığımız zaman

anti-apoptotik genler olan Bcl-2 ve Bcl-xL ifadesi pro-apoptotik genler olan Bad ve Bax kontrol genine göre daha fazla ifade edildiği için LNCaP ve PC3 hücre hattında AOEE ve AOME apoptozu inhibe etmiştir.

PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarına baktığımız zaman AOEE ve AOME'nin Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin ifadesi Bak ve Bax genlerinin ifadelerine göre artış göstermiştir. Bu bilgilere göre PC3 ve LNCaP hücre hattına uygulanan ekstraktlar apoptozu inhibe etmiştir. LNCaP hücreleri androjen reseptörü (AR) ve prostat spesifik antijen (PSA) eksprese eder ve büyümeleri insan prostat adenokarsinomuna benzer şekilde androjen yoksunluğu ile inhibe edilir. PC3 hücreleri AR ve PSA'yı eksprese etmez ve çoğalmaları prostat küçük hücreli nöroendokrin karsinoma (SCNC) benzer şekilde androjenden bağımsızdır. Nöroendokrin markerler ve kök hücre ilişkili marker CD44 SCNC ve PC3 hücrelerinde pozitifken adenokarsinom hücreleri ve LNCaP hücrelerinde negatiftir. LNCaP hücreleri adenokarsinomla aynı sitokeratin profillerine sahipken, PC3 hücreleri SCNC'ye benzer sitokeratin profillerine sahiptir (Tai ve diğerleri, 2011). Her iki hücre hattında gen ekspresyonu yanıtının farklı olmasının nedeni her iki hücre hattının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Kanser hücrelerinin metastazı kansere bağlı ölümlerin %90'ından sorumludur (Hanahan, 2012). Bu bilgilere göre metastaz önlenmesi kişinin hayatta kalma süresinin artması demektir (Weng ve Yen, 2012). Bu çalışmada, yara iyileşmesi deneyi, *A. officinalis* L. çiçeğinden elde edilen Metanol ve Etil asetat ekstraktları uygulanmış LNCaP ve PC3 hücrelerinde 24 ve 48 saatte 20-200µl kapasiteli pipet ucuyla çizilen bir alanda migrasyonu inhibe etme yeteneğini ortaya koymuştur. Göçün inhibisyonu metastaza karşı korumanın bir göstergesidir.

Yapılan bir çalışmada *Althaea officinalis* L. (Marshmallow) ve *Astragalus membranaceus*'un topraktan veya hidroponik(topraksız bitki yetiştirme yöntemi) olarak serada yetiştirilen köklerinden elde edilen sulu ekstraktları kültüre edilmiş insan akciğerinde ve cilt fibroblastlarında U.V kaynaklı DNA hasarını önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Curnow ve Owen, 2016).

A. officinalis L. köklerinden sulu özler ve polisakkaritler, doku yenilenmesinde tahriş olmuş mukoza zarlarının tedavisi için geleneksel kullanımını kanıtlayabilen epitel hücrelerinin hücre fiziolojisinde etkili birer uyarıcı olduğu bulunmuştur. *Althaea officinalis* L. (1, 10 µg/mL) insan Epitel hücrelerinin hücre canlılığı ve çoğalması üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir (Deters ve diğerleri, 2010).

Althaea officinalis L.'in köklerinden kromatografik olarak iki flavonoid izole edilmiştir: hipolaetin 8-O-fl-o-glukozit (1) ve izoscutellarein 4'- metil eter 8-O-/3-o-glukozit-2"-SO₃K (2). Fenolik asitlerin varlığı da kromatografik olarak tespit edilmiştir isimleri şöyledir: kafeik, p-koumarik, ferulic, p-hidroksibenzoik, salisilik, vanillik, şırıngaik, p-hidroksi fenilasetik ve skopolit. Saccharose (Gudej, 1991).

A549 akciğer kanseri hücre dizisi için kafeik asid esterleri yararlı terapötik dozunun 6 ug/ml olduğu bulundu ve kafeik asid esterleri için normal akciğer fibroblastının tolerans dozunun terapötik dozdan daha yüksek olduğu görüldü. Kafeik asid esterleri, p53'ten bağımsız yollara bağlı oksidatif stres yollarını kullanarak tümör hücrelerinin büyümesini engellediği ve A549 hücrelerinde hücre içi hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşumunu azaltarak oksidatif süreçleri engellediği gözlemlendi. Kafeik asid esterleri, paklitaksel ve tümör nekroz faktör-alfa'nın (TNF-α) NF-KB'yi aktive etme yeteneğini bloke ederek prostat kanseri (PC-3) hücrelerinde NF-KB aktivasyonunu engelleyebildiği bulundu (Ozturk ve diğerleri, 2012).

