

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**PROSTAT KANSERİNDE KULLANILAN BAZI
KEMOTERAPİ İLAÇLARININ OLUŞTURDUĞU
HÜCRE TOKSİSİTESİNE KARŞI LİZOFOSFATİDİK
ASİDİN ETKİSİ**

Gizem Esra PARLAK

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2011

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**PROSTAT KANSERİNDE KULLANILAN BAZI
KEMOTERAPİ İLAÇLARININ OLUŞTURDUĞU
HÜCRE TOKSİSİTESİNE KARŞI LİZOFOSFATİDİK
ASİDİN ETKİSİ**

Gizem Esra PARLAK

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2009.02.0122.015)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.16/12/2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. İ. Türker KÖKSAL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ahter Dilşat ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih, ... / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Prostat kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık tanı konulan malignitedir ve kansere bağlı ölümler arasında ikinci sıradadır. Prostat kanserinde sağ kalımı arttırmak ve etkili bir palyatif tedavi sağlayabilmek amacıyla çeşitli kemoterapi protokolleri gündeme gelmektedir. Prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının arasında dosetaksel, estramustin ve mitoksantron bulunmaktadır. Dosetaksel, semisentetik taksan sınıfı antikanser ajanlardan biridir. Estramustin, estradiol ile nitrojen mustard kombinasyonundan oluşan antineoplastik ajandır. Sentetik bir antikanser ajan olan mitoksantron, antrakinin içeren antrasiklinin basitleştirilmiş analogu olarak tasarlanmıştır. Lizofosfatidik asit, çeşitli hastalıklarda birden çok biyolojik fonksiyon göstermesi nedeniyle en ilginç fosfolipid mediyatörlerinden birisidir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, prostat kanseri PC3 hücrelerinden de salınan lizofosfatidik asidin hücre sağkalımı, proliferasyon ve migrasyonun düzenlenmesinde fonksiyonu vardır. Bu çalışmanın amacı, prostat kanserinde kullanılan bazı kemoterapi ajanlarının (dosetaksel, estramustin ve mitoksantron) oluşturduğu hücre toksisitesine karşı lizofosfatidik asidin etkisini incelemektir. Bu amaçla prostat kanseri PC3 hücrelerinde lizofosfatidik asidin optimum dozu belirlendi. PC3 hücreleri lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA ile muamele edildi. Lizofosfatidik asidin hücre proliferasyonu arttırdığı görüldü. Dosetaksel, estramustin ve mitoksantron uygulanan hücrelerin proliferasyonunda azalma görüldü. Dosetaksel +LPA, estramustin + LPA ve mitoksantron+LPA gruplarında hücre proliferasyonu sırasıyla dosetaksel, estramustin ve mitoksantron gruplarına göre arttı. Lizofosfatidik asit PC3 hücrelerinin koloni oluşumunu arttırdı. Dosetaksel, estramustin ve mitoksantron koloni oluşumunu azalttı. Dosetaksel+LPA, estramustin+LPA ve mitoksantron+LPA gruplarında koloni oluşumu sırasıyla dosetaksel, estramustin, mitoksantron gruplarına göre arttı. Lizofosfatidik asidin dosetaksel, estramustin ve mitoksantronun indüklediği apoptozisi engellediği görüldü. Lizofosfatidik asit, dosetaksel, estramustin ve mitoksantronun neden olduğu hücre sitotoksitesini azalttı, hücrelerinin sağkalımını ve çoğalmasını arttırdı. Prostat kanseri tedavisinde kullanılan dosetaksel, estramustin ve mitoksantronun neden olduğu hücre ölümünü arttırmak için, kanser hücrelerinde çok fazla eksprese olan lizofosfatidik asidin salınımını engellenmelidir. Bu çalışma, prostat kanserinde kullanılan dosetaksel, estramustin, mitoksantron ve diğer kemoterapik ajanların kanser tedavisinde etkisinin artırılması için lizofosfatidik asit sentez yollarının inhibe edilmesinin önemli olabileceğini önermektedir.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, lizofosfatidik asit, dosetaksel, estramustin, mitoksantron, apoptozis, hücre proliferasyonu.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common malignancy among men in the United States, ranking only behind lung cancer. Various chemotherapy protocols are implemented to improve survival and to provide an effective palliative treatment in prostate cancer. Docetaxel, estramustine, mitoxantrone are chemotherapy agents which are used in prostate cancer. Docetaxel is a semisynthetic taxane, a class of anticancer agents. Estramustine, an estradiol nitrogen mustard conjugate, antineoplastic agent. Mitoxantrone, a synthetic anticancer agent, is a member of the anthracenedione class of compounds and was originally designed as a simplified analogue of the anthraquinone containing anthracyclines. Lysophosphatidic acid (LPA) is one of the most interesting phospholipid mediators with multiple biological functions in various human diseases. Lysophosphatidic acid secreted by prostate cancer cells as well as the other cancer cells is able to regulate cell proliferation, survival and migration. The aim of this study was to investigate the effects of lysophosphatidic acid against cell toxicity of some chemotherapy agents (docetaxel, estramustine, mitoxantrone) which are used in prostate cancer. For this purpose, optimum dose of LPA was determined in PC3 cells. PC3 cells treated with lysophosphatidic acid, docetaxel, docetaxel+LPA, estramustine, estramustine+LPA, mitoxantrone and mitoxantrone+LPA. Lysophosphatidic acid increased cell proliferation. Docetaxel, estramustine and mitoxantrone decreased cell proliferation. Docetaxel+LPA, estramustine+LPA and mitoxantrone+LPA increased cell proliferation compared to docetaxel, estramustine and mitoxantrone treated cells. Lysophosphatidic acid increased colony formation in PC3 cells. Docetaxel, estramustine and mitoxantrone decreased colony formation. Docetaxel+LPA, estramustine+LPA and mitoxantrone+LPA increased colony formation compared to docetaxel, estramustine and mitoxantrone treated cells. It was seen that lysophosphatidic acid blocked docetaxel, mitoxantrone and estramustine-induced apoptosis. Lysophosphatidic acid decreased docetaxel, estramustine and mitoxantrone-induced cytotoxicity and increased cell survival and proliferation. The blocking of lysophosphatidic acid secretion which is highly expressed in cancer cells may enhance the cell killing effects of docetaxel, estramustine and mitoxantrone in prostate cancer treatment. This study suggest that the inhibition of signal pathways of lysophosphatidic acid could improve the treatment of cancers by docetaxel, mitoxantrone, estramustine and possibly other chemotherapeutic agents.

Key words: Prostate cancer, lysophosphatidic acid, docetaxel, estramustine, mitoxantrone, apoptosis, cell proliferation.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında çok önemli katkıları ile bana her aşamada yardımcı olan akademik danışmanım sayın Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ'ye,

Bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olarak destek verdikleri için ve çalışmalarına yaptıkları katkıdan dolayı, Dr. Mehmet ŞAHİN ve Dr. Emel ŞAHİN'e,

Merkez Araştırma Laboratuar'ında, akış sitometrisi deneyinde laboratuar olanaklarını kullanmama izin veren ve deneyi gerçekleştirmdeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Sadi KÖKSOY'a

Öğrenim hayatım boyunca desteğini, ilgisini ve fedakarlıklarını hep hissettiğim, bana her koşulda destek olan, benim bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan aileme,

sonsuz teşekkür ederim.

Gizem Esra PARLAK

Kasım, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. İnsidansı	4
2.1.3. Prostatın Yapısı	4
2.1.4. Risk Faktörleri	5
2.1.5. Laboratuvar Bulguları	6
2.1.6. Tedavi	7
2.2. Kemoterapi	7
2.3. Doksetaksel	8
2.4. Estramustin	10
2.5. Mitoksantron	12
2.6. Lizofosfatidik Asit	12
2.6.1. Lizofosfatidik Asidin Yapısı ve Biyokimyası	13
2.6.2. Lizofosfatidik Asit Üretimi, Salınımı ve Yıkımı	13
2.6.3. Lizofosfolipaz D	15
2.6.4. Lizofosfatidik Asit Reseptörleri	17
2.7. Apoptozis	18
2.7.1. İntrinsik Apoptozis Yolağı	19
2.7.2. Ekstrinsik Apoptozis Yolağı	20
2.7.3. Kaspazlar	20
2.7.4. Apoptozisin Kontrolü	20
2.7.5. Apoptozis ve Ürolojik Tümörler	22
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	23
3.1. Hücre Kültürü	23
3.1.1. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar	23
3.1.2. Besiyerinin Hazırlanması	24
3.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması	24
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	24

3.1.5.	Hücrelerin Çözülmesi	25
3.2.	Lizofosfatidik Asit, Dosetaksel, Estramustin ve Mitoksantron'un Sitotoksisite Çalışmaları	25
3.2.1.	Lizofosfatidik asit ve ilaçların hazırlanması	25
3.2.2.	Lizofosfatidik asit doz çalışmaları	25
3.2.3.	Hücre proliferasyon deneyi	26
3.3.	Koloni deneyi	28
3.4.	Lizofosfatidik asit, Docetaksel, Estramustin ve Mitoksantron'un Apoptozise Olan Etkilerinin İncelenmesi	28
3.5.	İstatistiksel Analiz	32
BULGULAR		33
4.1.	Lizofosfatidik Asidin Konsantrasyon Denemeleri	33
4.2.	Lizofosfatidik Asit, Dosetaksel, Estramustin ve Mitoksantronun PC3 Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi	34
4.3.	Lizofosfatidik Asit, Dosetaksel, Estramustine ve Mitoksantronun PC3 Hücrelerinde Koloni Oluşumuna Etkisi	48
4.4.	PC3 Hücre Dizisinde Anneksin V Deney Sonuçları	51
TARTIŞMA		59
SONUÇLAR		65
KAYNAKLAR		68
ÖZGEÇMİŞ		81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A2M	: α -2 makroglobulin
ACT	: α -1 antikomotripsin
AIF	: Apoptozis İnhibe Edici Faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APO-1	: Apoptozisi Tetikleyen Reseptör-1
ATCC	: American Type Culture Collection
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma-2
cFLİP	: Hücresel FLİCE- İnhibitör Protein
DAG	: Diaçilgliserol kinaz
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA-PK	: DNA protein kinaz
DNPH	: 2,4-dinitrofenilhidrazin
EMP	: Estramustin Fosfat
Endo G	: Endonükleaz G
FasL	: FasR Ligandı
FasR	: Ölüm Reseptörü
FBS	: Fetal Sığır Serum
FITC	: Floresein İzotiyosiyanat
IAP	: Apoptozis İnhibitörü
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
GPCR	: G Proteinin Bağlı Reseptör
LPA	: Lizofosfatidik Asit
LizoPLC	: Lizofosfatidil Kolin
LizoPLD	: Lizofosfolipaz D
Kaspaz	: Aspartat Spesifik Sistein Proteaz
KDPK	: Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri
MAG	: Monoaçilgliserol
MAP	: Mikrotubulusa Bağlı Proteinler

MAPK	: Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinazlar
NFKB	: Nükleer faktör kappa B
MTT	: [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid]
PA	: Fosfatidik Asid
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu
PI	: Propidyum İyodid
PLC	: Fosfolipaz C
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TRAIL	: Tümör Nekrozis Faktör İle İlişkili Apoptozise Sebep Olan Ligand

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa	
2.1.	İnsan prostatının yapısı	5
2.2.	Paklitaksel ve dosetakselin kimyasal yapısı	9
2.3.	Estramustin fosfatın kimyasal yapısı	11
2.4.	Mitoksantron'un kimyasal yapısı	12
2.5.	Lizofosfatidik asidin kimyasal yapısı	13
2.6.	Lizofosfatidik asit yolları	14
2.7.	Lizofosfolipaz D aracılığı ile lizofosfatidil kolinden lizofosfatidik asit oluşum reaksiyonu	15
2.8.	Lizofosfolipaz D'nin yapısı	16
2.9.	Lizofosfatidik asidin lizofosfolipaz D tarafından üretilmesi ile lizofosfatidik asit, G proteini bağlı reseptörlere bağlanarak hücrel cevap oluşturur	17
2.10.	Lizofosfatidik asit sinyal yolağı	18
2.11.	Apoptozisin genel görünümü	19
3.1	Annexin V ile hücre boyama	30
3.2.	Lazer ışığı ile hücrenin etkileşmesi ve bu etkileşme sırasında hücreden saçılan ışının gösterimi	31
4.1.	PC3 hücrelerinde farklı dozlardaki lizofosfatidik asidin hücre proliferasyonuna etkisi.	33
4.2.	PC3 hücrelerinde farklı dozlardaki LPA'nın canlı hücrelere etkisi	34
4.3.	PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10 mM) ve dosetaksel (10 mM) + LPA (10 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	35
4.4.	PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), estramustin (10 µM) ve estramustin (10 µM) + LPA (10 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi etkisi	36
4.5.	PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), mitoksantron (0.2 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) + LPA (10 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	37

4.6.	Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'deki verilerin bir arada gösterimi	38
4.7.	PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10 mM), estramustin (10 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	39
4.8.	PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10mM) ve dosetaksel (10mM) + LPA(10µM) ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	39
4.9.	PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), estramustin (10 µM) ve estramustin (10 µM) + LPA (10 µM) ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	40
4.10.	PC3 hücrelerinin LPA (10 µM), mitoksantron (0.2 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) + LPA (10µM) ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	41
4.11.	Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'daki verilerin bir arada gösterimi	42
4.12.	PC3 hücrelerinin LPA (10 µM), dosetaksel (10 mM) ve dosetaksel (10 mM) + LPA (10µM) ile 72 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	43
4.13.	PC3 hücrelerinin LPA (10 µM), estramustin (10 µM) ve estramustin (10 µM) + LPA (10µM) ile 72 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	44
4.14.	PC3 hücrelerinin LPA (10 µM), mitoksantron (0.2 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) + LPA (10µM) ile 72 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi	45
4.15.	Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14'deki verilerin bir arada gösterimi	46
4.16.	PC3 hücrelerinin LPA, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+ LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin bir arada gösterimi	46
4.17.	PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10 mM), dosetaksel (10 mM) + LPA (10 µM), estramustin (10 µM), estramustin (10 µM) + LPA (10µM), mitoksantron (0.2 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) + LPA (10µM) gruplarının canlı hücrelerinin yüzdesi	47
4.18.	Kontrol (a) ve LPA (b) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri	48
4.19.	Dosetaksel (c) ve dosetaksel + LPA (d) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri	48
4.20.	Estramustin (e) ve estramustin + LPA (f) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri	49

4.21.	Mitoksantron (g) ve mitoksantron + LPA (h) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri	49
4.22.	Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin oluşturduğu koloni sayıları	50
4.23.	Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin oluşturduğu koloni sayılarının yüzdesi	51
4.24.	Kapı alınan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	52
4.25.	İlaç ve LPA uygulanmayan kontrol grubu PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	52
4.26.	Lizofosfatidik asit uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	53
4.27.	Dosetaksel uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	53
4.28.	Dosetaksel + LPA uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	54
4.29.	Estramustin uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	54
4.30.	Estramustin + LPA uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	55
4.31.	Mitoksantron uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	55
4.32.	Mitoksantron + LPA uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü	56
4.33.	Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin sitotoksosite sonuçları	57
4.34.	Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin % canlı hücre sonuçları	58

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
3.1. Bu çalışmada kullanılan prostat kanseri hücre dizisinin özellikleri	23
4.1. Lizofosfatidik asit, dozetaksel, dozetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin ölçülen apoptozis değerleri.	56

GİRİŞ

Günümüzde ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada kanser yer almaktadır. Prostat kanseri batı toplumlarında erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Sadece ABD’de 2006 yılında 234.460 yeni prostat kanseri tanısı konmuştur (1). Prostat kanseri, kansere bağlı ölümlerden akciğer ve kolon kanserinden sonra 3. sıradadır ve kansere bağlı ölümlerin %9’undan sorumludur (1). Prostat kanseri görülme insidansı yaşla birlikte artmaktadır. Otuzdokuz yaşındaki bir erkekte prostat kanseri oluşma olasılığı yaklaşık olarak 1/10000 iken, bu oran 40–59 yaş aralığında 1/103, 60–79 yaş aralığında 1/8 olmaktadır (2).

Prostat spesifik antijen (PSA) ile yapılan tarama çalışmalarıyla hastalığın erken evrede yakalanma şansının arttığı ve mortalitesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu evrede yakalanan hastalarda radikal tedavi ile kür sağlanabilmektedir. Lokal radikal tedavi ile kür sağlanamayacak hastalar için ilk tedavi şekli hormonal tedavidir (3). Bu hastalarda hormon ablasyon tedavisiyle progresyonsuz sağ kalım süresi 12 ile 33 ay arasındadır (4). Birçok hasta tedaviye semptomatik ve biyokimyasal cevap verir. Fakat, tedavi sağkalımı uzatmaz ve nihayetinde tüm hastalarda androjenden bağımsız safhaya girilir. Bu hastalar bir yere kadar ikincil hormonal müdahalelere cevap verirler. Hormonal tedavilere rağmen bu hastalar kaçınılmaz bir şekilde progresyon gösterirler ve hormona dirençli hale gelirler (5). Bu noktada sağ kalımı arttırmak ve etkili bir palyatif tedavi sağlayabilmek amacıyla çeşitli kemoterapi protokolleri ve deneysel yaklaşımlar gündeme gelmektedir (6). Bunun yanı sıra, prostat kanseri tedavisinde kemoterapi sadece hormona dirençli hastalıkta kullanılmamaktadır. Kemoterapi, yüksek riskli lokalize prostat kanserinde radyoterapi ve radikal prostatektomi sonrası veya öncesi rekürrensi azaltmak amacıyla ve hormon ablasyon tedavisiyle indüklenen ve kemoterapi yanıtını azaltabilecek bazı mutasyonlar ortaya çıkmadan önce hormonal tedaviye eklenerek kullanılabilir (7).

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının arasında dosetaksel, estramustin ve mitoksantron bulunmaktadır. Bugün bir taksan derivativesi olan dosetaksel ile az da olsa bir sağkalım avantajı gösterilmiş olup, bu sitotoksik ilaçla birlikte prostat kanserinin tedavisinde yeni bir dönemin başladığını söylemek yanlış olmayacaktır (8). Ayrıca, estradiol fosfat ile nitrojen mustard’ın bileşiminden elde edilmiş olan estramustin fosfat 1966 senesinden beri ileri evre prostat kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır (9). Prostat kanseri tedavisinde kullanılan diğer ilaç mitoksantrondur. Mitoksantron, antrasiklin antineoplastik türevidir ve DNA-reaktif bir ajandır (10). Literatürde, bu ilaçların kanser hücrelerinde sitotoksik etki yarattığı ve hücrelerin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (11-15).

Lizofosfatidik asit (1- α -sn-glisero-3-fosfat), çok sayıda biyolojik fonksiyon gösteren ve bilinen en basit gliserofosfolipidlerden birisidir. Serumda bulunan aktif formunun konsantrasyonu 1-5 μ M’dir (16). Lizofosfatidik asit hücre proliferasyonu, hücre sağkalımı, trombosit agregasyonu, düz kas kasılması ve tümör hücre

invazyonunun uyarılması gibi birçok biyolojik olaylarda rol alır (17). Lizofosfatidik asidin sentezlenmesini sağlayan enzim lizofosfolipaz D'dir. Bu enzim, lizofosfotidil kolin'den lizofosfatidik asit sentezlenmesini sağlar ve plazma lizofosfatidik asit seviyesinin değişiminden sorumludur. Lizofosfatidik asit sentezlendikten sonra, hücre membranında bulunan G proteini bağlı reseptörlerine bağlanarak çeşitli biyolojik olayların gerçekleşmesine neden olur. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, kanser hücrelerinde lizofosfolipaz D ekspresyonunun arttığı ve lizofosfatidik asidin kanser hücrelerinde etki gösterdiği bildirilmiştir (18).

Literatür taraması sırasında, lizofosfatidik asidin prostat kanseri PC3 hücrelerinde, prostat kanseri tedavisinde kullanılan bazı kemoterapi ilaçlarının oluşturduğu hücre toksisitesi üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada kanser tedavisi için kullanılan bazı kemoterapi ilaçlarının (dozetaksel, estramustin ve mitoksantron) oluşturduğu hücre toksisitesine karşı kanser hücrelerinde salınımı artan lizofosfatidik asidin etkisi araştırılmıştır. Bunun yanısıra, kullanılan kemoterapi ajanlarının neden olduğu apoptozisi lizofosfatidik asidin önleyip önleyemeyeceği araştırılarak literatüre kazandırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

Kanser kontrol edilemeyen hücre çoğalması ile tanımlanan bir hastalıktır. Kanser hücrelerinde, hücreye hem dış çevreden hem de hücre içi ortamdan gelen çoğalmayı baskılayıcı uyarılar ile ilgili bozukluklar söz konusudur. Ayrıca, kontrolsüz çoğalmaya engel olması beklenen negatif geri bildirim mekanizmaları da bozulmaktadır. Kontrolsüz hücre çoğalması ve eşzamanlı apoptozisin baskılanması, karsinogenez sürecinin temelindeki önemli iki etkidir.