Yapılan bir çalışmaya göre, p-koumarik asid, belirli mikroRNA'ların ekspresyonunu modüle ederek, mide kanseri hücrelerinde p-koumarik asidin antikanser özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak, SNU-16 mide kanseri hücrelerinde antikanser etkilerinin olduğunu gösterdi (Jang, Ko ve Kim, 2020). Bir çalışmaya göre, Ferulik asid PC-3 ve LNCaP hücrelerinde apoptozu indüklemiştir. Ayrıca Ferulik asid PC-3 ve LNCaP hücrelerinde invazyonu baskıladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca koloni oluşumunu baskılamıştır. Sonuç olarak, Ferulik asid PC-3 hücrelerinde hücre döngüsü durmasına yol açabileceği, LNCaP hücrelerinde apoptoza neden olabileceği gözlemlenmiştir (Eroğlu, Seçme, Bağcı ve Dodurga, 2015). Salisilik asit, anti-oksidan özellikleri ile birlikte agregasyonu önemli ölçüde

arttıran bir ajandır. Ayrıca, Salisilik asit insan kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahiptir (Celebioglu, 2021).

A. officinalis L. kök ekstreleri, insan makrofaj hücre hattı olan MΦ'yi H₂O₂ kaynaklı sitotoksositeye ve H₂O₂ kaynaklı ROS üretimine karşı koruyabilmiştir. *A. officinalis* L. kök ekstreleri anti-inflamatuar etkisi MΦ'de IL6'nın yanı sıra tümör nekroz faktörü-alfa'nın (TNF-a) LPS kaynaklı salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (Bonaterra ve diğerleri, 2020).

A. officinalis L. ekstraktının fibroblast çoğalmasını, kollajen sentezini ve cilt yaralanmalarında yeniden damarlanmayı iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Daha önceki çalışmalara ve mevcut değerlendirmelere göre *A. officinalis* L.'in dermal dokunun yeniden inşasına yardım ettiği gözlemlenmiştir (Mohsenikia ve diğerleri, 2020).

A. officinalis L. ekstresinin A549 hücrelerindeki sitotoksosite ve hücre çoğalması açısından azaltıcı etkisi olduğu bulunmuştur. Hücre çoğalması üzerindeki modüler etki, sitotoksiklik üzerindeki etkiden daha fazladır.

Farelerde yapılan bir çalışmaya göre *Althaea rosea* tohum ekstresinin kolon kanserine karşı umut verici doğal bir ajan olarak kabul edilebileceğini ve *Althaea rosea* aktif moleküllerin tanımlanması için daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (Narota ve diğerleri, 2020).

A. officinalis L. bitkisiyle aynı aileden olan *Valeriana officinalis* bitkisinin köklerinden elde edilen özler sırasıyla COLO 320 insan kolorektal ve GLC 4 insan akciğer kanser hücrelerinde yüksek oranda sitotoksik etki yaptığı kanıtlanmıştır (Patan, Alekhya, Aanandhi, Tharagesh ve Anish, 2018). Prostat kanseri hücre hatları DU-145 ve PC-3 üzerine uygulanan ticari olarak mevcut *Valeriana officinalis* özü (%0,8 valerinic asit) her iki hücre hattında mitokondriyal yoldan hücrelerin metastazını engellemiştir. Bu durumun valerinic asidin etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir (Aydin, Dikmen ve Kismali, 2016).

Magnolol, *A. officinalis* L. bitkisiyle aynı aileden olan oryantal bitki *Magnolia officinalis*'in kökünden ve kök kabuğundan çıkarılan fenolik hidroksil gruplarına sahip bir ligandır. Bu bileşik, apoptozun indüksiyonu ile prostat kanseri hücrelerini inhibe edebilir. Mekanizma

çalışması, Magnolol'un Akt enzim aktivitesini inhibe edebileceğini, proapoptotik bir protein Bad'deki Ser (136) fosforilasyonunu azaltabileceğini ve pEGFR, pPI3K ve pAkt aktivitesini önemli ölçüde inhibe edebileceğini göstermiştir. İlginçtir ki, bu bileşik normal insan prostat epitel hücresinin (PrEC) canlılığını etkilememiştir (Fu-Yue ve JIANG, 2011).

Bir çalışmada *A. officinalis* L. bitkisiyle aynı aileden olan *Salvia officinalis*'ten (Labiatae) ürolitik asit izole edilmiş ve antitümör özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak, ürolik asidin PC3 ve LNCaP hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve IC₅₀ değerlerinin 32.6 ve 15.7 µmol olduğu gösterilmiştir (Chintharlapalli, Papineni, Ramaiah ve Safe, 2007).

A. officinalis L. bitkisiyle aynı aileden olan *Melissa officinalis*'in hidroalkolik özünün güçlü antiproliferatif aktivitesinin, MCF-7 ve A549 kanser hücreleri de dahil olmak üzere fonksiyonel p53'e sahip tümörlerde p53, Bcl2 ve Her2'nin rolü daha az anlamlıdır. *Melissa officinalis*'in hidroalkolik özünün antiproliferatif etkilerini bu kanser hücrelerinde kısmen VEGF-A ve hTERT'nin eşzamanlı downregülasyonu yoluyla etkilediği görülmektedir (Jahanban-Esfahlan ve diğerleri, 2017).

Althaea officinalis L. çiçeğinden elde edilen Scopoletin, hücre üzerinde hem sitostatik hem de sitotoksik etki sergileyen tümöral lenfositler üzerinde ikili etki ürettiği ve ayrıca apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Al-Snafi, 2017). *Althaea officinalis* L.'in ham özü, flavonoidleri ve fitosterol özleri önemli bir sitotoksik etki yapmıştır ve AMJ13 meme kanseri hücrelerinde apoptoza neden olmuştur (Kadhun, Abd ve Al-Shammari, t.y.). *Althaea officinalis* L. köklerinin sulu ve hidroalkolik özler fenolik ve flavonoid içeriği ile çok iyi bir korelasyon göstermiştir. Ekstraktlar, insan BV-173 lösemik hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiş, ancak antioksidan özelliklerinden dolayı immünomodülatör etkilere sahip olabildiği gösterilmiştir (Benbassat ve diğerleri, 2014).

Kanser günümüz dünyasında en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Bitkisel kaynaklı ajanlar kanser tedavisinde önemli bir tedavi aracı olmaya adaydır. Kanser için tamamlayıcı ve alternatif tıp uygulamaları günden güne artmaktadır. Bizim çalışmamızda; *A. officinalis* L.'in prostat kanseri üzerinde hücre canlılığını ve hücre göçünü azalttığı bulunmuştur. Androjenden bağımsız hücre hattı olan PC3 ve androjene bağımlı hücre hattı olan LNCaP'lerde apoptozu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Hücrelerin ölümüne sebep olan

otofaji gibi bazı başka hücre ölüm süreçleri vardır. Bu tez çalışmasında bitki ekstraktlarının apoptoz yolu ile hücre ölümüne sebep olmadığı bilgisine ulaşılmıştır. İleriki çalışmalar apoptotik genlerin protein seviyesinde ifadeleri gösterilerek genişletilebilir. Aynı zamanda otofaji gibi hücre ölümüne sebep olan başka süreçler ileriki çalışmalarda araştırılmalıdır. LNCaP hücreleri androjen reseptörü (AR) ve prostat spesifik antijen (PSA) eksprese eder ve büyümeleri insan prostat adenokarsinomuna benzer şekilde androjen yoksunluğu ile inhibe edilir. PC3 hücreleri AR ve PSA'yı eksprese etmez ve çoğalmaları prostat küçük hücreli nöroendokrin karsinoma (SCNC) benzer şekilde androjenden bağımsızdır. Bu bilgilere göre uygulanan ekstraktların farklı hücre hatlarında farklı dozlarda etki etmesinin sebebi hücrelerin farklı karakterde hücre hatları olması olarak açıklanabilir. Çalışma *A. officinalis* L. diğer kanser türlerinde etkisinin belirlenmesine yönelik *in vivo* çalışmalar ile genişletilebilir. *A. officinalis* L.' in Prostat kanseri üzerine etkilerini açıklayan çalışmalar genişletilerek artırılabilir. *A. officinalis* L. çiçeğinin ekstraktlarının içeriğindeki etken maddeler belirlenebilir ve izole edilip kanserli hücrelerde uygulanabilir.