Kanser hücresinde çoğalma kontrolünün ortadan kalktığı süreçte, hücre döngüsü ile ilgili genler ve kontrol noktaları ile ilgili genler sıklıkla mutasyona ve hücre işlev bozukluğuna uğrarlar (19).

Hücre dışından gelen çeşitli uyarıların hücre tarafından algılanması ve sinyalin hücre içine iletilerek cevap oluşturulmasında haberci sistemlerin esansiyel rolü bulunur. Karsinogenezde, sinyal iletimi yollarını da içine alan temel özellik hücrenin denetimsiz büyümesi ve çoğalmasıdır. Buna göre, büyümeyi uyarıcı sinyallerin yokluğunda ve/veya büyümeyi inhibe edici uyarıların alınması halinde dahi, hücrenin büyüme ve çoğalma yeteneği devam eder. Hücreye bu potansiyeli kazandıran etmenler, onkogenlerin fonksiyonlarını arttıran değişiklikler (mutasyon, upregülasyon) ve/veya tümör baskılayıcı genler ile ilgili değişiklikler (inaktivasyon, gen kaybı) olabilir (20).

Dünyada farklı ülkelerde belirgin şekilde değişen insidans ve mortalite oranları ile prostat kanseri, erkekler arasında görülen dördüncü en sık kanser türüdür. 1990'lı yılların başlangıcından bu yana yeni tarama testleri ve tedavideki iyileştirmeler, bu hastalığın insidansında, tanı evresinde ve mortalitesinde dramatik düzenlemelere neden olmuştur. Moleküler biyolojide ve epidemiyolojide dev ilerlemeler, prostat kanserinin etiyojisi ve biyolojisinde yeni ufuklar açmıştır. Bu gelişmeler hastalığın daha iyi anlaşılması ve gelecekte prostat kanserinin önlenmesi ve tedavisinde yeni ve daha iyi yolların açılmasına neden olacaktır (21).

2.1.1. Epidemiyoloji

Prostat Kanseri gelişmiş ülkelerde erkeklerde en sık görülen kanser haline gelmiştir. Dünya çapında 1990 yıllardan itibaren insidansı yükselmeye başlamıştır (22). Prostat için uygulanan tedavi metodlarının gelişmesi, özellikle transüretal rezeksiyon prostat operasyonunun yaygın kullanıma girmesi ile birlikte batılı ülkelerde 1970'lerin sonu, 1980'lerin başında insidansında yükselme olmuştur (23). 1986–1992 yılları arasında prostat spesifik antijenin (PSA) kullanıma girmesi ile birlikte prostat kanseri yakalama insidansında belirgin bir artış olmuştur (24). 1990'ların ortalarında ABD'de insidansında minimal bir azalma görülmesine rağmen tekrar yükselmeye başlamıştır. Asya ülkelerinde görülme insidansı genel olarak düşüktür, ancak son yıllarda artmaya başlamıştır. Bunun sebebi olarak da batılı tip yaşam

tarzının, özellikle diyet ve beslenme alışkanlığının giderek yaygınlaşması gösterilmiştir (22).

Yaşlanma ile birlikte erkeklerin çoğunda mikroskopik prostat kanser odağı gelişmekte ve yaşadıkları popülasyondaki yüksek veya düşük risk durumuna göre invaziv hastalık ortaya çıkmaktadır (25). Erkeklerin çoğunda mikroskopik hastalık gelişmesine rağmen, bunlardan çok küçük bir oranı invaziv hastalık haline gelmekte ve çok az bir kısmı da erken ölümlere neden olmaktadır. Prostat Kanseri, kansere bağlı ölümlerde akciğer ve kolon kanserinden sonra 3. sıradadır ve kansere bağlı ölümlerin %9'undan sorumludur (1). Prostat Kanseri görülme insidansı yaşla birlikte artmaktadır. 39 yaşındaki bir erkekte prostat kanseri oluşma olasılığı yaklaşık olarak 1/10000 iken, bu oran 40–59 yaş aralığında 1/103, 60–79 yaş aralığında 1/8 olmaktadır (26).

2.1.2. İnsidans

Prostat kanseri insidansı ırk, diyet alışkanlığı, yaşam tarzı, coğrafya ve tarama çalışmaları gibi nedenlerden dolayı, ülkeden ülkeye hatta aynı ülkenin farklı yerleşim bölgelerine göre değişmektedir.

Prostat kanserinin en dikkat çekici özelliklerinden birisi, onun ortaya çıkışında ve progresyonunda coğrafi varyasyonun derecesidir. ABD'de erkekler arasında en sık tanısı konan kanser prostat kanseridir ve kansere bağlı ölümlerin nedeni olarak da ikinci sırada yer alır (27, 28).

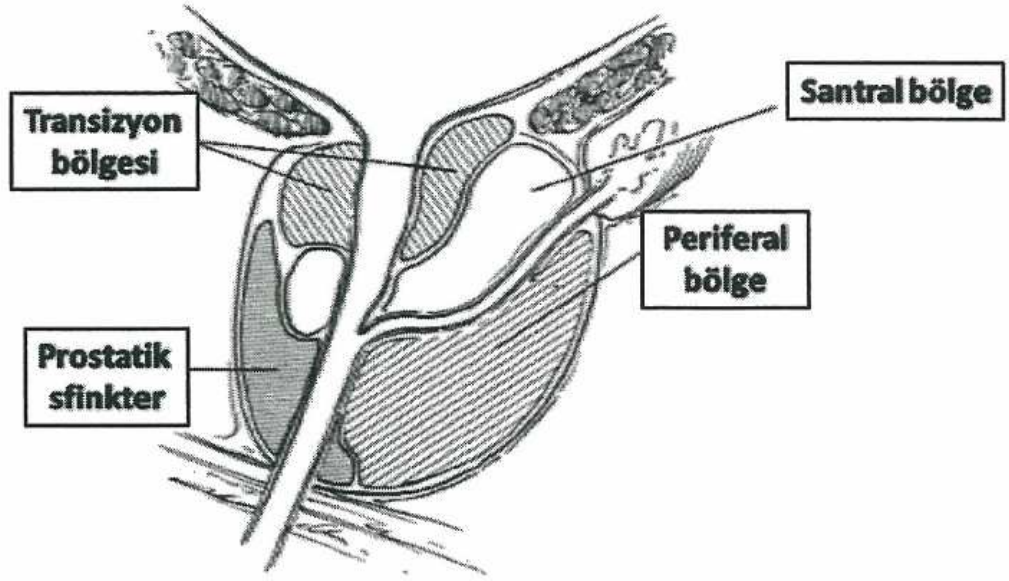
Prostat kanser insidansı 1995'den beri yıllık yaklaşık % 1.7 artış gösterirken, mortalite oranı 1994'den bu yana her yıl için yaklaşık % 4 azalmaya devam etmektedir (29).

Ülkemizde epidemiyolojik anlamda ilk ve tek olan insidans çalışması, İzmir ilinde yapılmıştır. Bu çalışmada prostat kanseri, akciğer, mesane, malign melanom dışı deri kanserleri, larinks kanserinden sonra en sık görülen 5. kanserdir ve 1995-1996 yılları arasında insidans 9.1/100000 bulunmuştur (30).

2.1.3. Prostatın Yapısı

Normal prostat 18 g ağırlığında, 3cm uzunluğunda, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında olup içinden prostatik üretra geçer (21). Prostatın %70'i glandüler ve %30'u fibromuskuler stromadan oluşur. Stroma kollajen ile bol düz kas içerir ve prostat kapsülü ile ilintilidir. Stromada yer alan düz kaslar bez yapıların çevresinde yoğunlaşmıştır ve ejakulasyon sırasında kasılarak prostetik sekresyonun üretraya boşalmasını sağlar. Prostatik üretra, prostatın uzunluğu boyunca daha çok ön yüze yakın olarak uzanır ve değişici epitel ile örtülüdür (31).

Preprostatik üretranın alt, arka ve yanlarını saran tranzisyonel bölge, prostat bez yapısının % 5-10'unu kapsar. Fibromuskuler bir bant ile prostatın diğer bez yapılarından ayrıldığı için transrektal ultrason ile kolayca belirlenebilir. Santral bölge, koni şeklinde ejakulatuvar kanalların çevresini sarar ve prostat bezlerinin % 25'ini kapsar. Bu bölgedeki bez yapılar embriyonik olarak Wolf kanalı kaynaklı olduğu için yapısal ve immünohistokimyasal olarak diğerlerinden farklıdır (32).



Şekil 2.1. İnsan prostatının yapısı (33) .

2.1.4. Risk Faktörleri

Yaş: Prostat kanserinin görülme sıklığı yaşla birlikte belirgin olarak artmaktadır. 50 yaş üstü erkeklerde hem görülme sıklığı hem de kanserden ölüm oranı yaşa bağlı olarak artar. 39 yaş altında görülme oranı 1/10.000 iken, 40-59 yaşlar arasında 1/139 ve 60-79 yaşları arasında ise bu oran 1/8'dir (34).

Heredite: Ailede prostat kanseri öyküsü olması, hastalığın gelişmesi için en büyük risk faktörü olarak kabul edilir ve genetik yatkınlık tüm yaygın kanserler arasında olası en güçlü risktir (35). Birçok çalışma prostat kanseri hastalarının yakını olan erkeklerde prostat kanseri insidansının normal populasyona göre arttığını göstermiştir. Tüm prostat kanserlerinin %9'unda ve 55 yaşın altındaki vakaların %45 'inde yüksek olasılıklı otozomal dominant geçiş varlığı gösterilmiştir. Babası ya da erkek kardeşine 50 yaşın altında prostat kanseri tanısı konulmuş bir erkekte prostat kanseri riski yaklaşık 7 kat artmıştır (36).

İrk: Değişik etnik gruplarda prostat kanseri insidansı geniş bir varyasyon gösterir. Görülme ve ölüm oranı İskandinav ülkelerinde yüksek iken Japon ırkında oldukça düşüktür. A.B.D' de yaşayan siyah erkeklerde insidans oldukça yüksek iken, aynı bölgede ve aynı sosyoekonomik düzeydeki beyaz erkeklerde daha düşüktür (37).

Diyet: Diyet ile yüksek oranda yağ alımının prostat kanseri insidansını arttırdığı düşünülmektedir. Bu hipoteze göre, diyetle alınan fazla miktarda yağ, seks hormonlarının sentezini arttırmakta bu da prostat bezinde kanser riskini arttırmaktadır. Bu hipotez sadece yağlar için değil, aynı zamanda yağda eriyen vitaminler (A, D, K) ve eser elementler (çinko) için de geçerlidir (38). Bazı çalışmalarda yüksek kalsiyum tüketiminin prostat kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu bulunmuştur (39). Likopen, selenyum ve E vitamininin antioksidan

etkileriyle, kanserde potansiyel bir negatif faktör olduklarına dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır (37, 38, 40).

Sigara: Sigara içiminin prostat kanseri ile ilişkili olduğu daha önce gösterilmiştir (41). Sigaranın derin inhalasyonu ya da çok içilmesi ile prostat kanser riskinin arttığı gösterilmiştir (42).

Androjen: Prostat tümörleri androjenlere aşırı derece duyarlıdır. Medikal ve cerrahi kastrasyon sonrası gerilerler. Afrikalı Amerikalılarda prostat kanseri insidansının yüksek olmasının, dolaşımdaki androjen seviyeleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca genç Afrikalı Amerikalılarda, Japon erkeklere göre $3\alpha,17\beta$ -androstendiol glukronid ve andosteron glukronid gibi androjen metabolitlerinin serumda daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bu metabolitlerin testosteronun 5α -redüktaz ile dehirotestosteron (DHT)'a dönüşüm düzeyini yansıttığına inanılır ve total testosterona göre intraprostatik androjen aktivitesini göstermede daha iyi bir marker olabileceği düşünülmektedir (21).

Genetik polimorfizm: Bir lokusta birden fazla allelin bulunması şeklindeki DNA nükleotid değişimlerine polimorfizm adı verilir. Allellerin genel popülasyondaki kromozomların %1'inden fazlasında bulunması "genetik polimorfizmi" oluşturur (21).

Prostat kanserinin yalnızca yaklaşık %10'unun nadir, yüksek penetran genlerle geçiş gösterdiğine inanılmasına rağmen, çok sayıda sık bulunan düşük penetran genlerin prostat kanseri gelişmesine katkıda bulunması daha olasıdır. Bu genler, diğer genlerle birlikte davranarak ya da bazı çevresel faktörlere hastanın cevabını etkileyerek prostat kanserinin gelişmesine zemin hazırlayabilmektedir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, spesifik gen polimorfizmi (örn. bir genin kendi fonksiyonunu değiştirebilen kalıtsal dizi varyantları) ve prostat kanseri gelişme riski arasında çok sayıda şaşırtıcı birliktelikler ortaya çıkarmıştır (21).

İnsülin benzeri büyüme faktörü: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) normal ve transforme prostat eriteli üzerinde hem mitojenik, hem de antiapoptotik etkiye sahiptir (43). Bazı veriler IGF-1'in prostat kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde yer aldığını göstermektedir. Artmış prostat kanseri riski ile plazma IGF-1 seviyesi arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (44).

2.1.5. Laboratuvar Bulguları

Prostat spesifik antijen (PSA), primer olarak prostat epitel hücrelerinde ve seminal sıvıda bulunan ve prostat kanseri tanısında, tedavi planlanmasında ve tedavi sonrası izlemde tümör biliminde bugüne kadar eşine az rastanmış bir başarı ve yaygınlıkla kullanılmış bir belirteçdir. PSA, prostat dışında çok az oranda periüretal bezler, endometrium ve normal meme dokusundan sentezlenir. 50 yaşını geçen erkeklerde iki yılda bir PSA tayinlerinin yapılması tavsiye edilmekte olup, her prostat kanserinde değerin yüksek bulunmayabileceği hatırlanmalıdır. 4.0 ng/ml'nin üzerindeki PSA değerleri prostat kanseri açısından incelenmeyi gerektirmektedir. PSA'nın çok küçük bir miktarı serbest (fPSA) olarak bulunmakta olup, büyük bir kısmı α -2 makroglobulin (A2M) ve α -1 antikimotripsine (ACT)

bağlıdır. Bunlar kandaki iki major serin proteaz inhibitörü olup total serum proteinlerinin %10'unu oluştururlar. PSA'nın yarılanma ömrü 2.2 ile 3.2 gün arasında değişmekte olup radikal prostatektomiye takiben 2-3 hafta içinde en alt seviyeye ulaşır (21).

2.1.6. Tedavi

İnsanların farklı kalıtsal özelliklerine eklenen farklı somatik mutasyonlar hem çok karmaşık hem de çok heterojen bir hastalık grubunun, kanserin, ortaya çıkmasına neden olur. Kanser genomunda meydana gelen değişiklikler tümörlerin gelişimi, metastatik karakteri, ilaçlara karşı verdikleri cevaplar gibi bazı ölçülebilir fenotipik özelliklerle karşımıza çıkar. Bu genetik ve fenotipik değişiklikler, normal hücrelerde büyüme, gelişme, ölüm gibi işlevleri düzenleyen sinyal iletim yollarında da bazı değişimlerin ortaya çıkmasına neden olur. Kanser hücrelerinde aktive olan potansiyel yollar hedefe yönelik tedavi girişimleri için belirlenebilmektedir. Hedefe yönelik tedaviler, seçici olmaları nedeniyle özgül-moleküler hasarı olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini öldürürken, normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devamına imkan tanır (45).

Genellikle günümüzde organa sınırlı prostat kanserinde, radyoterapi ± hormon tedavisi, brakiterapi ± hormon tedavisi, kriyoterapi, radikal prostatektomi, lokal ileri evrede radyoterapi ± hormon tedavisi, brakiterapi ± hormon tedavisi, radikal prostatektomi: radikal prostatektomi sonrası nüks durumunda radyoterapi, hormon tedavisi (devamlı veya aralıklı), metastatik hastalıkta hormon tedavisi (devamlı veya aralıklı), bifosfanatlar (zoledronik asit), radyoterapi (ağrı tedavisi), hormona dirençli hastalıklarda ise kemoterapi, kortikosteroid, bifosfanatlar (zoledronik asit) ve radyoterapi (ağrı tedavisi) uygulanmaktadır (46).

2.2. Kemoterapi

Günümüzde kanser tedavisinin en az bir döneminde ilaç tedavisi kullanılmaktadır. Kanserine ilaçla tedavisinden söz edildiğinde, ilk akla gelen ilaç grubu sitotoksik ajanlar yani "kemoterapi"dir. Hormonal tedavi, immunmodülatörler ve son yıllarda ilaç portföyüne giren tirozin kinaz inhibitörleri, antikorlar ve antianjiyogenik ajanlar gibi hedefe yönelik tedaviler kemoterapi ile birlikte veya ayrı olarak kanser tedavisinde rol alırlar. Sitotoksik kemoterapi bazı yayılmış kanserleri iyileştirirken, diğerlerinde tümörleri küçültüp belirtileri azaltır ve hatta bazen yaşam süresini uzatır (47).

Kemoterapi günümüzde dört temel klinik durumda kullanılmaktadır.

- Primer-indüksiyon kemoterapisi
- Neoadjuvan kemoterapi
- Adjuvan kemoterapi
- Lokal-rejyonel kemoterapi

Primer-indüksiyon kemoterapisi, ileri evre kanserle başvuran ve başka tedavi seçeneği olmayan hastalara uygulanan ilaç tedavisidir (47). Neoadjuvan kemoterapi cerrahi ve radyoterapi ile tedavi yapılabilen ancak sadece lokal tedavi ile başarı oranının düşük olduğu kanser türlerinde cerrahi ve/veya radyoterapiden önce ilaç uygulaması olarak tanımlanır (48). Kanserine ilaçla tedavisinde en önemli klinik

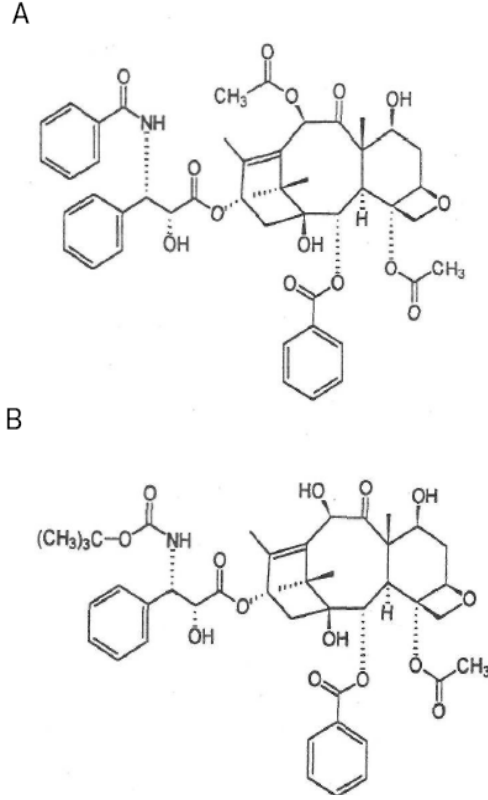
uygulamalardan biri lokal tedavi sonrası adjuvan kemoterapi verilmesidir (49). Hastalık nüksüne mikrometastazların yol açtığı varsayılarak lokal tedaviden sonra kemoterapi uygulanması ile mikrometastazların yok edilmesi, lokal ve sitemik nüksün azaltılarak genel sağkalımın azaltılması hedeflenmektedir. Ürolojik tümörlerde adjuvan kemoterapinin yararı henüz kanıtlanmamıştır (50).