5. KAYNAKLAR

- Adams, J. M. ve Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337.
- Al-Snafi, A. E. (2013). The pharmaceutical importance of *Althaea officinalis* and *Althaea rosea*: A review. *Int J Pharm Tech Res*, 5(3), 1387-1385.
- Al-Snafi, A. E. (2017). Anticancer effects of Arabian medicinal plants (part 1)-A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 7(4), 63-102.
- Arcangeli, S., Pinzi, V. ve Arcangeli, G. (2012). Epidemiology of prostate cancer and treatment remarks. *World journal of radiology*, 4(6), 241.
- Attardi, B. J., Burgenson, J., Hild, S. A. ve Reel, J. R. (2004). Steroid hormonal regulation of growth, prostate specific antigen secretion, and transcription mediated by the mutated androgen receptor in CWR22Rv1 human prostate carcinoma cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 222(1-2), 121-132.
- Aydin, F., Dikmen, B. Y. ve Kismali, G. (2016). The potential cytotoxic effects of *Valeriana officinalis* extract on prostate cancer cell lines DU-145 and PC-3. *Toxicology Letters*, (258), S299.
- Azzouni, F. ve Mohler, J. (2012). Role of 5 α -reductase inhibitors in prostate cancer prevention and treatment. *Urology*, 79(6), 1197-1205.
- Barabutis, N., Schally, A. V. ve Siejka, A. (2018). P53, GHRH, inflammation and cancer. *EBioMedicine*, 37, 557-562.
- Bechis, S. K., Carroll, P. R. ve Cooperberg, M. R. (2011). Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. *Journal of Clinical Oncology*, 29(2), 235.
- Benbassat, N., Yoncheva, K., Hadjimitova, V., Hristova, N., Konstantinov, S. ve Lambov, N. (2014). Influence of the extraction solvent on antioxidant activity of *Althaea officinalis* L. root extracts. *Open Life Sciences*, 9(2), 182-188.
- Billis, A. (1986). Latent carcinoma and atypical lesions of prostate An autopsy study. *Urology*, 28(4), 324-329.
- Bonaterrea, G. A., Bronischewski, K., Hunold, P., Schwarzbach, H., Heinrich, E.-U., Fink, C., ... Kinscherf, R. (2020). Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effects of

- Phytohustil® and Root Extract of *Althaea officinalis* L. on Macrophages in vitro. *Frontiers in pharmacology*, 11, 290.
- Brawley, O. W. (2012). Prostate cancer epidemiology in the United States. *World journal of urology*, 30(2), 195-200.
- Bright-Line™ Hemacytometer supplied with two cover slips | Sigma-Aldrich. (t.y.). 8 Ağustos 2021 tarihinde <http://www.sigmaaldrich.com/> adresinden erişildi.
- Camp, N. J. ve Tavtigian, S. V. (2002). Meta-analysis of associations of the Ser217Leu and Ala541Thr variants in ELAC2 (HPC2) and prostate cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 71(6), 1475-1478.
- Cao, Y. ve Ma, J. (2011). Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: A systematic review and meta-analysis. *Cancer prevention research*, 4(4), 486-501.
- Carpenter, W. R., Howard, D. L., Taylor, Y. J., Ross, L. E., Wobker, S. E. ve Godley, P. A. (2010). Racial differences in PSA screening interval and stage at diagnosis. *Cancer Causes & Control*, 21(7), 1071-1080.
- Catalona, W. J., Loeb, S. ve Han, M. (2006). Expanding prostate cancer screening.
- Celebioglu, H. U. (2021). Effects of potential synbiotic interaction between *Lactobacillus rhamnosus* GG and salicylic acid on human colon and prostate cancer cells. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1221-1229.
- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J. ve Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum immunologiae et therapiæ experimentalis*, 61(1), 43-58.
- Chen, H., Griffin, A., Wu, Y., Tomsho, L., Zuhlke, K., Lange, E., ... Cooney, K. (2003). RNASEL mutations in hereditary prostate cancer. *Journal of medical genetics*, 40(3), e21-e21.
- Chintharlapalli, S., Papineni, S., Ramaiah, S. K. ve Safe, S. (2007). Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer research*, 67(6), 2816-2823.