Metastatik prostat kanserlerinde temel olarak kullanılan tedavi yöntemi cerrahi ya da medikal kastrasyon olmasına rağmen; bu hastaların çoğunda 18-24 ay içerisinde hormona direnç gelişmektedir (51). Bu hücrelerin hastalığın ilk oluştuğu dönemde mi varolduğu, yoksa sonradan mutasyonla mı geliştiği bilinmemektedir (52). Başlangıçta “androjen bağımlı” tümörler, tıpkı normal prostat epiteli gibi androjen yokluğunda gerilerler. Cerrahi ya da medikal kastrasyona rağmen büyümesine devam eden tümör “androjen bağımsız” olarak adlandırılır (53). Bu tümörler değişik hormonal yaklaşımlara yanıt verebilir. Değişik hormonal yaklaşımlara cevap vermeyen tümör “hormona dirençli” olarak kabul edilir. İlk aşamada androjen baskılayıcı tedaviler yapılan ve daha sonra ilerleyen prostat kanserlerinde en sık kullanılan yöntem antiandrojenlerin geri çekilmesidir. Bu aşamadan sonra ikincil hormonal tedaviler ve sitotoksik kemoterapiler yer almaktadır (54).

Ancak antiandrojen tedavisinin devam etmesine rağmen hastalık belli bir aşamadan sonra ilerler. Yapılan araştırmalar kastrasyona dirençli prostat kanserinde (KDPK) androjen reseptörleri aktivasyonu ve sinyalizasyonunun devam ettiğini göstermektedir (55-57). Dolayısıyla hastalığı hormona refrakter kabul etmek için öncelikle sekonder hormonal manüplasyonların yapılması gerekir. Bugün bu amaçla antiandrojen geri çekilmesi, yeni antiandrojenin eklenmesi, östrojenik ilaçlar, adrenolitik ajanlar ve yeni bazı ajanlar kullanabilmektedir (58, 59). Bugün bir taksan derivesi olan dosetaksel ile az da olsa bir sağkalım avantajı gösterilmiş olup bu sitotoksik ilaçla birlikte bu kanserin tedavisinde yeni bir dönemin başladığını söylemek yanlış olmayacaktır (8). Ayrıca, estrodiol fosfat ile nitrojen mustard'ın bileşiminden elde edilmiş olan estramustin fosfat 1966 senesinden beri ileri evre prostat kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır (9).

2.3. Dosetaksel

Taksol, yeni doğal antikanser bileşikler bulmak üzere Ulusal Kanser Enstitüsü (60) tarafından değişik birçok bitkinin tarandığı bir program kapsamında, ABD'de yetişen *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan 1971 yılında izole edilmiştir (61). Bu yıldan sonra üzerinde yapılan yoğun çalışmalar sonucunda taksol, 1983 yılında faz I, 1985 yılında faz II çalışmalarına alınmıştır (12). Taksol, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1992 yılı içinde ovaryum ve 1994 yılında meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır. Preparatı TAXOL (Bristol-Myers Squibb Company, New York, NY) olarak isimlendirilirken etken maddesine paklitaksel (Şekil 2.2.) adı verilmiştir (62).



Şekil 2.2. (A) Paklitaksel ve (B) dosetakselin kimyasal yapısı .

1985 yılında taksolün yarısentez ile temini çalışmaları sırasında, taxotere adı verilen bir taksol analogu sentezlenmiştir. 1990 yılında faz I, 1992 yılında faz II çalışmaları yapılmıştır. Taxotere 1996 yılında antikanser ilaç olarak ruhsatlandırılmıştır. Preparatı TAXOTERE (Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceutical, Inc., Colledgeville, PA.) olarak isimlendirilirken etken maddesine docetaxel (dosetaksel) adı verilmiştir (62). Dosetaksel faz I'e 1990 yılında girmiştir. Doz sınırlayıcı toksisite nötropeni olmuştur. Bazı vakalarda çok sık ve şiddetli olmamakla birlikte mukozitis ve ateş bildirilmiştir. 1992'de faz II çalışmaları başlamıştır. Dosetaksel faz II çalışmalarında premedikasyon uygulanmadan, 100 mg/m² dozda bir saatlik infüzyon şeklinde üç haftada bir tekrarlanarak uygulanmıştır (63-66).

Dosetaksel antitümör etkilerini, hücrede mikrotubullerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotubul toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir (13, 67).

Dosetakselin atılımı karaciğer ve safra yolu ile olmaktadır. Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi ile metabolize olmaktadır. Dosetaksel'de C6 ve C3'-para pozisyonları hidrosilasyona uygundur, fakat bu gerçekleşmemektedir. Dosetaksel'in major olarak dört metaboliti vardır; t-butil ester grubu sırasıyla alkol, aldehit ve aside okside olmaktadır. Dosetaksel'in metabolitleri esas bileşiklerine göre inaktif veya daha az sitotoksik özelliktedir. Bu ilaçla birlikte karaciğer enzim sistemlerini indükleyen ilaçların kullanılması dosetaksel metabolizmasını değiştirebilmektedir. Karaciğeri bozuk olan hastalarda değişen metabolizma ve atılımına bağlı olarak toksisite olasılığı artmaktadır (15, 68, 69).

2.4. Estramustin

Estramustin fosfat (estradiol-3-N-bis-(2-choloroethyl)-carbomate-17-beta-dihydrogen disodium phosphate) temel olarak estradiol ile nitrojen mustard kombinasyonundan oluşmuştur (70). Diğer bir ifade ile yapısal olarak bir hormon türevi ve alkilleyici gruptan oluşan bir kemoterapötik ajandır. Dolayısıyla teorik olarak “hormonal tedavi ve kemoterapi” imkanını -estrojenik ve antimitotik etkiyi aynı anda sağlayabilmektedir (71). Estramustin fosfat (EMP) kendine özgü çift yönlü etki mekanizmasına sahip bir antitümör ajandır (72). Estramustin, mikrotubul bağlı proteine veya tubuline bağlanarak mikrotubul fonksiyonunu inhibe ederek etkisini gösterir (73). Yapılan in vivo çalışmalarda hormonal ve hormonal olmayan etkileri gösterilmiştir (74). EMP metabolizmasının ürünü olan östron ve östradiol, antigonadotropik aktivite göstererek, testosteron düzeylerini cerrahi kastrasyon sonrası erişilen değerlere yakın düzeyde düşürür. Ana bileşiğin defosforilasyonu sonucu açığa çıkan sitotoksik metabolit estramustin, daha sonra estromustin’e metabolize olur; bu iki metabolitin tümör hücreleri üzerinde antimitotik etkileri vardır. Bu etkiler, metafaz aşamasında mikrotubulus oluşumu inhibisyonu ve interfaz aşamasında mikrotubulus yıkımına bağlıdır.

Mikrotubuluslar üzerindeki bu etki, in vivo olarak, insan prostat tümörü ksenograflarında da gösterilmiştir. Mikrotubulus polimerizasyonunun estramustin tarafından inhibisyonunun, tubulin ile doğrudan etkileşmeye bağlı olduğu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, estramustin ile mikrotubulusa bağlı proteinler (MAP) arasında da etkileşme olduğu gösterilmiştir (72).

Estramustin, serum testosteron düzeyinde diğer estrojenlere (diethylstilbestrol gibi) benzer şekilde önemli oranda azalmaya sebep olabilmektedir (71). Ancak asıl etki mekanizmasının “mikrotübül ilişkili proteinlere” bağlanmak suretiyle oluştuğu düşünülmektedir (11,14). Nükleer matriks düzeyinde bağlandığı ve DNA replikasyonunu etkilediği iddia edilmiştir. Ayrıca tubulin ile olan ilişkisinin bazı ilaçlarla birlikte kullanımı durumunda sinerjistik etki yarattığı gösterilmiştir (75). Öte yandan estramustin fosfatın “efflux pompası” yoluyla hücre içi ilaç birikimini etkileyerek “multidrug direnç” gelişmesini önlediği de savunulmuştur (76).

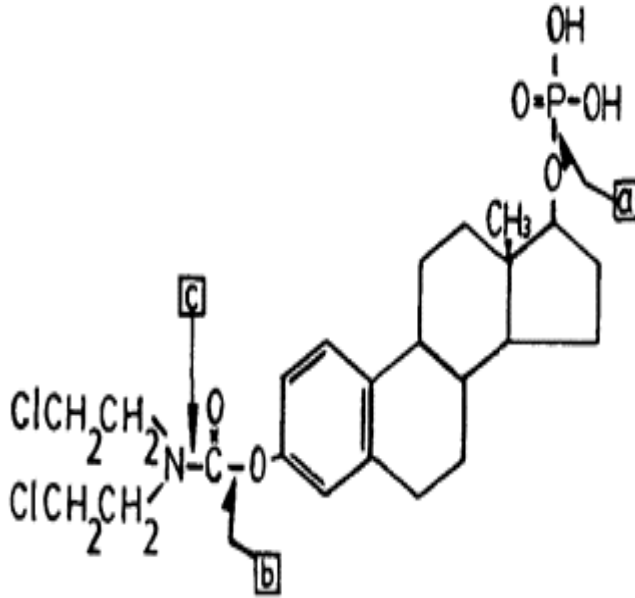
Bu sahip olduğu yapısal özellik estramustin fosfatın, prostat kanseri tedavisinde değişik amaçlarla yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Nitekim ilk olarak hormon dirençli prostat kanserinde ikincil hormonal tedavi seçeneği olarak kullanılmıştır (77). Daha 1970’li yıllarda çok merkezli çalışmalarda metastatik prostat kanserinde birincil tedavi olarak dahi denenmiştir. Bunun yanı sıra adjuvan veya neoadjuvan amaçla lokalize prostat kanserinde de çeşitli araştırmalarda yer almıştır. Ancak şüphesiz en önemli ve yaygın kullanımı önceleri tek başına daha sonraları çok farklı kombinasyonlarda hormon dirençli prostat kanserinde söz konusu olmuştur.

Klinik olarak kullanılan estramustin, proilaç halindedir. Gastrointestinal kanalda hızla defosforilasyona uğrayarak estramustin’e dönüşür ve oral uygulama sonrası plazmada değişmemiş EMP’ye rastlanmaz. EMP’nin proteine bağlanma oranı % 99’dur. Estramustin, plazmadaki major bileşik olan estromustin’e metabolize olur.

Estramustin fosfat halinde kullanılır ve EMP defosforile olduğu zaman aktif hale gelir ve estramustin olarak kana geçer. Estramustin fosfat hücrede aktif halde bulunmaz çünkü plazma membranını geçemez (72).

Estramustin'in, dirençli hücre dizilerinde P-glikoprotein fonksiyonunu modüle ettiği, bu yolla hücre içi ilaç birikimini artırarak, eşzamanlı olarak uygulanan sitotoksik ilaçların sitotoksitesini artırdığı gösterilmiştir. Bu modülatör etkinlik, in vitro insan prostat tümör hücrelerinde estramustin ile diğer ajanlar arasında bulunduğu belirlenen sinerjinin temelini oluşturabilir. Hem estramustin, hem de estromustin sitotoksik etki gösterir ve her ikisinin de proteine bağlanma düzeyleri yüksektir. Estromustin'in eliminasyon yarı-ömrü yaklaşık 80 saattir. Estramustin ve estromustin daha sonra yeniden metabolize olur ve sırasıyla östradiol ve östron'a dönüşürler. İntravenöz uygulama sonrası plazmada değişmemiş halde EMP bulunur, ancak hızla metabolize olur (eliminasyon yarı-ömrü: 1.2 saat) ve oral uygulama sonrasında olduğu gibi aynı metabolitlere dönüşür. Estromustin, intravenöz uygulama sonrasında da majör metabolittir.

Estramustin ve estromustin safra ve feçes yoluyla atılır, idrarda bulunmazlar. Östradiol ve östron ise daha sonra metabolize olarak, kısmen idrarla atılır. EMP tedavisi sonrasında, insan prostat tümör dokularında estramustin ve estromustin saptanmıştır. Hastalarda, estramustin ve estromustin'in tümör dokusundaki düzeyinin, plazma düzeyinden daha yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bunun nedeni muhtemelen, estramustin ve estromustin'in prostat tümör dokusunda varlığı gösterilen bir proteine bağlanarak burada tutulmasıdır.



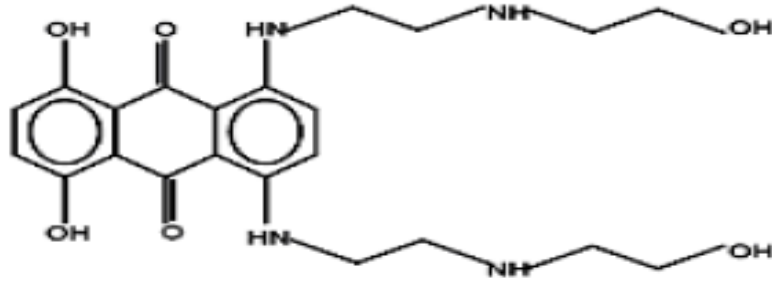
Şekil 2.3. Estramustin fosfatın kimyasal yapısı. Ok işaretleri (a) fosfataz, (b) estraz ve (c) proteaz ile bölünebilen bölgeleri gösterir (78).

2.5. Mitoksantron

Mitoksantron DNA zincirini kırmak, DNA'ya eklenmek, DNA sentezini inhibe etmek, DNA agregasyonuna yol açmak ve hücre siklusunu geciktirmek yoluyla etki gösterir. İn vitro antitümör aktivitesi yoğunlaşma ve maruz kalınan süreye bağlı olarak ve diğer antineoplastik ilaçlarla gösterdiği sinerji ile değişmektedir. Mitoksantron doz ve süreye bağlı olarak hücre siklus ilerlemede gecikmeye neden olur. En çok hücre siklusunun geç S fazında sitotoksiktir. Ancak, hücre siklusuna özgül değildir (79).

Mitoksantron DNA cleavable kompleks topoizomerazı stabilize ederek ve serbest radikaller oluşturarak DNA üzerinde kırıklar oluşturur. Aynı zamanda elektrostatik çapraz bağlanma ile DNA agregasyonu yapar. Mitoksantron'un siklik deriveleri DNA'ya kovalent olarak bağlanır ve bu da sitotoksik olabilir (80). Tümör hücrelerinde P-glikoprotein ekspresyonunun artışı sonucunda mitoksantrona direnç olabilir. Bunun yanında topoizomeraz II aktivitesindeki veya seviyesindeki değişiklik, DNA onarım mekanizmalarının geliştirilmesi ile mitoksantrona tümör hücre direnci gelişebilir. Mitoksantronun immunsupresif, antiviral ve potansiyel antiangiogenik aktiviteleri de farmakodinamik çalışmalarda gösterilmiştir (81, 82).

Mitoksantron yapısında, iki temel yan zincir ve düzlemsel trisiklik kromofor içerir. Yapıda bulunan yan gruplar, guanin ve DNA sekansı ile bağlanarak kimyasal reaktivite gösterebilmesi için önemlidir. Mitoksantronun DNA'ya bağlanabilmesi ise DNA kondenzasyonuna ve DNA replikasyonunun ve RNA transkripsiyonunun inhibe edilmesine neden olur.



Şekil 2.4. Mitoksantron'un kimyasal yapısı (10).

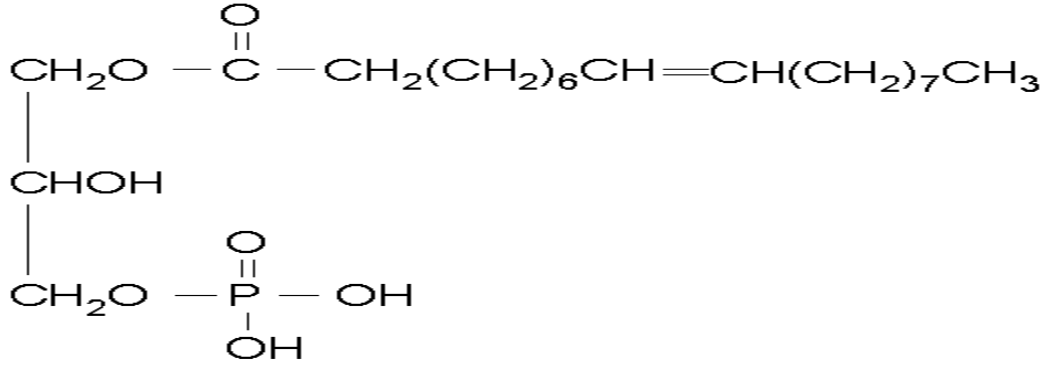
2.6. Lizofosfatidik Asit

Hücre membranları, başlıca yağ asidi ve gliserolden yapılmış fosfolipidlerden meydana gelmişlerdir. Gliserol, hidrofilik fosfat grubu ve lipofilik yağ asidi kuyruğuna bağlıdır. Bu sayede fosfolipidler amfipatik özellik kazanır. İki tabakadan oluşan fosfolipidler sulu ortamda kuyruk kuyruğa birleşerek lipid çift tabakasını oluştururlar ki bu hücre membranının temel yapısıdır (83). Her ne kadar başlangıçta yalnızca hücre membranının temel taşlarını oluşturması biliniyorsa da, günümüzde önemli hücre sinyalizasyon molekülleri olarak görülmektedir (84). 1989'da Corven ve arkadaşları (85) Lizofosfatidik asit (LPA) ve diğer fosfolipidlerin hücre membranının basit birer bileşeni olmadığını, bunun yanında biyolojik mediyatörler

olduklarını kanıtlamıştır. LPA (1-açıl-sn-gliserol-3fosfat), fosfolipid yapıdadır ve bir çok farklı fizyolojik olayda rol alır (86).

2.6.1. Lizofosfatidik Asidin Yapısı ve Biyokimyası

Lizofosfatidik asit, çeşitli hastalıklarda rol oynayan ve birden fazla biyolojik fonksiyonları olan en cazip fosfolipid mediatörlerden biridir. LPA küçük ve yapısal olarak en basit gliserofosfolipiddir. Bir gliserol, bir fosfat baş grubu ve bir yağ asidi içerir (87). Lizofosfatidik asit doğal olarak R konfigürasyonda bulunur. Gliserol omurgası üzerine 1. ve 2. pozisyonunda konjuge yağ asitleri bulunabilir. Bunlara ek olarak, zincir çeşitli kimyasal bağlarla gliserol omurgasına bağlanabilir. Gliserol omurgasına açıl, alkil veya alkenil bağları 1-pozisyonundan bağlanabildiği gibi, 2-pozisyonundan da açıl bağı oluşturabilir. Zincirde açıl bağı, 18 karbonlu yapı ve tek çift bağı doymamış yapı en sık kullanılan ve piyasada mevcut LPA formudur. Bu forma oleil-LPA veya 18:1 LPA denir. Bu LPA diğer uzun zincirli fosfolipidlere göre suda daha çok çözünür. Çünkü serbest hidroksil ve fosfat grubuna sahiptir (88, 89).

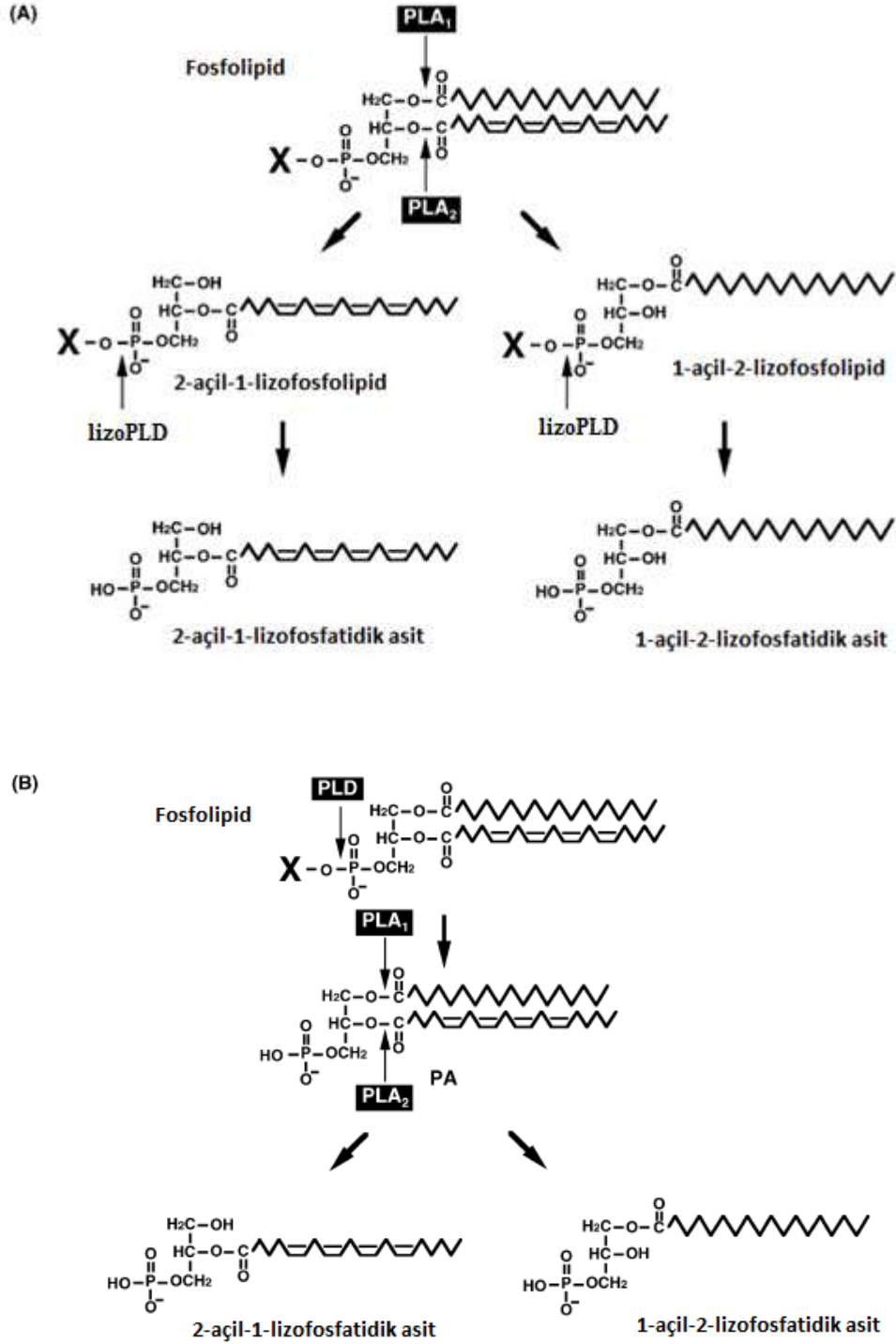


Şekil 2.5. Lizofosfatidik asidin kimyasal yapısı (90).

2.6.2. Lizofosfatidik Asit Üretimi, Salınımı ve Yıkımı

Reseptör bağımlı hücresel cevapların indüklenmesi için LPA ekstraselüler alanda kritik konsantrasyonda bulunmalıdır. Lizofosfatidik asidin sentez, taşınma ve degradasyonundan sorumlu enzim ve proteinlerin kontrolü LPA'nın biyoyararlanımını etkiler. Şekil .2.6. da LPA'nın sentez ve yıkımı için olası yollar gösterilmiştir. Bir çok çalışma fosfatidik asidin (PA), fosfolipaz A aracılığıyla degrade olması sonucu oluştuğunu gösterse de, biyolojik yollar henüz tam aydınlatılamamıştır (91). Bu yolak LPA üretimi için en basit yoldur. Çünkü fosfatidik asit aktive olmuş hücrelerde sıklıkla üretilir (92). Fosfolipaz C (PLC) ve diaçilgliserol (DAG) kinaz etkileriyle PA oluşur. Diaçilgliserolün bir lipaz etkisiyle monoaçilgliserole (MAG) deaçile olduğu öne sürülmektedir, bu sayede daha ileri bir deaçilasyon ve fosforilasyona uğrayarak LPA oluşmaktadır (93). Lizofosfatidik asidin sentezi için bir başka olasılık doğrudan fosfolipaz D (PLD) etkisiyle PA'ten sentezidir. Bakteriyel PLD hedef hücrelerinin dış membran tabakasında, lizofosfatidil kolinden (PLC) LPA sentezlerler. Normal hücrelerde LPA oluşumu fiziksel karmaşa durumunda veya plazma membran reseptörlerinin yada diğer yüzey proteinlerinin uyarılmasıyla başlar ve fosfolipazlar gibi kritik enzimler aktive olur.

Bunların aksine tümör hücreleri kendiliğinden LPA sentezleyebilir. LPA'nın belirli hücre türlerinden (epitel hücreler, fibroblastlar, makrofajlar ve bazı tümör hücreleri) aktivasyona bağlı olarak salındığı gösterilmiştir (94).



Şekil 2.6. Lizofosfatidik asit yolakları (A: PLA₁/PLA₂-lizoPLD yolağı, B: PLD-PLA₁/PLA₂ yolağı) (PLD: fosfolipaz D, PLA₁: fosfolipaz A₁, PLA₂: fosfolipaz A₂, lizoPLD: lizofosfolipaz D) (95).

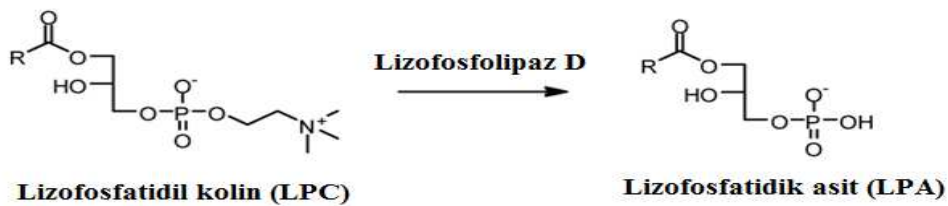
Aktive olmuş trombositler belirli oranda ekstraselüler LPA oluşturabilirler ki kandaki LPA'nın başlıca kaynağı bu yoldadır. Serum LPA konsantrasyonu mikromolar düzeydedir. Eichholtz ve arkadaşlarının (96) çalışması Sano ve arkadaşları (101) tarafından eleştirilmiştir ve LPA konsantrasyonunun kesin bir miktar tayini olmadığını belirtmişlerdir. Sano ve arkadaşları (97) trombositlerce üretilen LPA'nın çoğunluğunun trombositlerin dış kısmında meydana geldiğini öne sürmektedirler. Bu araştırmacılara göre, LPA'nın az bir miktarı trombositlerde oluşmaktadır. LPA üretiminin büyük bir kısmı membran ve serum fosfolipidlerinin PLA1, PLA2 ve fosfolipaz aracılığıyla olmaktadır (97). Fosfolipaz, kolin türevi fosfolipid mediyatörlerini lipid fosfat türevi mediyatörlere dönüştürür. Böylece lysoPLD periferel dokulara LPA sağlayabilir.

LPA hücre içindeki ve dışındaki lipid bağlayıcı proteinlere bağlanır ve taşınır. Proteinlere bağlanması serbest LPA konsantrasyonunu regüle eder. Böylece toksik düzeyler önlenmiş olur (98). Plazmada LPA büyük ölçüde albumin ve lipoproteinlere bağlı olarak bulunur. Albumin LPA için yüksek kapasite ve düşük afiniteli bir depodur. Bu şekilde, hücre dışı serbest LPA havuzu bölgesel olarak veya dolaşımdaki kan aracılığıyla hücreleri aktive eder. Albumine bağlanmak suretiyle LPA, serum fosfolipazlarınca sindirilmekten kurtulmuş olur. Olası yıkım yolları arasında lizofosfolipaz aracılığıyla deaçilasyonu ve lizofosfataz ile defosforilasyonu sayılabilir. Bu enzimler yeni potansiyel sinyal moleküllerini oluşturabilir. Lizofosfatidik asit, LPA açıltransferaz ile PA'ya, fosfotidat fosfohidrolaz ile monoaçilgliserole ve lizofosfolipazlar ile gliserol-3fosfota hızlı bir şekilde dönüşebilir (99).

2.6.3. Lizofosfolipaz D

Lizofosfolipaz D (lizoPLD), LPA sentezlenmesinde anahtar enzimdir. LPA ekstraselüler sinyal molekülü olarak davranan lipid fosfat esteri yapısındadır (100). İlk lizoPLD aktivitesi Wykle ve Schremmer tarafından plasmojen sentezi çalışması sırasında keşfedilmiştir. Bu enzim fare beyin mikrozomlarında bulunmuştur. Bu çalışmayı takiben farklı hayvan dokularında ve bazı bakterilerde lizoPLD aktivitesi gözlenmiştir (101). LizoPLD, LPC'yi dönüşüme uğratarak fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonlarını gösterir [Şekil(1)] (102).

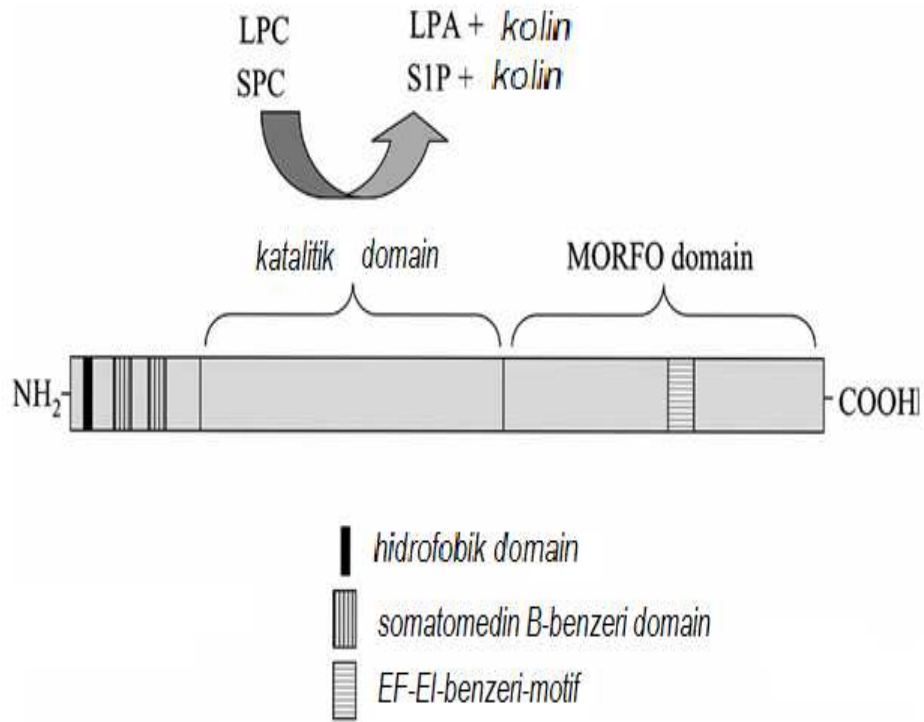
Lizofosfolipaz D bir pre-pro-enzim olarak sentezlenir ve proenzim olarak salınır. İntraselüler lizoPLD optimum aktivite için Ca^{2+} veya Mg^{2+} iyonlarına ihtiyaç duyar. Bununla birlikte plazmada bulunan lizoPLD, Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} veya Ni^{2+} gibi metal iyonlarına ihtiyaç duyar (103).



Şekil 2.7. Lizofosfolipaz D aracılığı ile lizofosfatidil kolinden lizofosfatidik asit oluşum reaksiyonu (104).

İnsan plazmasından ve fetal sığır serumundan saflaştırılan lizoPLD'nin, tümör hücresi motilite uyarıcı faktörü olarak izole edilen fosfodiesteraz (NPP2)/pirofosfataz ektonükleotidi olan ototaksin'in çözünür formuyla özdeş olduğu bulunmuştur. Ototaksin, melanoma hücre süpernatantlarından izole edilen tümör hücresi motilite uyarıcı faktördür. Ototaksin etkisini 5'-nükleotid pirofosfataz ve fosfodiesteraz aktivitesi aracılığıyla gerçekleştirir (105). LizoPLC için ölçülen Km değerinin sentetik nükleotid substratı için belirlenen Km değerine göre daha düşük olması nedeniyle, lizoPLD için fizyolojik substrat olarak LPC'in daha uygun olduğu gösterilmiştir. Rekombinant ototaksin, özellikle LPC varlığında çok çeşitli hücre dizilerinde proliferasyonu ve kemotaksiyi çarpıcı bir şekilde arttırmıştır (105).

Lizofosfolipaz D amino terminaline yakın bölgede hidrofobik domaine sahiptir. Bundan dolayı lizoPLD pre-pro enzim olarak sentezlenir ve proteolitik işlem görmüş protein olarak salınır. İki tane sisteince zengin somatomedin B-benzeri domain ise hidrofobik domaine yakın kısımdadır. LizoPLD/NPP aktivitesi için gerekli olan katalitik domain kısım ortadadır. Nükleaz benzeri domain ise karboksil terminale yakındır (Şekil 2.8) (106).

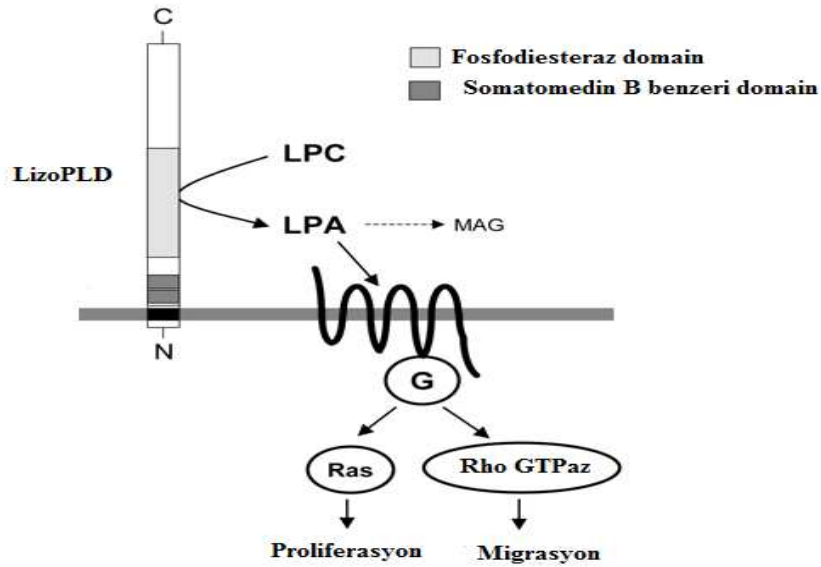


Şekil 2.8. Lizofosfolipaz D'nin yapısı. (LPC: lizofosfatidil kolin, LPA: Lizofosfatidik asit, SPC: fingoilfosfatidilkolin, SIP: Sfingozin-1-fosfat, MORFO: oligodentrosit düzenlenme ve fokal adhezyon organizasyonu) (106).

Kanser hücrelerinin yayılması ile enzimin upregülasyonu arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Lizofosfolipid ekspresyonunun artması ile kanser hücrelerinde LPA üretimi artar (106).

2.6.4. Lizofosfatidik Asit Reseptörleri

Lizofosfatidik asit etkilerini geniş doku dağılımı gösteren G protein bağlı reseptörleri (GPCR) aracılığıyla göstermektedir. Lizofosfatidik asit reseptörleri birçok hücre tipinde G proteini bağlı reseptörleri aracılığıyla proliferasyon, farklılaşma, migrasyon ve apoptozis gibi biyolojik cevapların oluşmasına neden olur. Ayrıca, kanser hücrelerinde de sağkalım ve proliferasyonda rol alır (Şekil2.9). Örneğin androjen bağımsız insan prostat kanseri PC3 hücrelerinde, LPA1 reseptörü LPA aracılı mitojenik sinyalde etki gösterirken, LPA2 ve LPA3 reseptörleri de hücre sağkalımında etki gösterir (107-109).



Şekil 2.9. Lizofosfatidik asidin lizofosfolipaz D tarafından üretilmesi ile lizofosfatidik asidin, G proteini bağlı reseptörlere bağlanarak hücrel cevap oluşturması (MAG: monoaçilgliserol, LPA: lizofosfatidik asit, LPC: lizofosfatidil kolin, lizoPLD: lizofosfolipaz D) (110).

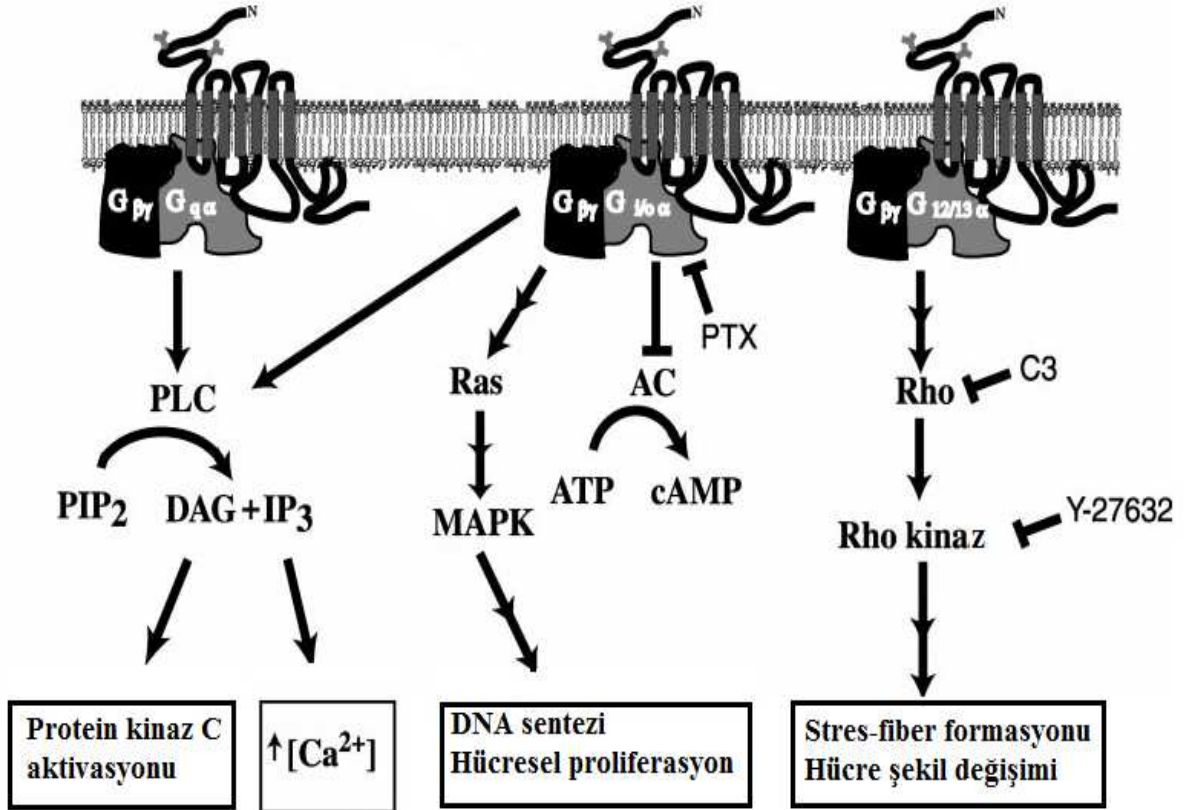
Şimdiye kadar tanımlanan yedi tane LPA reseptörü vardır. Bunlardan üçü endotel hücresi farklılaşma geni (Edg) ailesine aitken (LPA1/EDG2 , LPA2/EDG4 ve LPA3/EDG7), diğer dört reseptör non-Edg'dir (GPR23/p2y9/LPA4, GPR92/LPA5, GPR87 ve P2Y5) (111, 112). Lizofosfatidik asit sinyalinin başlama basamağı olarak heterotrimerik G proteini tipleri olan Gq, Gi ve G12/13 kabul edilmiştir. Gq'nun aktivasyonu fosfolipaz C'yi stimüle eder. Fosfolipaz C'nin stimülasyonu DAG ve IP3 oluşumuyla sonuçlanır. Protein kinaz C aktive olur ve intrasellüler kalsiyum mobilizasyonu gerçekleşir. Lizofosfatidik asidin indüklediği kalsiyum mobilizasyonu, hem pertussis toksin duyarlı Gi hem de fosfolipaz C'yi aktive eden PTX-duyarsız Gq aracılığıyla gerçekleşebilir (113) .

Pertussis toksin duyarlı – Gi , mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazların (MAPK) aktivitesini güçlendirir ve hücrede intrasellüler siklik adenozin

monofosfat (cAMP) seviyelerini azaltır. Lizofosfatidik asidin proliferatif etkileri Gi proteini üzerinden gerçekleşen MAPK aktivitesi ile gerçekleşir. G protein bağlı reseptörleri ile MAPK arasındaki ilişki bir çok çalışmada tanımlanmıştır. Gi'nin $\beta\gamma$ dimerik subünitinin MAPK'ın aktivasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. α subünit ise adenilil siklaz inhibisyonuna aracılık eder.

G12/13'ün aktivasyonu aktin aracılı sitoskeletal yeniden yapılanmayı başlatan small GTPase Rho'yu mobilize eder. Lizofosfatidik asit, Rho'yu $G_{\alpha 12/13}$ aracılı yolla aktive eder. Rho (Ras-related small GTPase), LPA'nın aktin stres fiber formasyonu, fokal adhezyon komplekslerinin birleştirilmesi ve nöron retraksiyonu gibi etkilerinde Rho aracı moleküldür.

Hücre proliferasyonunun LPA ile indüksiyonu, Gi ve G12/13 yollarının koordinasyonuna ihtiyaç duyar (107).