- Chu, L. W., Ritchey, J., Devesa, S. S., Quraishi, S. M., Zhang, H. ve Hsing, A. W. (2011). Prostate cancer incidence rates in Africa. *Prostate cancer*, 2011.
- Ciobanu, M., Pirvu, L., Paun, G., Savin, S., Albu, B.-G., Munteanu, C., ... Parvulescu, V. (2019). Development of a new (bio)hybrid matrix based on *Althaea officinalis* and *Betonica officinalis* extracts loaded into mesoporous silica nanoparticles for bioactive compounds with therapeutic applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 605-613. doi:10.1016/j.jddst.2019.03.040
- Colak, S. ve Ten Dijke, P. (2017). Targeting TGF- β signaling in cancer. *Trends in cancer*, 3(1), 56-71.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Cato, A., Hittmair, A., Radmayr, C., ... Klocker, H. (1993). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Molecular endocrinology*, 7(12), 1541-1550.
- Culig, Z. ve Santer, F. R. (2014). Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 33(2), 413-427.
- Curnow, A. ve Owen, S. J. (2016). An evaluation of root phytochemicals derived from *Althaea officinalis* L. (Marshmallow) and *astragalus membranaceus* as potential natural components of UV protecting dermatological formulations. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Daniyal, M., Siddiqui, Z. A., Akram, M., Asif, H., Sultana, S. ve Khan, A. (2014). Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(22), 9575-9578.
- Demchenko, A. (2012). The change of cellular membranes on apoptosis: Fluorescence detection. *Experimental oncology*.
- Denmeade, S. R. ve Isaacs, J. T. (2004). Development of prostate cancer treatment: The good news. *The Prostate*, 58(3), 211-224.
- Deters, A., Zippel, J., Hellenbrand, N., Pappai, D., Possemeyer, C. ve Hensel, A. (2010). Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (*Althaea officinalis* L. L.): Cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 127(1), 62-69.

- Domińska, K. (2009). Genetic changes observed in prostate cancer. *Central euroPeian Journal of urology*, 62(1).
- Eeles, R. A., Kote-Jarai, Z., Giles, G. G., Al Olama, A. A., Guy, M., Jugurnauth, S. K., ... Morrison, J. (2008). Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nature genetics*, 40(3), 316.
- Eisermann, K. ve Fraizer, G. (2017). The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. *Cancers*, 9(4), 32.
- El-Khattouti, A., Selimovic, D., Haikel, Y. ve Hassan, M. (2013). Crosstalk between apoptosis and autophagy: Molecular mechanisms and therapeutic strategies in cancer. *Journal of cell death*, 6, JCD-S11034.
- Elmastas, M., Erenler, R., Demirtas, I. ve Ozturk, L. (2003). Superoxide anion scavenging activity of marshmallow flower (*Althaea officinalis* L.) (ss. 1-30). 7th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-7), sunulmuş bildiri.
- Elmastas, M., Ozturk, L., Gokce, I., Erenler, R. ve Aboul-Enein, H. Y. (2004). Determination of antioxidant activity of marshmallow flower (*Althaea officinalis* L.). *Analytical letters*, 37(9), 1859-1869.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Eroğlu, C., Seçme, M., Bağcı, G. ve Dodurga, Y. (2015). Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines. *Tumor Biology*, 36(12), 9437-9446.
- Fowke, J. H., McLerran, D. F., Gupta, P. C., He, J., Shu, X.-O., Ramadas, K., ... Koh, W.-P. (2015). Associations of body mass index, smoking, and alcohol consumption with prostate cancer mortality in the Asia Cohort Consortium. *American journal of epidemiology*, 182(5), 381-389.
- Fu-Yue, D. ve JIANG, R.-W. (2011). Research progress of the natural products against prostate cancer. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(2), 81-89.
- Gençhellaç, H. ve Yılmaz, E. (2015). Prostat görüntüleme. *Türk Radyoloji Seminerleri*, 3, 138-148.

- Gerl, R. ve Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 26(2), 263-270.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. ve Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, 55(3), 178-194.
- Gibson, T. M., Ferrucci, L. M., Tangrea, J. A. ve Schatzkin, A. (2010). Epidemiological and clinical studies of nutrition (C. 37, ss. 282-296). *Seminars in oncology*, sunulmuş bildiri, Elsevier.
- Giovannucci, E., Liu, Y., Platz, E. A., Stampfer, M. J. ve Willett, W. C. (2007). Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *International journal of cancer*, 121(7), 1571-1578.
- Grubu, M. S. (2017, 17 Mart). Prostat Kanseri Belirtileri ve Tedavisi—Memorial. Memorial Sağlık Grubu. 28 Eylül 2021 tarihinde <https://www.memorial.com.tr/hastaliklar/prostat-kanseri-belirtileri-ve-tedavisi> adresinden erişildi.
- Gudej, J. (1991). Flavonoids, phenolic acids and coumarins from the roots of *Althaea officinalis*. *Planta medica*, 57(03), 284-285.
- Guo, Y. ve Kyprianou, N. (1998). Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell growth & differentiation: The molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 9(2), 185-193.
- Hall, C., Troutman, S. M., Price, D. K., Figg, W. D. ve Kang, M. H. (2013). Bcl-2 family of proteins as therapeutic targets in genitourinary neoplasms. *Clinical genitourinary cancer*, 11(1), 10-19.
- Hanahan, D. (2012). Hallmarks of cancer: A 2012 perspective. *Annals of Oncology*, 23, ix23.
- Hanson, J., Gorman, J., Reese, J. ve Fraizer, G. (2007). Regulation of vascular endothelial growth factor, VEGF, gene promoter by the tumor suppressor, WT1. *Frontiers in bioscience: A journal and virtual library*, 12, 2279.