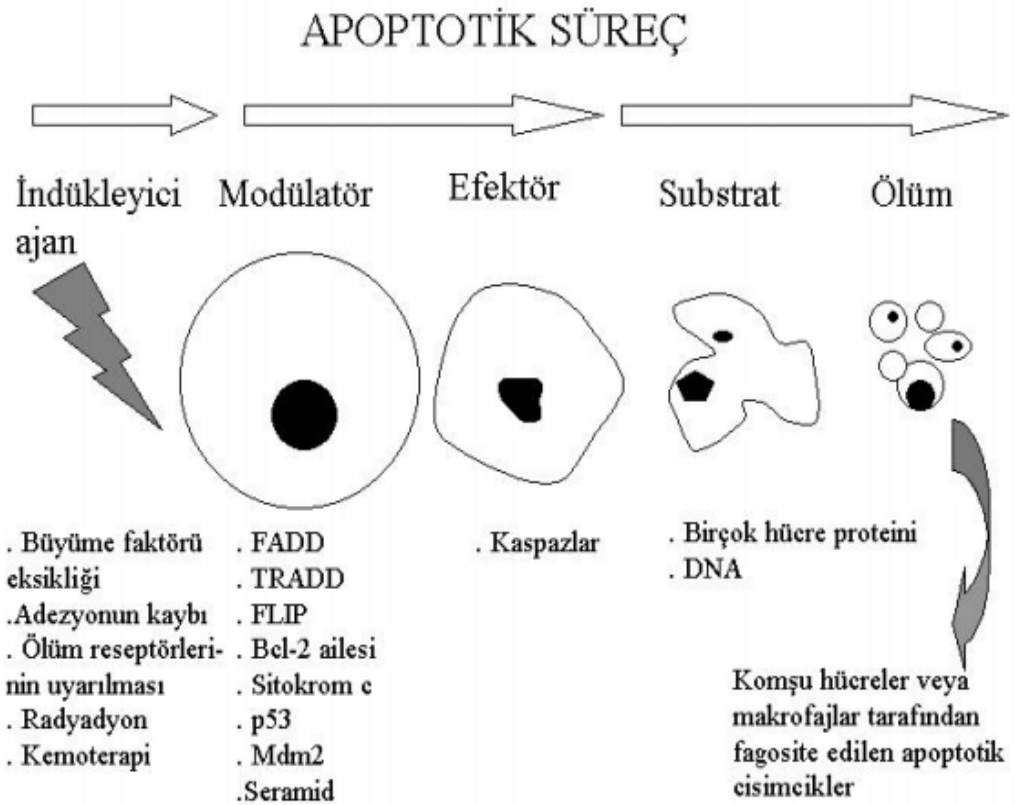
Şekil 2.10. Lizofosfatidik asit sinyal yolağı (PLC: fosfolipaz C, PIP_2 : fosfatidilinozitol difosfat, DAG: diaçilgliserol, IP_3 : inozitol trifosfat, MAPK: mitojen aktif protein kinaz, AC: adenilil siklaz, PTX: pertusis toksin,) (107).

2.7. Apoptozis

Hücrelerin yaşamı ve ölümü arasındaki dengenin sağlanmasına temel oluşturan mekanizmalardan biri programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozistir. Bu tanım 1972 yılında Kerr ve arkadaşları (114) tarafından ortaya atılmıştır. Apoptozis, Yunanca'dan köken alan bir sözcüktür. Birçok hücre tipinde ve değişik

dokularda görülen apoptozis, hücre ölümü ile sonuçlanan belirli morfolojik değişiklikler ile ortaya çıkar. Bu değişiklikler nekroz sonucu gelişen hücre ölümünden farklıdır (115, 116).

Apoptozisde kromatin kondenzasyonu, desmozomal bağlantı yıkımı, hücre yüzeyindeki spesifik yapı taşlarının kaybı ve diğer hücrelerle temas özelliğinin kaybolması söz konusudur. Hücre membranı intakt olmakla beraber bol kıvrımlı bir hale geçer. Mitokondri porlarının açılmasını takiben litik süreç başlar ve apoptotik cisimcikler oluşur. Bu cisimcikler mikroçevrede mevcut olan fagositlerin içine alınır ve lizozomal yol ile hızla yıkılırlar. Dolayısıyla apoptozis sürecinde hücre içeriğinin hücre dışı ortama salınımı söz konusu değildir (115, 116).



Şekil 2.11. Apoptozisin genel görünümü (117).

2.7.1. İntrinsik Apoptozis Yolağı

Bu yolda, apoptotik sinyal iletimi mitokondri aracılı olarak gerçekleşir. Hücreye gelen sinyal dış mitokondri membranını uyarır ve mitokondriden proapoptotik moleküllerin salınımına yol açar. Bu moleküller sitokrom c ve Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases) proteinleridir. Daha sonra sitosolde sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ve prokaspaz-9 ile birlikte apoptozom oluşumuna katılır. Prokaspaz-9 apoptozom içinde aktif formuna dönüşür. Kaspaz-9, bu yolağın aktivasyonunda “başlangıç” kaspazı olarak bilinmektedir ve o da diğer kaspazları (kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7) aktive etmek suretiyle apoptozis sürecini tetikler (115, 116).

Apoptozisi uyaran etkenler, DNA hasarı oluşması veya hipoksi, onkoprotein aktivasyonu ve büyüme faktörü eksikliği gibi hücrede stres yaratan değişikliklerdir. İyonize radyasyon veya ultraviyole ışın etkisiyle DNA da çift zincir kırıkları meydana gelir. DNA hasarı, protein kinazları harekete geçirir ve bu kinazlar da hedef proteinlerin fosforilasyonunu katalizler. DNA protein kinaz (DNA-PK) ve MAPK'lar gibi protein kinazların önemli hedeflerinden biride p53 tümör baskılayıcı proteindir. P53 fosforile olunca, p21 ve GADD45 proteinleri üzerine pozitif düzenleyici etki yapar ve hücre döngüsü duraklamaya uğrar (116)

2.7.2. Ekstrinsik Apoptozis Yolağı

Bu apoptotik sinyal yolu, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığı ile uyarılır. Ölüm reseptörleri hücre membranında yerleşim gösteren proteinlerdir ve ligandları ile bağlanınca apoptozisi uyarırlar. Bu reseptörler TNF (tümör nekroz faktörü) reseptör ailesinde yer alırlar. Yedi adet ölüm reseptörü (FAS, TNF-R1, DR-3, TRAIL-R2, DR-6, EDA-R ve p75NTR) tanımlanmıştır (116).

Nüklear faktör kappa B (NFkB) bir transkripsiyon faktörüdür. Nüklear faktör kappa B'nin apoptozis, metastaz ve anjiyogenez sürecinde önemli rolü vardır (115). Nüklear faktör kappa B'nin antiapoptotik etkisi tümör progresyonunda etkili olmaktadır. Nüklear faktör kappa B uyarısı bir çok dış etken ile tetiklenebilir. Bunlar arasında TNF- α , interlökin1, kemoterapötikler, bakteriyer lipopolisakaritler, radyasyon ve enflamasyon sayılabilir.

2.7.3. Kaspazlar

Kaspazlar, proteolitik etki gösteren moleküllerin oluşturduğu bir gruptur ve apoptozisde ortaya çıkan morfolojik değişiklikleri tetiklemektedirler. İnsan hücrelerinde bir düzineden fazla kaspaz tanımlanmıştır (118). Bu proteinler, normal koşullarda hücrenin sitoplazmasında inaktif zimojen (inaktif proenzim) formunda bulunurlar ve prokaspaz olarak adlandırılırlar. Prokaspazların aktif kaspazlara dönüşümü hücreye ölüm uyarısının gelmesini takiben proteolitik bir işlem ile olur. Kaspazlara ihtiyaç duyulduğunda yeniden sentezlenmeleri gerekmez. Apoptozis tetikleyen başlangıç sinyalinin ardından, sitoplazmadaki proenzimler aktif kaspaz formuna geçerler ve yaklaşık bir saat içinde hücre ölümü gerçekleşir (119).

2.7.4. Apoptozisin Kontrolü

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgündür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Lizofosfatidik asit gibi sinyal moleküllerinin etkisiyle de hücrede kalsiyum artışı gerçekleşir ve apoptosis yolaklarının uyarılmasını sağlar (117, 120). Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmı (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs) apoptozisi indükler, bir kısmı (Bcl-2, Bcl-XL) ise inhibe eder. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo- veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu, bu ailenin proapoptotik

ve antiapoptotik üyelerinin rölative oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax (ikisinin oranı), bazı hematolojik malignansilerde prognostik markır olarak kullanılmaktadır. Çünkü, oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir.

Seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünölmektedir. p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53'ün apoptozisi indüklemesi, Bax'ın ekspresyonunu artırması ve böylece Bcl-2/Bax oranını değıştirmesi yoluyla gerçekleşir.

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (AIF, apoptozis uyarıcı faktör) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir. Oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat, AIF'ün etkilediğı nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir. Kaspaz'lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sisteinin yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir (117).

Apoptozisde düzenleyici rolü olan proteinler üç grupta incelenir:

1. Hüresel FLICE- inhibitör protein (cFLIP)

Apoptozis yolağına hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aşamasında etki ederler. DISC'e bağlanırlar ve kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe ederler. Buna göre cFLIP ekstrinsik yolağın fonksiyonel inhibisyonuna yol açmaktadır.

2. Bcl-2 protein ailesi

Bu ailedeki proapoptatik proteinler (Bax, Bid, Bad, Bim, Bcl-2 ve Bcl-X_L) ise antiapoptotik özellik taşırlar. Bu proteinler intrinsik yolağın düzenleyici molekülleridir.

3. Apoptozis proteinleri inhibitör ailesi (IAP)

Bu moleküller kaspazlara bağlanırlar ve kaspazların aktivitesini inhibe ederler (121).

2.7.5. Apoptozis ve Ürolojik Tümörler

Kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi etkilerini apoptozisi indükleyerek gösterirler. Tümör dokusu heterojen bir hücre popülasyonudur. Genotoksik ajanlar verildiğinde duyarlı hücreler ölürken dirençli klonların çoğalması ve tedavi sürecinde yeni genetik mutasyonların gelişmesi kanserin tedavisinde önemli bir başarısızlık nedenidir.

Ürolojik tümörlerde de apoptozisdeki sinyal yolları ve molekülleri önemli tedavi hedefleri arasında yerini almaktadır. Lokalize prostat kanseri cerrahi veya radyoterapi ile etkili biçimde tedavi edilmektedir. Ancak, ilerlemiş prostat kanserinde mortaliteyi azaltmak için tedavide yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Prostat kanserinin ilerlemesi, apoptozisle ilişkili birçok genin işlevinin bozulması ile bağlantılıdır. Dolayısıyla tedavide proapoptotik sinyal yollarının hedeflenmesi prostat kanseri açısından önemlidir (121, 122).

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan PC3 hücre dizileri American Type Tissue Culture Collection (ATCC)'a ait olup, Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU'ndan temin edilmiştir. PC3 hücrelerinin özellikleri Tablo 3.1'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.1. Bu çalışmada kullanılan prostat kanseri hücre dizisinin özellikleri (ATCC).

Hücre dizisi	Kökeni	Büyüme özellikleri	Morfoloji	Androjen bağımlılığı
PC3	İnsan prostat adenokarsinoma	Yapışan hücre	Epitelyal	Yok

3.1.1. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar

- RPMI-1640 sıvı besiyeri (Sigma R0883):** Fenol kırmızısı içerir, L-glutamin içermez. Son kullanma tarihine kadar +4°C'de saklandı.
- L-Glutamin (200 mM) (Sigma G3126):** 1,46 g L-glutamin hassas terazide tartıldı ve serumsuz medyumda çözülerek hacim 50 ml'ye tamamlandı. Daha sonra kahverengi steril bir şişede -20°C'de saklandı. Besiyere eklenirken son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde ayarlandı.
- Fetal sığır serumu (FBS) (Biochrom 02S0113):** 100 ml'lik şişelerde ve ısıyla inaktive edilmiş halde temin edildi. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklandı. Toplam besiyerinin %10'unu oluşturdu.
- Antibiyotik antimukotik çözelti (Sigma A5955):** 100 ml'lik şişede ve 100 kat konsantrasyon halinde temin edildi. İçinde 10000 U/ml penisilin sülfat, 10 mg/ml streptomisin sülfat ve 25 µg/ml amfoterisin B antibiyotik kokteyli bulunmaktadır. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklandı.
- Tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (Tripsin-EDTA) (Sigma T4049):** 2.5 g/l tripsin ve 0.5 g/l EDTA içermektedir. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklandı.
- Fosfat tamponlu tuz (PBS) (0.1 M) (pH:7.2-7.3):** 2.68 mM KCl, 136,9 mM NaCl, 1,47 mM KH₂PO₄ ve 8.06 mM Na₂HPO₄ içerir.

Hazırlanışı: 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄ ve 2.88 g Na₂HPO₄.12H₂O tartıldı ve 1 litrelik beher içinde bidistile su ile çözüldü. pH'sı ayarlandıktan sonra balon jode hacim 1 litreye tamamlandı. 121°C'de 20 dakika otoklav edildi ve +4°C'de saklandı.

g) Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck 109678): 1litrelik şişede temin edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

h) Hücre dondurma çözeltisi: %5 DMSO içeren medyum steril bir tüpte hazırlandı ve hücre pelleti üzerine 1 ml eklendi. Bu solüsyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.

3.1.2. Besiyerinin Hazırlanması

Besiyerinin hazırlanması için kullanılan tüm çözeltiler su banyosunda 37°C'ye getirildi. RPMI-1640 sıvı besiyerinden 120 ml alınarak başka steril şişeye boşaltıldı. Hazırlanmış olan L-glutaminden 10 ml alınıp şişeye eklendi (medyumun total hacminin %1'ini oluşturmaktadır ve medyumdaki konsantrasyonu 2 mM'dır). Geri kalan L-glutamin -20°C'de saklandı. Antibiyotik-antimukotik solüsyondan 10 ml kadarı besiyeri şişesine eklendi (medyumun total hacminin %1'ini oluşturmaktadır). Geri kalan 90 ml'lik antibiyotik solüsyonu 9 adet steril mavi kapaklı 15 ml'lik tüpe eşit olarak paylaştırılıp -20°C'de saklandı. 100 ml'lik fetal sığır serumunun (FBS) tamamı RPMI-1640 sıvı besiyerine eklendi (medyumun total hacminin %10'u oluşturmaktadır). Hazırlanan sıvı besiyeri (1L) 100 ml'lik steril şişelere eşit olarak paylaştırıldı ve kullanılmadığı sürece +4°C'de saklandı.

3.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması

PC3 hücreleri 37°C'de, %5 CO₂ ve nemli hava içeren karbondioksit inkübatöründe %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren, kullanılan hücrelere uygun steril besiyeri kullanılarak çoğaltıldı. Hücrelerin flastaktaki sayısı çok arttığı zaman, yapıştıkları flastaktan kaldırılarak yeni flastklara pasajlandı. Pasajlama işleminde tripsin enzimi ile kaldırma yapıldı. Enzimin kullanılmadığı durumlarda kullanılan diğer pasajlama yöntemi uygulandı ve kazıyıcı (scraper) denilen bir malzeme kullanılarak hücrelerin flastktan kazınması ile kaldırma işlemi yapıldı.

PC3 hücrelerinin çoğaltılması işleminde ilk olarak RPMI-1640 medyumunu flastktan uzaklaştırıldı ve atıldı. Tripsinin daha iyi etki gösterebilmesi için birkaç ml serumsuz medyum eklendi. Hücre içi artıkların serumsuz medyum ortamına geçebilmesi için birkaç dakika inkübatörde bekletildi. Bu işlemin ardından serumsuz medyum ortamdaki uzaklaştırıldı ve 75 cm²'lik flastk yüzeyi için yaklaşık 5 ml tripsin eklendi. Tripsin eklenmesinin ardından 5-6 dakika inkübatörde bekletildi ve hücrelerin yapıştıkları flastktan ayrıldıkları gözlenir gözlenmez taze medyum eklenerek pipetaj yapıldı ve hücreler yeni flastklara dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe, uygun medyum içinde inkübe edilerek çoğaltıldı.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı uygun şekilde donduruldu. Hücreler flastktan uygun şekilde kaldırıldı ve medyum eklenerek

500xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet %95 tam hücre medyumuna ve %5 (v/v) DMSO'dan oluşan dondurma medyumuna içerisinde tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonları cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 4 saat -80°C 'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

3.1.5. Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Bu işlem şu şekilde gerçekleştirildi: Hücreleri içeren cryo tüp 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü, kontaminasyon olasılığını azaltmak için cryo tüpler suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde (yaklaşık 2 dakika) yapıldı. Cryo tüplerin içeriği çözülür çözülmez su banyosundan uzaklaştırıldı ve dış yüzeyi alkolle temizlendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Flaska aktarılan taze medium üzerine hızlı bir şekilde cryo tüpteki hücre süspansiyonu eklendi ve hücreler 37°C 'de, %5 CO_2 ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe üretildi.

3.2. Lizofosfatidik Asit, Dosetaksel, Estramustin ve Mitoksantron'un Sitotoksikite Çalışmaları

3.2.1. Lizofosfatidik asit ve ilaçların hazırlanması

Yapılan denemelerde hücreler, belirtilen sürelerde ilaç ile muamele edildikten sonra, 37°C 'de %5 CO_2 ve %95 nemli ortamda karbondioksit inkübatöründe üretildi. İlaçlar belirlenen çözücülerin ilaç şişelerine eklenmesi ile hafifçe çalkalanarak çözüldü. İlaçların çözülmesi için kullanılan çözücüler, kontrol olarak ekilen hücre gruplarına da eklendi.

Lizofosfatidik asit (LPA) (5 mg) ($5.7 \times 10^3 \mu\text{M}$) (Sigma L7260): 2 ml kloroform:metanol:asetik asit (v:v:v) (95:5:5) çözeltisinde çözüldü ve stok çözelti olarak -20°C 'de saklandı.

Dosetaksel (5 mg) ($6.18 \times 10^3 \text{ mM}$) (Sigma 01885): 100 μl etanol çözeltisinde çözüldü ve stok çözelti olarak -20°C 'de saklandı.

Estramustin (5 mg) ($8.86 \times 10^3 \mu\text{M}$) (Sigma E0407): 1 ml su içinde çözüldü ve stok çözelti olarak -20°C 'de saklandı.

Mitoksantron (10 mg) ($1.93 \times 10^4 \mu\text{M}$) (Sigma M 6545): 1 ml etanol içinde çözüldü ve stok çözelti olarak -20°C 'de saklandı.

İlaçlar çözüldükten sonra, istenilen konsantrasyonda ilaç solüsyonlarının hazırlanması için stok çözeltilerinden belirli miktarlar alınarak seyreltilme işlemi yapıldı. Yapılan deneylerde kullanılan ilaçların son konsantrasyonu hücre kültüründe kullanılan besiyeri hacmine göre ayarlandı.

3.2.2. Lizofosfatidik asit doz çalışmaları

Hücreler, 75 cm^2 flaskalarda üretildi ve %70 yoğunluğa ulaştığında tripsinle muamele edildi. Tripsinle muamele edilerek kaldırılan hücreler, 96 kuyucuklu

petriye ekildi ve %70 yoğunluğa ulaştığı, 24 saat sonunda LPA ile muameleye hazır hale geldi. Lizofosfatidik asit, ortamdaki son konsantrasyonu 1 µM, 5 µM, 10 µM ve 15 µM olacak şekilde medyum ile seyreltildi. Hücrelerin üzerindeki medyum ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra petride ayrılan bölgelere farklı konsantrasyonlardaki LPA solüsyonları eklendi. Lizofosfatidik asit solüsyonu eklenen hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren ortamda inkübe edildi. 24 saat inkübasyondan sonra, hücre proliferasyon kiti (Roche Applied Science, 11647229001) kullanılarak ELISA Reader (Thermo Labsystems, Multiskan Spectrum) cihazında absorbans değerleri okundu.

3.2.3. Hücre proliferasyon deneyi

PC3 hücreleri, 75 cm² flaklarda üretildi ve %70 yoğunluğa ulaştığında tripsinle muamele edildi. Tripsinle muamele edilerek kaldırılan hücreler, 96 kuyucuklu petriye ekildi ve %70 yoğunluğa ulaştıncaya kadar beklendi. Hücreler 24 saat sonunda %70 yoğunluğa ulaştı ve hücrelerin besiyerleri ortamdaki uzaklaştırıldı. Hücreler, ilaç ve LPA muamelesi için aşağıda belirtildiği gibi gruplandırıldı. Petride ayrılan kuyucuklara, bu gruplarda belirtilen ilaçları ve LPA'yi içeren besiyerleri eklendi.

Kontrol grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, ilaçların çözülmesi için kullanılan çözücülerini içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Lizofosfatidik asit (LPA) grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Dosetaksel grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 mM dosetaksel içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Dosetaksel + LPA grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 mM dosetaksel ve 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Estramustin grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 µM estramustin içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Estramustin + LPA grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 µM estramustin ve 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Mitoksantron grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 0.2 µM mitoksantron içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Mitoksantron + LPA grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 0.2 µM mitoksantron ve 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Hücre proliferasyonunu belirlemek için, hücre proliferasyon ELISA, BrdU (kolorimetrik) kiti (Roche Applied Science, 11647229001) kullanıldı.

3.2.4. Prensip

Hücre proliferasyonu ölçümü, hücrelerin proliferasyonu sırasında çoğalan DNA miktarının ölçülmesi esasına dayanır.

Bir timin analogu olan BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin), hücre bölünmesinin S fazında DNA'ya bağlanarak işaretlenmesini sağlar. Daha sonra BrdU bağlanan hücreler, anti-BrdU-POD monoklonal antikoruna ile boyanır ve böylece çoğalan DNA miktarının tayinine olanak verir.

3.2.5. Kitin içeriği

BrdU reaktifi (100x konsantre, 1 ml): pH 7.4 olan PBS içinde 10 mM 5-bromo-2'-deoksiuridin.

Fix denat (2x100 ml): Kullanıma hazırdır.

Anti-BrdU-POD reaktifi (liyofilize) : Peroksidaz (POD) ile konjuge hibrid fare (klon BMG 6H8) hücrelerinden elde edilen monoklonal antikor.

Antikor seyreltme solüsyonu (100 ml): Kullanıma hazırdır.

Yıkama tamponu (10x konsantre, 100 ml): 100 ml PBS.

Substrat solüsyonu (TMB) (100 ml): 100 ml tetrametil benzidin (TMB).

3.2.6. Prosedür

1. 96 kuyucuklu petride hücre kültürü oluşturuldu ve 100 µl ilaç ve LPA muamelesi yapılan gruplar 24 saat inkübasyonun ardından hücre proliferasyonu ölçümüne hazır hale geldi. 100x konsantrasyonundaki BrdU, steril medyum ile seyreltildi. 96 kuyucuklu petride her kuyucuktaki hücreler 100 µl besiyeri ile muamele edildiği için 1 ml BrdU solüsyonu hazırlandı. 10 µl BrdU kuyucuklara eklendi ve kuyucuklardaki BrdU son konsantrasyonu 10 µM oldu. 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 8 saat inkübe edildi.
2. Kullanıma hazır halde bulunan Fix Denat solüsyonundan her kuyucuğa 200µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Fix denat ortamdan uzaklaştırıldı.
4. Anti-BrdU-POD, 1.1 ml distile su ile çözüldü ve 10 dakika boyunca karıştırıldı. Hazırlanan stok Anti-BrdU-POD solüsyonu, Anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu ile 1:100 oranında seyreltildi. Her kuyucuğa 100 µl Anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu eklendi ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Yıkama solüsyonu distile su ile 1:10 oranında seyreltildi ve her kuyucuğa 300 µl yıkama solüsyonu eklenerek kuyucuklar yıkandı.
6. Yıkama solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldı.
7. Her kuyucuğa kullanıma hazır olan 100 µl substrat solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

8. Hücre proliferasyonunun incelenmesi için 370 nm’de, ELISA Reader (Thermo Labsystems, Multiskan Spectrum) cihazında absorbans değerleri okundu.

3.3. Koloni deneyi

Koloni oluşturma deneyi, Mosmann T’nin (123) yöntemine göre yapıldı. İlaç uygulamalarından sonra, her bir kuyucuktaki hücreler sayıldı. Muamele edilmiş olan hücreler her bir kuyucukta 250 hücre olacak şekilde yeniden 6 kuyucuklu petrilere ekildi. Petrilere 6 gün boyunca hareketsiz olarak inkübatörde bekletildi. Altıncı günde koloniler görünmeye başladı. Bu günden itibaren hücrelerin besiyerleri 2-3 günde bir yeni besiyeri ile hücreler fazla sarsılmadan değiştirildi. Onikinci günde koloniler boyandı. Boyama için kullanılan prosedür aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.3.1. Malzemeler

1. Mutlak etanol
2. Fosfat tamponlu tuz (PBS) (0.1 M) (pH:7.2-7.3): 2.68 mM KCl, 136.9 mM NaCl, 1.47 mM KH₂PO₄ ve 8.06 mM Na₂HPO₄ içerir.
3. Kristal Viyole (%1): 0.5 g kristal viyole 50 ml PBS’de çözüldü.

3.3.2. Prosedür

1. Besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı.
2. Her bir kuyucuğa 1:1 oranında hazırlanan PBS:metanol karışımından 3 ml eklendi ve 2 dakika bekledikten sonra karışım uzaklaştırıldı.
3. Kuyucuklara 3 ml saf metanol eklendi ve 10 dakika sonunda metanol uzaklaştırılıp kuyucuklar oda sıcaklığında kurutuldu.
4. Daha sonra her bir kuyucuğa 3’er ml %1’lik kristal viyole eklenerek 10 dakika bekletildi. On dakika sonunda kristal viyole ortamdan uzaklaştırıldı.
5. Kuyucuklar önce musluk suyu, sonra distile su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
6. Kuyucuklar tamamen kurduğunda, oluşan koloniler gözle görünür hale geldi. Her bir kuyucuktaki kolonileri oluşturan hücre sayıları mikroskop kullanılarak incelendi, PC3 hücreleri için bir araya gelmiş en az 20 hücre koloni olarak değerlendirildi.

3.4. Lizofosfatidik asit, Docetaksel, Estramustin ve Mitoksantron’un Apoptozise Olan Etkilerinin İncelenmesi

25 cm² flaklarda kültüre edilen hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında, aşağıda bahsedildiği gibi LPA ve ilaç uygulamaları yapıldı.

Kontrol grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, DMSO içeren yeni besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Lizofosfatidik asit (LPA) grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Dosetaksel grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 mM dosetaksel içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Dosetaksel + LPA grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 mM dosetaksel ve 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Estramustin grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 µM estramustin içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Estramustin + LPA grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 10 µM estramustin ve 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Mitoksantron grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 0.2 µM mitoksantron içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Mitoksantron + LPA grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, 0.2 µM mitoksantron ve 10 µM LPA içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Apoptozisin belirlenmesi için Annexin V kiti (Enzo Life Sciences International, Inc, USA) kullanıldı.

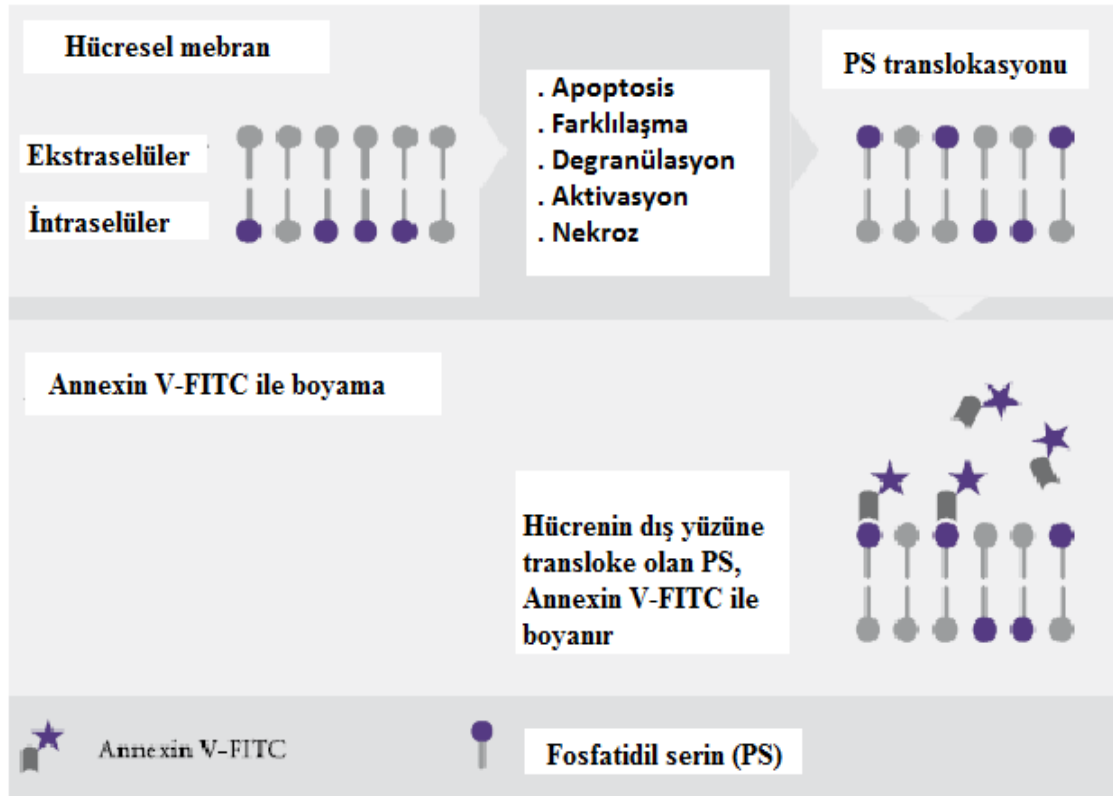
3.4.1. Annexin V kitinin prensibi

Annexin V 35-36 kDa molekül ağırlığında kalsiyum bağımlı ve fosfatidilserine afinitesi yüksek olan fosfolipid bağlayıcı bir proteindir. Annexin V ile bağlanma deneyinin prensibi, bu proteinin apoptozis sürecinin erken evrelerinde hücrenin dış membranında yoğunlaşan fosfatidilserin moleküllerine hızlı ve seçici olarak bağlanması temeline dayanmaktadır. Apoptozis sırasında plazma membranındaki değişikliklerden dolayı, fosfatidilserin sitoplazmanın dış yüzeyine doğru kayar ve Annexin V’in bağlanmasına olanak verir.

Annexin V FITC kiti floresan (FITC) işaretli Annexin V propidium iyodür (PI) ile birlikte apoptozise uğrayan hücreleri tespit etmek için kullanılır. Apoptozisin erken evrelerindeki hücrelerde, plazma membranının iç kısmından dış kısmına geçen fosfatidilserin molekülleri, Annexin V FITC ile boyanarak görünür hale getirilir. Apoptozisin ileri evrelerinde plazma membranının geçirgenliği arttığı için, PI hücre membranını geçip hücrenin DNA’sına kadar inebilir ve DNA’ya bağlanır. Bu durum nekroz veya ileri evre apoptozis ile ilişkili membran bütünlüğü kaybının da analiz edilmesini sağlar. Annexin V FITC ile birlikte PI’nın kullanıldığı çift boyama sistemi ile 2 renkli akış sitometrisi sayesinde hücrelere ait 3 populasyon birbirinden ayırt edilebilir hale gelir. Apoptotik olmayan hücrelerde: Annexin V ve PI negatiftir. Erken evre apoptozisi gösteren hücrelerde: Annexin V pozitif, PI negatiftir. Nekrotik veya geç evre apoptozisi gösteren hücrelerde: Annexin V ve PI pozitifdir.

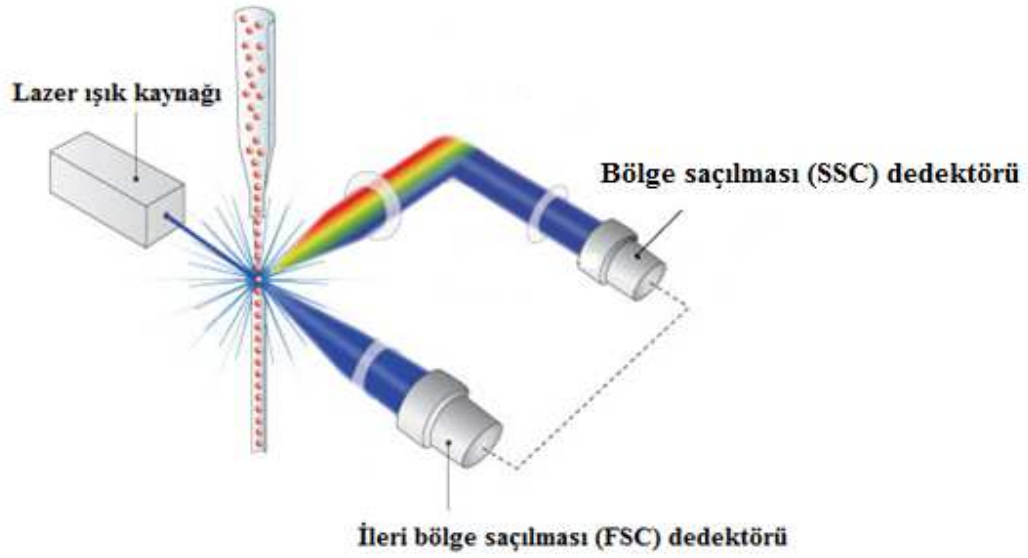
Membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin, normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunmaktadır (124). Eğer hücre apoptozise giderse normalde

iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne doğru transloke olurlar. Bu yer değiştirme, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. AnneksinV, hücrenin dış yüzüne transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (125-130). FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı akış sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür kullanılmaktadır. (128, 129, 131).



Şekil 3.1 Annexin V ile hücre boyama (PS: fosfatidilserin) (127).

Şekil 3.2’de lazer ışığı ile hücrenin etkileşmesi ve bu etkileşme sırasında hücreden saçılan ışıktan elde edilen bilgi gösterilmektedir. Akış sitometrisinden elde edilen FSC (Forward Side Scatter ya da İleri Bölge Saçılması) olarak gösterilen eksen değeri, akış sitometri kapilerinden akmakta olan hücrelere gönderilen lazer ışığının ileri doğru saçılmasını gösterir. Ayrıca, FSC dedektörleri tarafından toplanan verinin dönüştürücüde analiz edilmesi, ne kadar çok ileri saçılma varsa hücrenin o kadar büyük olduğunu göstermektedir. Akış sitometrisinden elde edilen grafiklerdeki her bir nokta bir hücreyi göstermektedir.



Şekil 3.2. Lazer ışığı ile hücrenin etkileşmesi ve bu etkileşme sırasında hücreden saçılan ışığın gösterimi.

Benzer şekilde SSC (Side Scatter ya da Bölge Saçılması) olarak gösterilen eksen değeri ise, akış sitometri kapilerinden akmakta olan hücrelere gönderilen lazer ışığının etrafa saçılmasını gösterir. Ayrıca, SSC dedektörleri tarafından toplanan verilerin analiz edilmesi sonucunda, ne kadar çok etrafa saçılma varsa hücrenin o kadar granüllü olduğunu göstermektedir.

3.4.2. Annexin V kitinin içeriği

Annexin V (FITC) (1.5 ml): %1 sığır serum albumini (BSA) ve %0.1 sodyum azid içeren tris tamponlu tuz (pH 7.4) içinde FITC ile konjuge edilmiş rekombinant Annexin V.

Propidyum İyodür (1.6 ml): PBS içinde 50 µg/ml olacak şekilde hazırlandı.

Annexin V bağlayıcı tampon (10X konsantre, 50 ml) (pH 7.4): 10X Annexin V bağlayıcı tampon, dilüsyondan sonra 10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl ve 2.5 mM CaCl₂ içerir.

3.4.3. Annexin V kitinin prosedürü

1. 10X Annexin V bağlayıcı tampon, distile su ile 1:10 oranında sulandırıldı.
2. İlaç ve LPA uygulamalarının ardından hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat bekletildi. Daha sonra hücrelerin besiyerleri atılıp, tripsinizasyon işlemi yapıldı. Tripsinizasyon işleminin ardından mavi kapaklı santrifüj edilebilen tüplere alınan hücreler, 1500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatanı uzaklaştırılan hücreler iki kez PBS ile yıkandı.
3. Hücreler, 10X Annexin V bağlayıcı tampon ile 2×10^6 - 3×10^6 hücre/ml olacak şekilde resüspanse edildi (deneyimizde hücre sayısı dikkate alınarak, 300 µl'lik tampon kullanıldı).
4. Hücreler 100 µl/tüp olacak şekilde bölündü.

5. Tüplere 5 µl Annexin V FITC ve ardından 10 µl propidyum iyodür eklendi.
6. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
7. Her bir tüpe 400 µl 10X Annexin V bağlayıcı tampon eklendi.
8. Apoptotik hücreler, 1 saat içinde akış sitometri (BD FACS Canto II Flow Cytometer) kullanılarak analiz edildi.

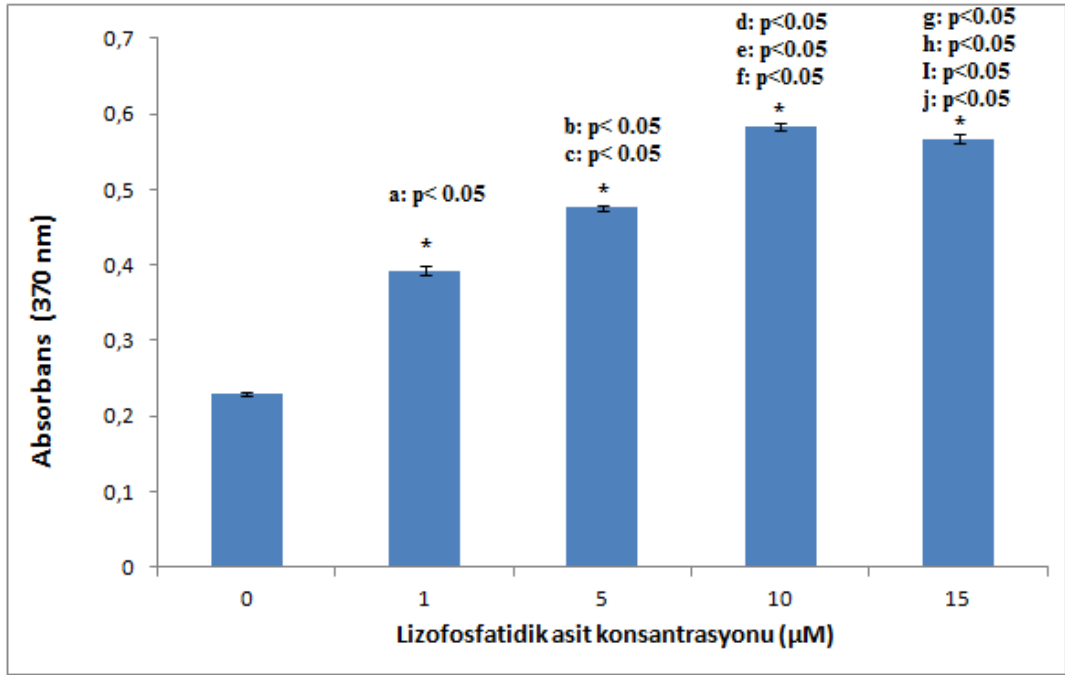
3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 18.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Bağımlı ölçümler arası farklarda Friedman testi yapıldı. Anlamli çıkan p değeri sonrasında ikili karşılaştırmalarda Wilcoxon eş testi ve eşli t testi yapıldı. Bağımsız gruplar arası farkların analizinde normal dağılım varsayımı geçerli olduğu durumda One Way ANOVA testi, ikili karşılaştırmalarda Bonferroni testi uygulandı. Gruplara düşen koloni sayılarının 10'dan düşük olduğu durumlarda, gruplar arası farkın analizinde Kruskal Wallis Varyans Analizi yapıldı. Anlamli çıkan p değerinden sonra ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi yapıldı. 0,05'den küçük olan p değerleri istatistiksel olarak anlamli kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Lizofosfatidik Asidin Konsantrasyon Denemeleri

Lizofosfatidik asit (LPA) 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 15 μ M konsantrasyonlarda kullanılarak prostat kanseri PC3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi araştırıldı ve en etkili LPA konsantrasyonu belirlendi. Bunun için PC3 hücreleriyle bağımsız 20 deney yapıldı ve elde edilen tüm sonuçların ortalaması alındı.