- Hayes, S. A., Zarnegar, M., Sharma, M., Yang, F., Peehl, D. M., Ten Dijke, P. ve Sun, Z. (2001). SMAD3 represses androgen receptor-mediated transcription. *Cancer research*, 61(5), 2112-2118.
- Heisler, L. E., Evangelou, A., Lew, A. M., Trachtenberg, J., Elsholtz, H. P. ve Brown, T. J. (1997). Androgen-dependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 126(1), 59-73.
- Hsing, A. W., Tsao, L. ve Devesa, S. S. (2000). International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *International journal of cancer*, 85(1), 60-67.
- Hu, J., Qiu, Z., Zhang, L. ve Cui, F. (2014). Kallikrein 3 and vitamin D receptor polymorphisms: Potentials environmental risk factors for prostate cancer. *Diagnostic pathology*, 9(1), 1-6.
- Ittmann, M. (2018). *Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 8(5), a030346. doi:10.1101/cshperspect.a030346
- Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Monfaredan, A., Shafie-Irannejad, V., Abbasi, M. M., Karimian, A. ve Yousefi, B. (2017). The herbal medicine *Melissa officinalis* extract effects on gene expression of p53, Bcl-2, Her2, VEGF-A and hTERT in human lung, breast and prostate cancer cell lines. *Gene*, 613, 14-19.
- Jahn, J. L., Giovannucci, E. L. ve Stampfer, M. J. (2015). The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: Implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era. *International journal of cancer*, 137(12), 2795-2802.
- Jang, M. G., Ko, H. C. ve Kim, S.-J. (2020). Effects of p-coumaric acid on microRNA expression profiles in SNU-16 human gastric cancer cells. *Genes & Genomics*, 42, 817-825.
- Jayadevappa, R., Chhatre, S., Johnson, J. C. ve Malkowicz, S. B. (2011). Association between ethnicity and prostate cancer outcomes across hospital and surgeon volume groups. *Health policy*, 99(2), 97-106.
- Jian, L., Lee, A. ve Binns, C. (2007). Tea and lycopene protect against prostate cancer. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 16(S1), 453-457.

- Joshu, C. E., Mondul, A. M., Menke, A., Meinhold, C., Han, M., Humphreys, E. B., ... Platz, E. A. (2011). Weight gain is associated with an increased risk of prostate cancer recurrence after prostatectomy in the PSA era. *Cancer Prevention Research*, 4(4), 544-551.
- Kadhun, H., Abd, A. ve Al-Shammari, A. (t.y.). Anti-Proliferative activity of *Althaea Officinalis* extracts on Iraqi breast cancer cell line AMJ13. *Iraqi JMS*. 2021; 19 (2): 163-171. Doi: 10.22578. *IJMS*, 19(5).
- Keogh, J. W. ve MacLeod, R. D. (2012). Body composition, physical fitness, functional performance, quality of life, and fatigue benefits of exercise for prostate cancer patients: A systematic review. *Journal of pain and symptom management*, 43(1), 96-110.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Khan, K. H., Blanco-Codesido, M. ve Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical reviews in oncology/hematology*, 90(3), 200-219.
- Kheirandish, P. ve Chinegwundoh, F. (2011). Ethnic differences in prostate cancer. *British journal of cancer*, 105(4), 481-485.
- Kim, J.-H., Lee, H., Shin, E. A., Kim, D. H., Choi, J. B. ve Kim, S.-H. (2017). Implications of Bcl-2 and its interplay with other molecules and signaling pathways in prostate cancer progression. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21(9), 911-920.
- Kobayashi, T., Nakata, T. ve Kuzumaki, T. (2002). Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer letters*, 176(1), 17-23.
- Koff, J. L., Ramachandiran, S. ve Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 2942-2955.
- Kumar, P., Nagarajan, A. ve Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols*, 2018(6), pdb-prot095505.
- Leitzmann, M. F. ve Rohrmann, S. (2012). Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. *Clinical epidemiology*, 4, 1.