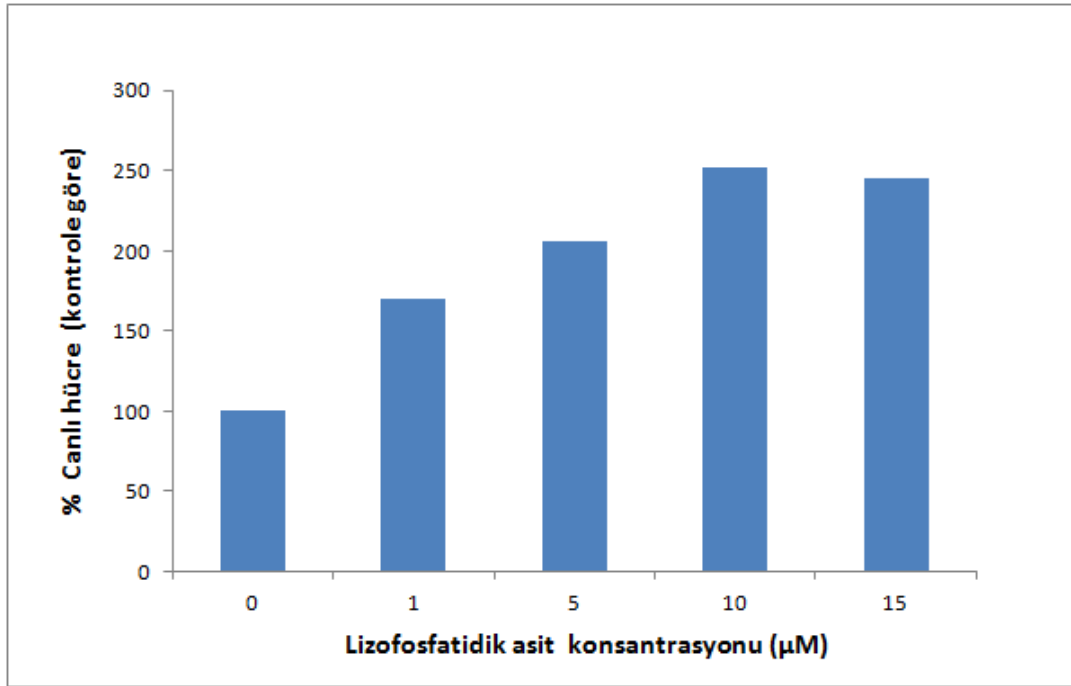


Şekil 4.1. PC3 hücrelerinde farklı dozlardaki lizofosfatidik asidin (LPA) hücre proliferasyonuna etkisi. a: 1 μ M LPA ve kontrol, b: 5 μ M LPA ve kontrol, c: 5 μ M LPA ve 1 μ M LPA, d: 10 μ M LPA ve kontrol, e: 10 μ M LPA ve 1 μ M LPA, f: 10 μ M LPA ve 5 μ M LPA, g: 15 μ M LPA ve kontrol, h: 15 μ M LPA ve 1 μ M LPA, I: 15 μ M LPA ve 5 μ M LPA j: 15 μ M LPA ve 10 μ M LPA gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (*p<0.05) (Değerler $\bar{X} \pm$ SEM olarak verilmiştir, n:20).

Hücre proliferasyonu kiti kullanılarak, lizofosfatidik asidin 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 15 μ M konsantrasyonları ile kontrol grubunun 370 nm'de absorbans değerleri okundu ve karşılaştırmalar yapıldı. 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 15 μ M LPA içeren hücre gruplarının absorbans değerlerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu saptandı (p<0.05). Okunan absorbans değerleri incelendiğinde, 1 μ M LPA içeren grubun absorbans değeri kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu (p<0.05). 5 μ M LPA içeren grubun absorbans değeri, kontrol grubundan yüksek bulundu (p<0.05). 5 μ M LPA içeren grubun absorbans değeri, 1 μ M LPA içeren gruptan daha yüksek bulundu (p<0.05). 10 μ M LPA içeren grubun absorbans değeri, 1 μ M LPA içeren gruptan (p<0.05), 5 μ M LPA içeren gruptan (p<0.05) ve kontrol

grubundan ($p<0.05$) daha yüksek bulundu. 15 μM LPA içeren grubun absorban değeri, 1 μM LPA içeren gruptan ($p<0.05$), 5 μM LPA içeren gruptan ($p<0.05$) ve kontrol grubundan ($p<0.05$) daha yüksek bulundu. 10 μM ve 15 μM konsantrasyonlarında LPA içeren grupların absorban değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$).

Farklı dozlardaki LPA'nın uygulandığı PC3 hücrelerinde, doza bağlı hücre proliferasyonu % canlı hücre olarak belirlendi (Şekil 4.2). Kontrol grubuna ait hücre sayısı % 100 olarak kabul edildiğinde, LPA'nın 1 μM , 5 μM , 10 μM ve 15 μM konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerin sayısının kontrol grubuna göre sırasıyla % 69.7, % 105.6, % 151.9 ve % 145.4 oranlarında arttığı görüldü.

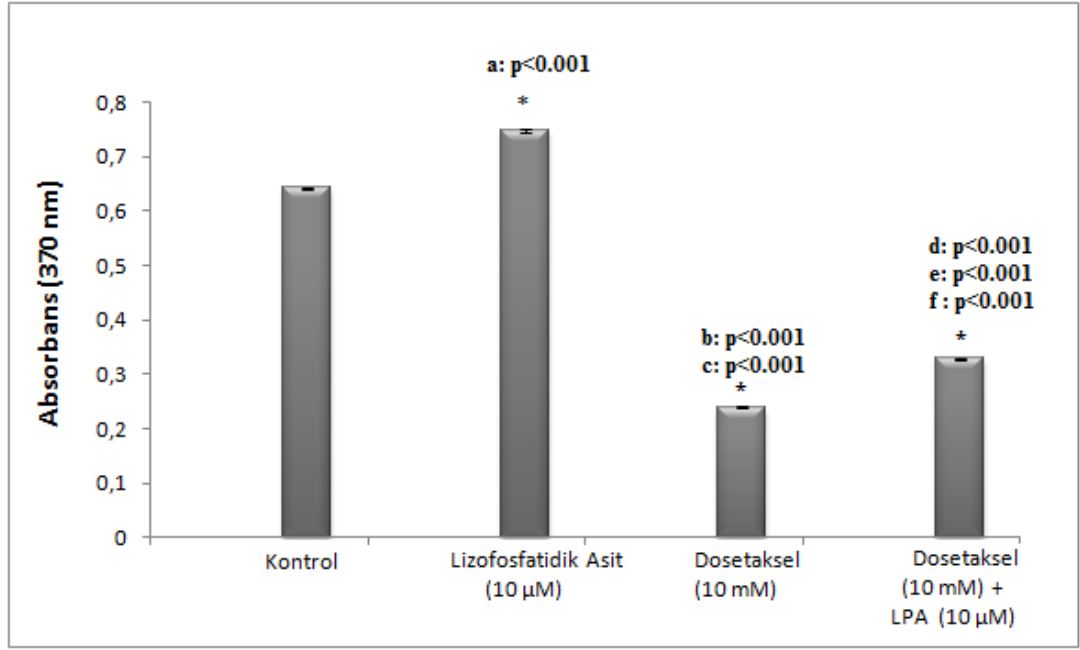


Şekil 4.2. PC3 hücrelerinde farklı dozlardaki lizofosfatidik asidin (LPA) canlı hücrelere etkisi. Kontrol grubu hücreleri %100 kabul edilerek diğer grupların hücre sayılarının yüzdesel değeri hesaplandı. (Değerler $\bar{X}\pm\text{SEM}$ olarak verildi, n:20).

Yapılan bu çalışmada lizofosfatidik asidin 1 μM , 5 μM , 10 μM ve 15 μM konsantrasyonlarının hücre proliferasyonlarına ve canlı hücrelerin yüzdelere etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, absorban değerinin ve canlı hücre yüzdesinin en yüksek elde edildiği konsantrasyonunun 10 μM LPA olduğu saptandı.

4.2. Lizofosfatidik Asit, Dosetaksel, Estramustin ve Mitoksantronun PC3 Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi

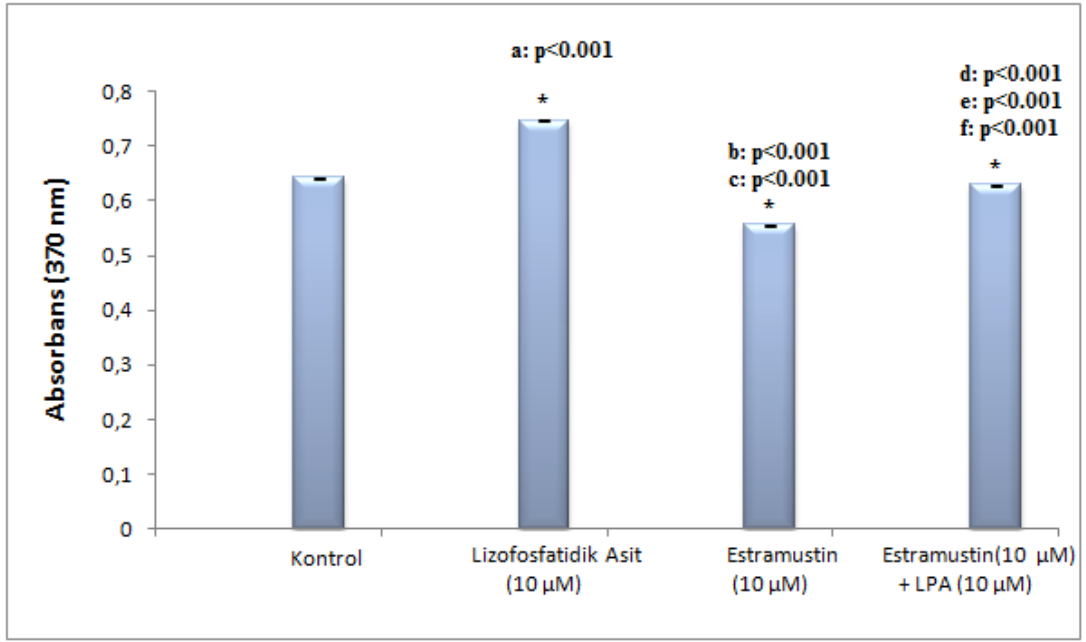
PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol , lizofosfatidik asit (LPA), dosetaksel ve dosetaksel+LPA gruplarının 24 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.3. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10 mM) ve dosetaksel (10 mM) + LPA (10 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 10 mM dosetaksel ve kontrol, c: 10 mM dosetaksel ve 10 µM LPA, d: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve kontrol, e: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve 10 mM dosetaksel gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (*p<0.001) (Değerler $\bar{X} \pm \text{SEM}$ olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel ve kontrol grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel ve LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri, LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel+LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel+LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel+LPA ve dosetaksel grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri dosetaksel grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$).

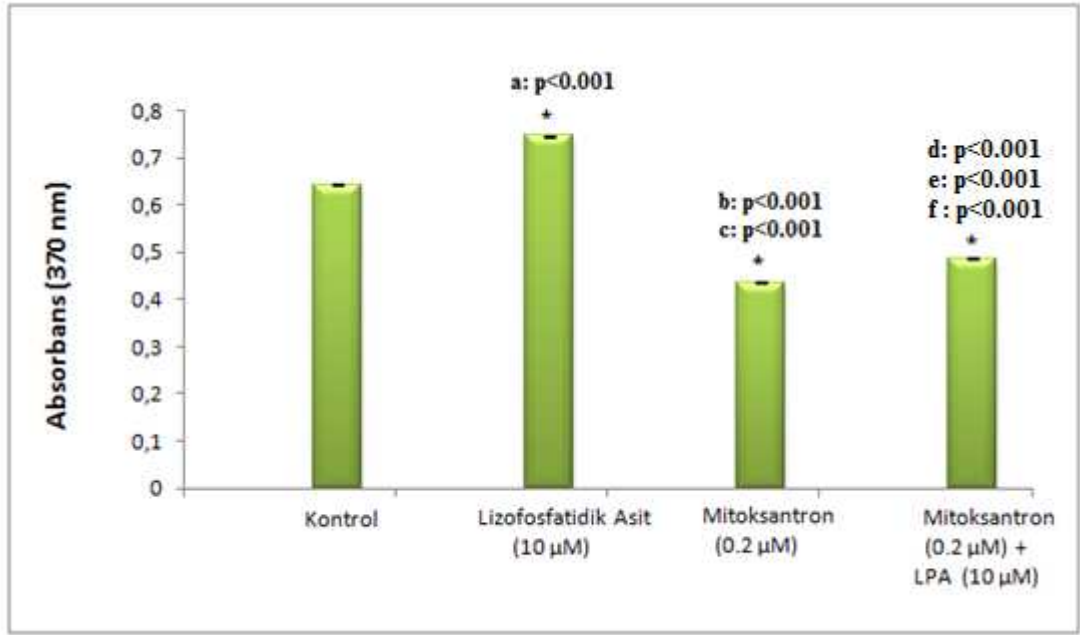
PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, estramustin ve estramustin+LPA gruplarının 24 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.4'de gösterildi.



Şekil 4.4. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), estramustin (10 µM) ve estramustin (10 µM) + LPA (10 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 10 µM estramustin ve kontrol, c: 10 µM estramustin ve 10 µM LPA, d: 10 µM estramustin +10 µM LPA ve kontrol, e: 10 µM estramustin +10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 10 µM estramustin+10 µM LPA ve 10 µM estramustin gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (*p<0.001) (Değerler $\bar{X} \pm SEM$ olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Estramustin ve kontrol grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin ve LPA grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin +LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında, estramustin+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin +LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, estramustin +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin+LPA ve estramustin grupları kıyaslandığında, estramustin+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri estramustin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$).

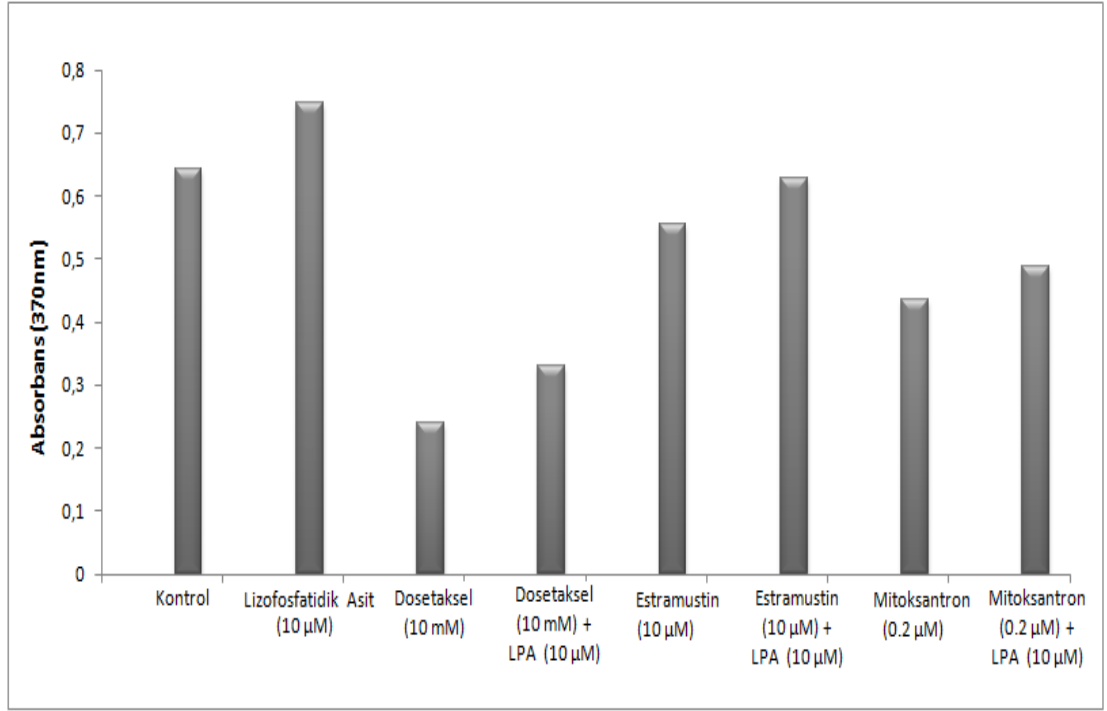
PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA gruplarının 24 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.5'de gösterildi.



Şekil 4.5. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), mitoksantron (0.2 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) + LPA (10 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 0.2 µM mitoksantron ve kontrol, c: 0.2 µM mitoksantron ve 10 µM LPA, d: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve kontrol, e: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve 0.2 µM mitoksantron gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (*p<0.001) (Değerler \bar{X} ±SEM olarak verildi, n:10).

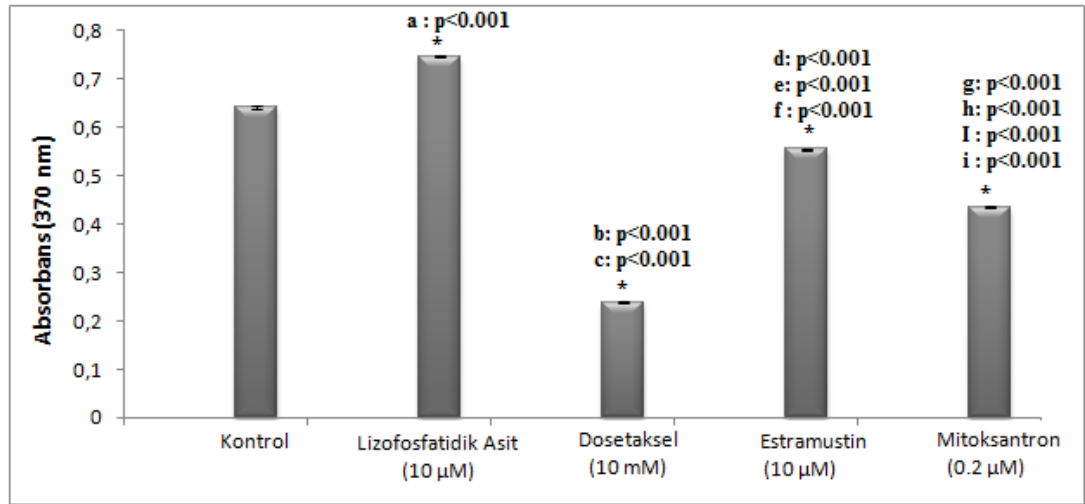
Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve kontrol grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve LPA grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron+LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında, mitoksantron+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron+LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, mitoksantron +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron+LPA ve mitoksantron grupları kıyaslandığında, mitoksantron+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri mitoksantron grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$).

PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, dosetaksiel, dosetaksiel + LPA, estramustin, estramustin + LPA, mitoksantron ve mitoksantron + LPA gruplarının 24 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları toplu halde Şekil 4.6'da gösterildi.



Şekil 4.6. Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'deki verilerin bir arada gösterimi.

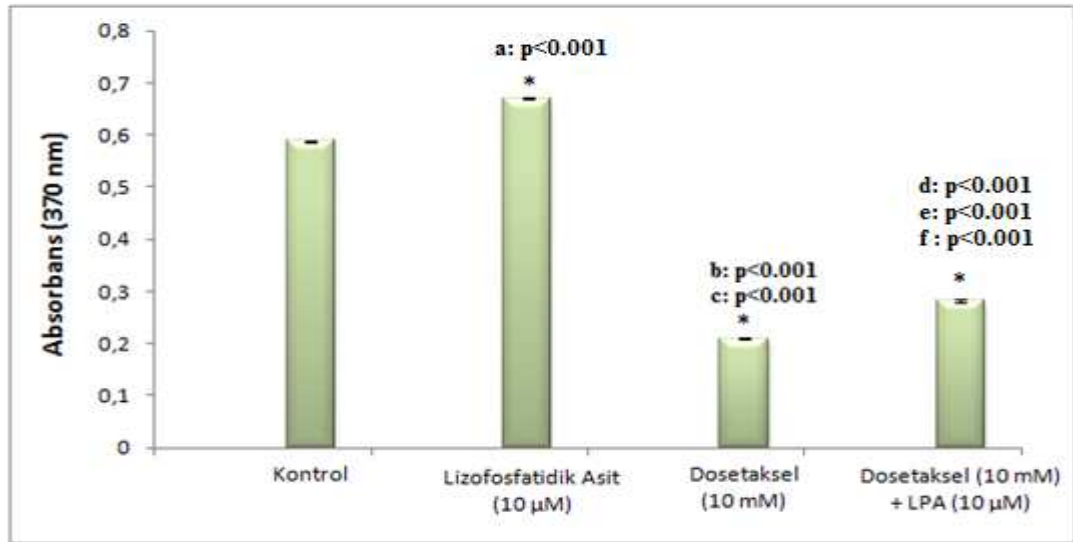
PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, dosetaksel, estramustin ve mitoksantron gruplarının 24 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.7'de gösterildi.