- Li, X., Marani, M., Yu, J., Nan, B., Roth, J. A., Kagawa, S., ... Marcelli, M. (2001). Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer. *Cancer research*, 61(1), 186-191.
- Litwin, M. S. ve Tan, H.-J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. *Jama*, 317(24), 2532-2542.
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lu, S., Tsai, S. Y. ve Tsai, M.-J. (1997). Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: Androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer research*, 57(20), 4511-4516.
- Ma, J., Li, H., Giovannucci, E., Mucci, L., Qiu, W., Nguyen, P. L., ... Stampfer, M. J. (2008). Prediagnostic body-mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality in men with prostate cancer: A long-term survival analysis. *The lancet oncology*, 9(11), 1039-1047.
- Major, J. M., Cross, A. J., Watters, J. L., Hollenbeck, A. R., Graubard, B. I. ve Sinha, R. (2011). Patterns of meat intake and risk of prostate cancer among African-Americans in a large prospective study. *Cancer Causes & Control*, 22(12), 1691-1698.
- Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., ... Esen, A. (2000). Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer research*, 60(4), 944-949.
- Martino, M. A., Nevadunsky, N. S., Magliaro, T. J. ve Goldberg, M. I. (2002). The DES (diethylstilbestrol) years: Bridging the past into the future. Primary care update for ob/gyns, 9(1), 7-12.
- Mohsenikia, M., Rafiee, S., Rozei, L. S., Ebrahimi, A., Zahmatkesh-Meimandi, F., Aref, N. M., ... Zaree, H. (2020). *Althaea officinalis* improves wound healing in rats: A stereological study. *Drug Discoveries & Therapeutics*.
- Montague, J. A., Butler, L. M., Wu, A. H., Genkinger, J. M., Koh, W.-P., Wong, A. S., ... Mimi, C. Y. (2012). Green and black tea intake in relation to prostate cancer risk among Singapore Chinese. *Cancer Causes & Control*, 23(10), 1635-1641.

- Morgia, G., Falsaperla, M., Malaponte, G., Madonia, M., Indelicato, M., Travali, S. ve Mazzarino, M. C. (2005). Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urological research*, 33(1), 44-50.
- Mroueh, M., Daher, C. F. ve Hage-Sleiman, R. (2011). Pharmacological evaluation of aqueous extract of *Althaea officinalis* flower grown in Lebanon.
- Narota, A., Kumar, S., Kaur, R., Kaur, S., Aggarwal, R. ve Agnihotri, N. (2020). *Althaea rosea* seed extract ameliorates 1, 2-dimethylhydrazine induced preneoplastic lesions in mouse model of colon cancer by modulating oxidative stress and inflammation. *Pharmacognosy Magazine*, 16(70), 360.
- Nemesure, B., Wu, S.-Y., Hennis, A. ve Leske, M. C. (2013). Family history of prostate cancer in a black population. *Journal of immigrant and minority health*, 15(6), 1107-1112.
- Nosal'ova, G., Strapkova, A., Kardosova, A., Capek, P., Zathurecký, L. ve Bukovská, E. (1992). Antitussive action of extracts and polysaccharides of marsh mallow (*Althaea officinalis* L. L., var. *Robusta*). *Die Pharmazie*, 47(3), 224-226.
- Ozturk, G., Ginis, Z., Akyol, S., Erden, G., Gurel, A. ve Akyol, O. (2012). The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16(15), 2064-2068.
- Patan, A., Alekhya, K., Aanandhi, V., Tharagesh, K. ve Anish, A. (2018). *Valeriana jatamansi*: An ethnobotanical review. *Asian J Pharm Clin Res*, 11, 38-40.
- Peña-Blanco, A. ve García-Sáez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond—Mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS journal*, 285(3), 416-431.
- Perdana, N. R., Mochtar, C. A., Umbas, R. ve Hamid, A. (2016). The risk factors of prostate cancer and its prevention: A literature review. *Acta Med Indones*, 48(3), 228-38.
- Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M. ve Mucci, L. A. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12), a030361. doi:10.1101/cshperspect.a030361

- Pham, T.-M., Fujino, Y., Kubo, T., Ide, R., Tokui, N., Mizoue, T., ... Yoshimura, T. (2009). Fish intake and the risk of fatal prostate cancer: Findings from a cohort study in Japan. *Public health nutrition*, 12(5), 609-613.
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of prostate cancer. *World journal of oncology*, 10(2), 63.
- Rebbeck, T. R. (2017). Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Seminars in Radiation Oncology*, 27(1), 3-10. doi:10.1016/j.semradonc.2016.08.002
- Roberts, D. L., Dive, C. ve Renehan, A. G. (2010). Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: New perspectives. *Annual review of medicine*, 61, 301-316.
- Sadi, M. V., Walsh, P. C. ve Barrack, E. R. (1991). Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. Comparison of receptor content and response to hormonal therapy. *Cancer*, 67(12), 3057-3064.
- Sadighara, P., Gharibi, S., Jafari, A. M., Khaniki, G. J. ve Salari, S. (2012). The antioxidant and Flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color, 2(3), 5.
- Sakr, W., Haas, G., Cassin, B., Pontes, J. ve Crissman, J. (1993). The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *The Journal of urology*, 150(2), 379-385.
- Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z. ve Kong, D. (2010). Novel targets for prostate cancer chemoprevention. *Endocrine-related cancer*, 17(3), R195.
- Seidenfeld, J., Samson, D. J., Hasselblad, V., Aronson, N., Albertsen, P. C., Bennett, C. L. ve Wilt, T. J. (2000). Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*, 132(7), 566-577.
- Shah, S. M. A., Akhtar, N., Akram, M., Shah, P. A., Saeed, T., Ahmed, K. ve Asif, H. M. (t.y.). Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. *J. Med. Plants Res.*, 5.
- Shamas-Din, A., Brahmhatt, H., Leber, B. ve Andrews, D. W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4), 508-520.

- Siejka, A., Schally, A. V. ve Barabutis, N. (2014). The effect of LHRH antagonist cetrorelix in crossover conditioned media from epithelial (BPH-1) and stromal (WPMY-1) prostate cells. *Hormone and Metabolic Research*, 46(01), 21-26.
- Šoltés, L. (1989). High-performance liquid chromatographic determination of β -adrenoceptor blocking agents in body fluids. *Biomedical Chromatography*, 3(4), 139-152.
- Subahir, M. N., Shah, S. A. ve Zainuddin, Z. M. (2009). Risk factors for prostate cancer in Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre: A case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev*, 10(6), 1015-1020.
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130-1150.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C.-Z. ve Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), 1668-1679. doi:10.1002/pros.21383
- Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K. ve Yong, E. (2015). Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3-23.
- Tappel, A. (2007). Heme of consumed red meat can act as a catalyst of oxidative damage and could initiate colon, breast and prostate cancers, heart disease and other diseases. *Medical hypotheses*, 68(3), 562-564.
- Thakur, H., Gupta, L., Sobti, R. C., Janmeja, A. K., Seth, A. ve Singh, S. K. (2011). Association of GSTM1T1 genes with COPD and prostate cancer in north Indian population. *Molecular biology reports*, 38(3), 1733-1739.
- Umesawa, M., Iso, H., Mikami, K., Kubo, T., Suzuki, K., Watanabe, Y., ... Tamakoshi, A. (2014). Relationship between vegetable and carotene intake and risk of prostate cancer: The JACC study. *British journal of cancer*, 110(3), 792-796.
- Valasek, M. A. ve Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*, 29(3), 151-159.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Brinkmann, A. O., Grootegoed, J. A. ve Mulder, E. (1992). Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells:

- Differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation. *Biochemistry*, 31(8), 2393-2399.
- Vickers, A. J., Roobol, M. J. ve Lilja, H. (2012). Screening for prostate cancer: Early detection or over-detection? *Annual review of medicine*, 63, 161-170.
- Weng, C.-J. ve Yen, G.-C. (2012). Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1-2), 323-351.
- Whitman, E. J., Pomerantz, M., Chen, Y., Chamberlin, M. M., Furusato, B., Gao, C., ... Sestrehenn, I. A. (2010). Prostate cancer risk allele specific for African descent associates with pathologic stage at prostatectomy. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 19(1), 1-8.
- Wu, I. ve Modlin, C. S. (2012). Disparities in prostate cancer in African American men: What primary care physicians can do. *Cleveland Clinic journal of medicine*, 79(5), 313-320.
- Young, T. N., Rodriguez, G. C., Rinehart, A. R., Bast Jr, R. C., Pizzo, S. V. ve Stack, M. S. (1996). Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: Purification of matrix metalloproteinase 2. *Gynecologic oncology*, 62(1), 89-99.
- Zeegers, M. P., Jellema, A. ve Ostrer, H. (2003). Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: A meta-analysis. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 97(8), 1894-1903.
- Zhang, Y., Kong, F., Zhang, L., Li, C. ve Zhang, R. (2017). Modulatory effect of *Althaea officinalis* L root extract on cisplatin-induced cytotoxicity and cell proliferation in A549 human lung cancer cell line. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(12), 2647. doi:10.4314/tjpr.v15i12.16