Şekil 4.7. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10 mM), estramustin (10 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) ile 24 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 10 mM dosetaksel ve kontrol, c: 10 mM dosetaksel ve 10 µM lizofosfatidik asit, d: 10 µM estramustin ve kontrol, e: 10 µM estramustin ve 10 µM lizofosfatidik asit, f: 10 µM estramustin ve 10 mM dosetaksel, g: 0.2 µM mitoksantron ve kontrol, h: 0.2 µM mitoksantron ve 10 µM lizofosfatidik asit, I: 0.2 µM mitoksantron ve 10 mM dosetaksel, i: 0.2 µM mitoksantron ve 10 µM estramustin. (*p<0.001) (Değerler $\bar{X} \pm \text{SEM}$ olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel ve kontrol grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel ve LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri, LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin ve kontrol grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin ve LPA grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin ve dosetaksel grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri dosetaksel grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve kontrol grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve LPA grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve dosetaksel grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri dosetaksel grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve estramustin grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri estramustin grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$).

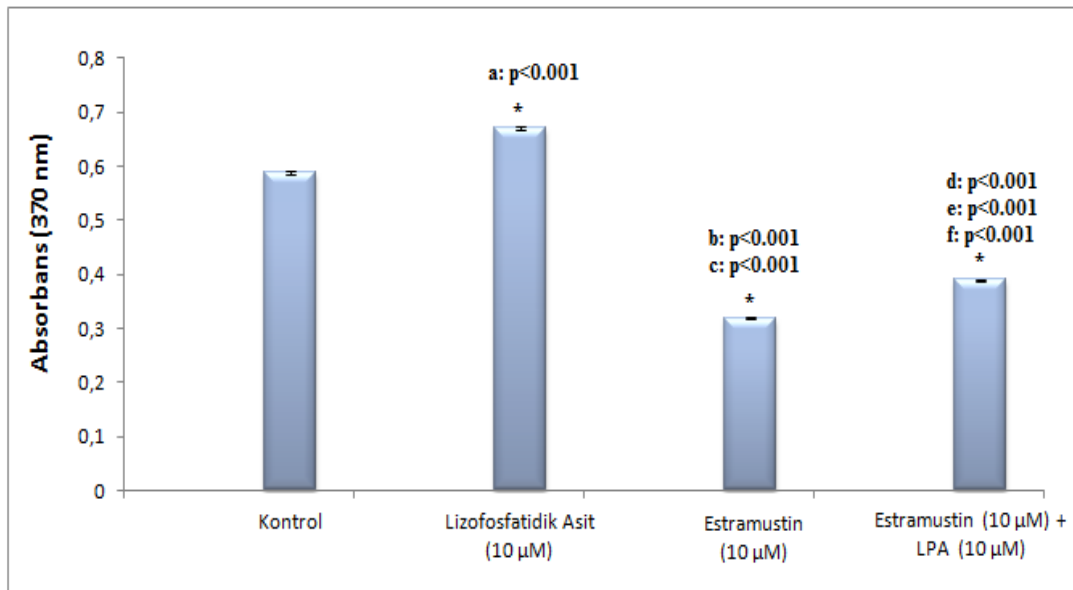
PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, dosetaksel, dosetaksel+LPA gruplarının 48 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.8’de gösterildi.



Şekil 4.8. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10 mM) ve dosetaksel (10 mM) + LPA (10µM) ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 10 mM dosetaksel ve kontrol, c: 10 mM dosetaksel ve 10 µM LPA, d: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve kontrol, e: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve 10 mM dosetaksel gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (* $p < 0.001$) (Değerler $\bar{x} \pm SEM$ olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel ve kontrol grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel ve LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel+LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel+LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Dosetaksel+LPA ve dosetaksel grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri dosetaksel grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$).

Prostat kanseri PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, estramustin, estramustin+LPA ve LPA gruplarının 48 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.9’da gösterildi.

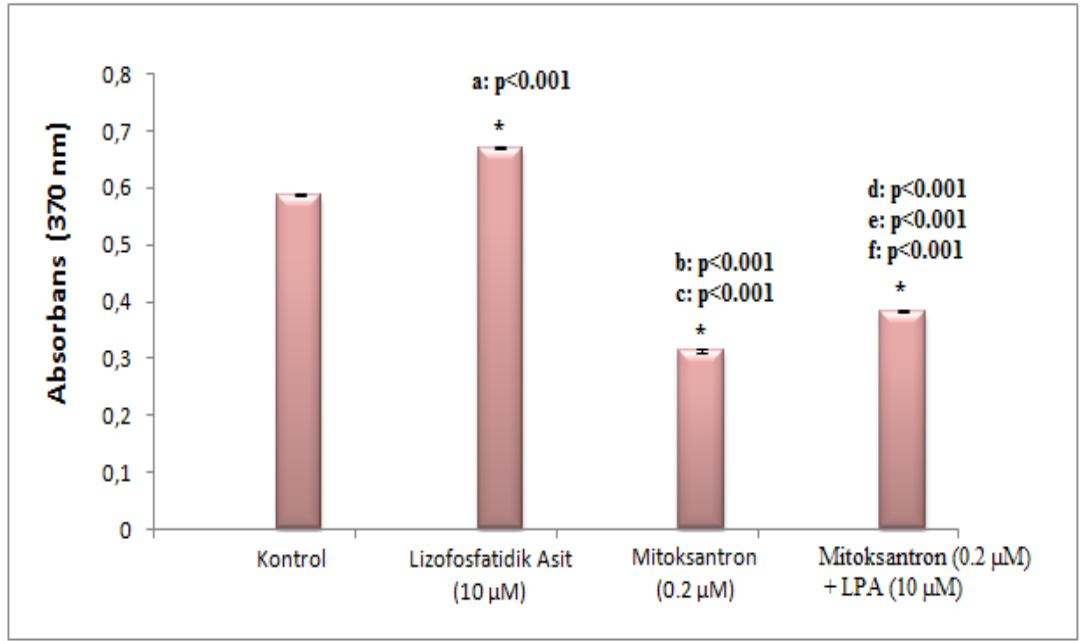


Şekil 4.9. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), estramustin (10 µM) ve estramustin (10 µM) + LPA (10 µM) ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 10 µM estramustin ve kontrol, c: 10 µM estramustin ve 10 µM LPA, d: 10 µM estramustin +10 µM LPA ve kontrol, e: 10 µM estramustin +10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 10 µM estramustin+10 µM LPA ve 10 µM estramustin gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması. (* $p < 0.001$) (Değerler $\bar{X} \pm SEM$ olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Estramustin ve kontrol grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin ve LPA grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Estramustin +LPA ve

kontrol grupları kıyaslandığında, estramustin+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Estramustin +LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, estramustin +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Estramustin +LPA ve estramustin grupları kıyaslandığında, estramustin +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri estramustin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).

Prostat kanseri PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA gruplarının, 48 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.10'da gösterildi.

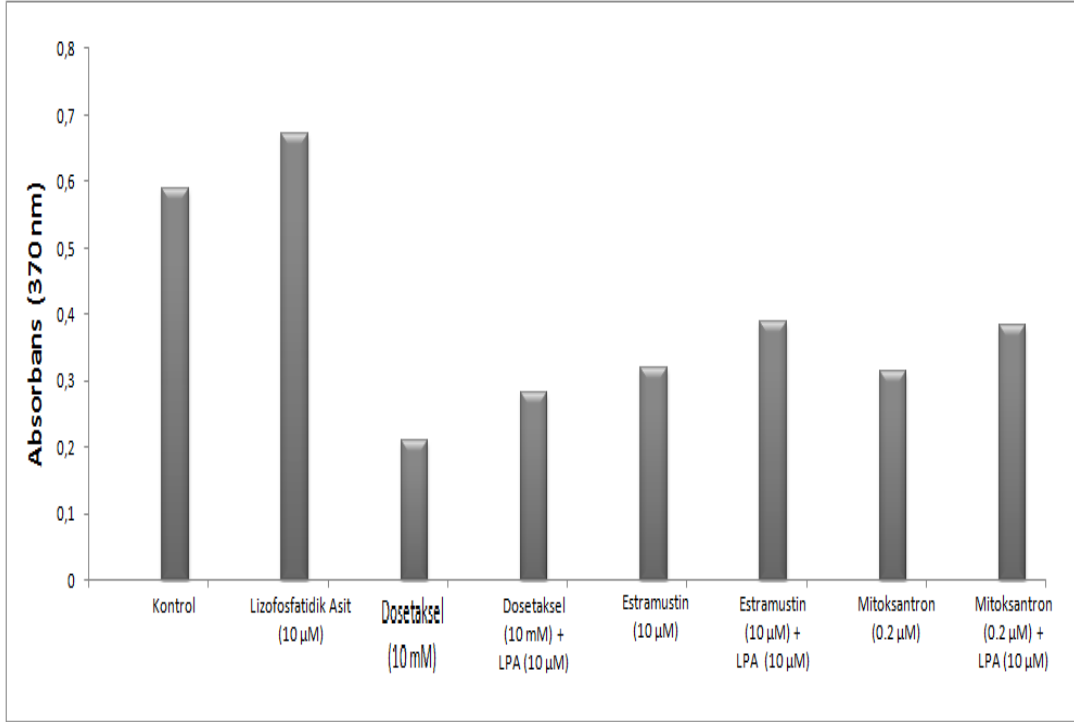


Şekil 4.10. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), mitoksantron (0.2 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) + LPA (10µM) ile 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 0.2 µM mitoksantron ve kontrol, c: 0.2 µM mitoksantron ve 10 µM LPA, d: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve kontrol, e: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve 0.2 µM mitoksantron gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması (* $p<0.001$) (Değerler $\bar{X}\pm$ SEM olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p <0.001$). Mitoksantron ve kontrol grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Mitoksantron ve LPA grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Mitoksantron +LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında, mitoksantron +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Mitoksantron+LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, mitoksantron +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu

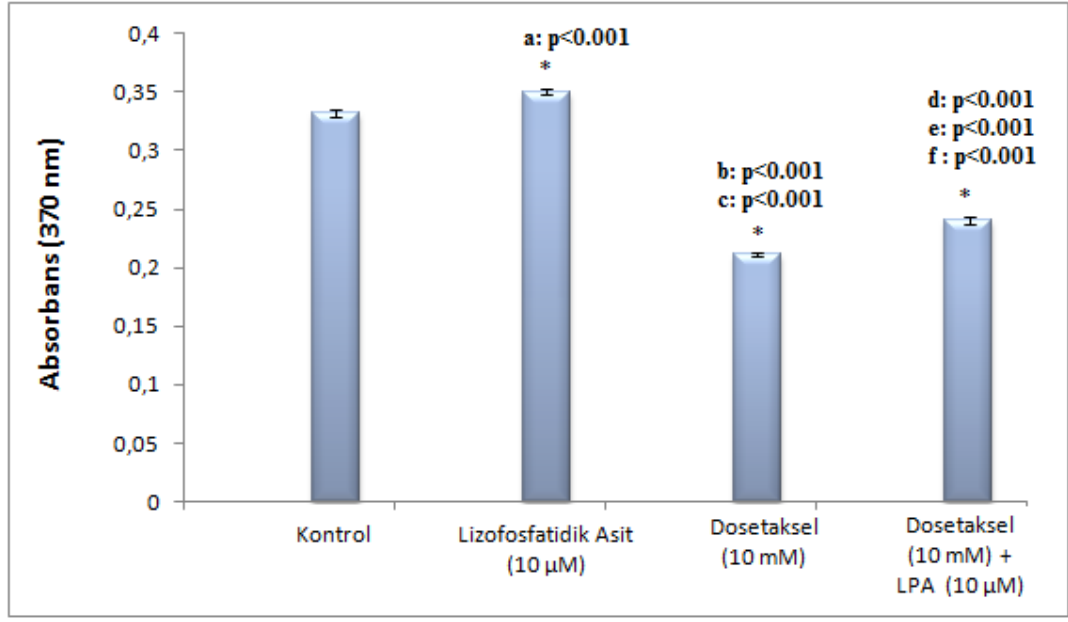
($p < 0.001$). Mitoksantron +LPA ve mitoksantron grupları kıyaslandığında, mitoksantron+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri mitoksantron grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$).

PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, dosetaksel, estramustin, mitoksantron, LPA, dosetaksel+LPA, estramustin+LPA ve mitoksantron+LPA gruplarının 48 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.11’de gösterildi.



Şekil 4.11. Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10’daki verilerin bir arada gösterimi.

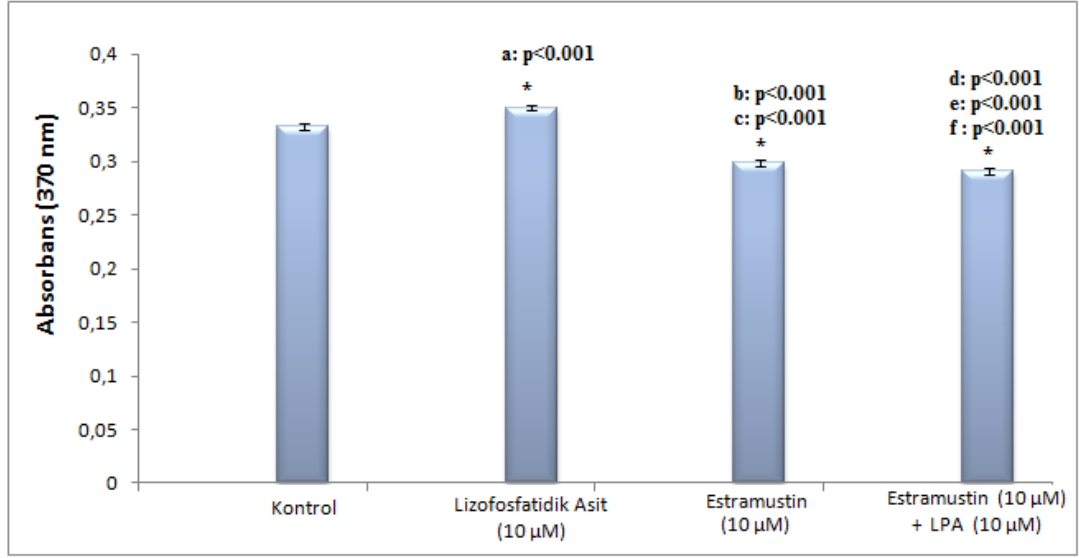
Prostat kanseri PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, dosetaksel ve dosetaksel+LPA gruplarının 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.12’de gösterildi.



Şekil 4.12. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), dosetaksel (10 mM) ve dosetaksel (10 mM) + LPA (10µM) ile 72 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 10 mM dosetaksel ve kontrol, c: 10 mM dosetaksel ve 10 µM LPA, d: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve kontrol, e: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 10 mM dosetaksel+10 µM LPA ve 10 mM dosetaksel gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması) (*p<0.001) (Değerler $\bar{X} \pm SEM$ olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p <0.001). Dosetaksel ve kontrol grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.001). Dosetaksel ve LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.001). Dosetaksel+LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.001). Dosetaksel+LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.001). Dosetaksel+LPA ve dosetaksel grupları kıyaslandığında, dosetaksel+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri dosetaksel grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.001).

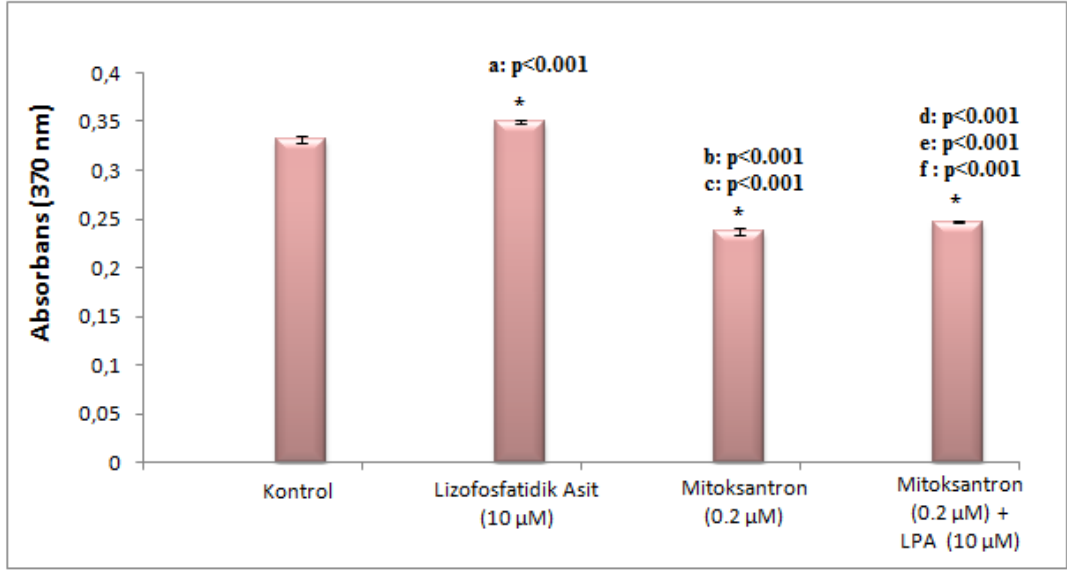
Prostat kanseri PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, estramustin ve estramustin+LPA gruplarının 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.13'de gösterildi.



Şekil 4.13. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), estramustin (10 µM) ve estramustin (10 µM) + LPA (10µM) ile 72 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 10 µM estramustin ve kontrol, c: 10 µM estramustin ve 10 µM LPA, d: 10 µM estramustin +10 µM LPA ve kontrol, e: 10 µM estramustin +10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 10 µM estramustin+10 µM LPA ve 10 µM estramustin gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması) (* $p<0.001$) (Değerler $\bar{X}\pm$ SEM olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p <0.001$). Estramustin ve kontrol grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Estramustin ve LPA grupları kıyaslandığında, estramustin grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Estramustin +LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında, estramustin+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Estramustin +LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, estramustin +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.001$). Estramustin+LPA ve estramustin grupları kıyaslandığında, estramustin +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri estramustin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).

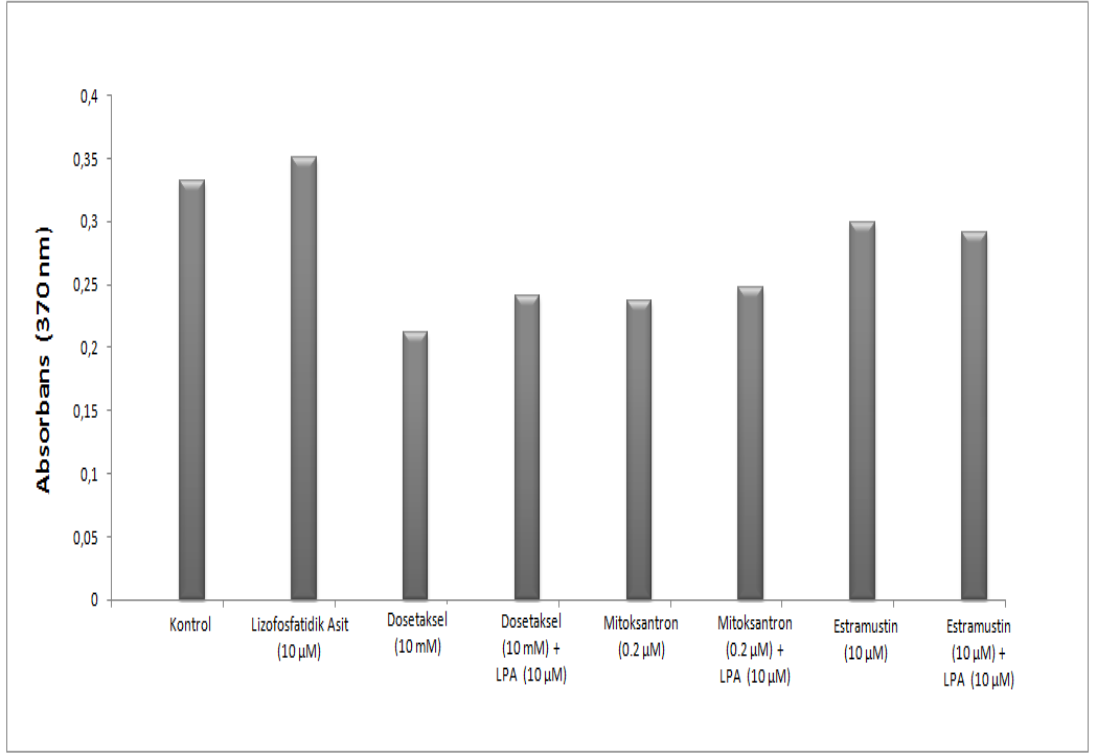
Prostat kanseri PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA gruplarının 48 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.14’de gösterildi.



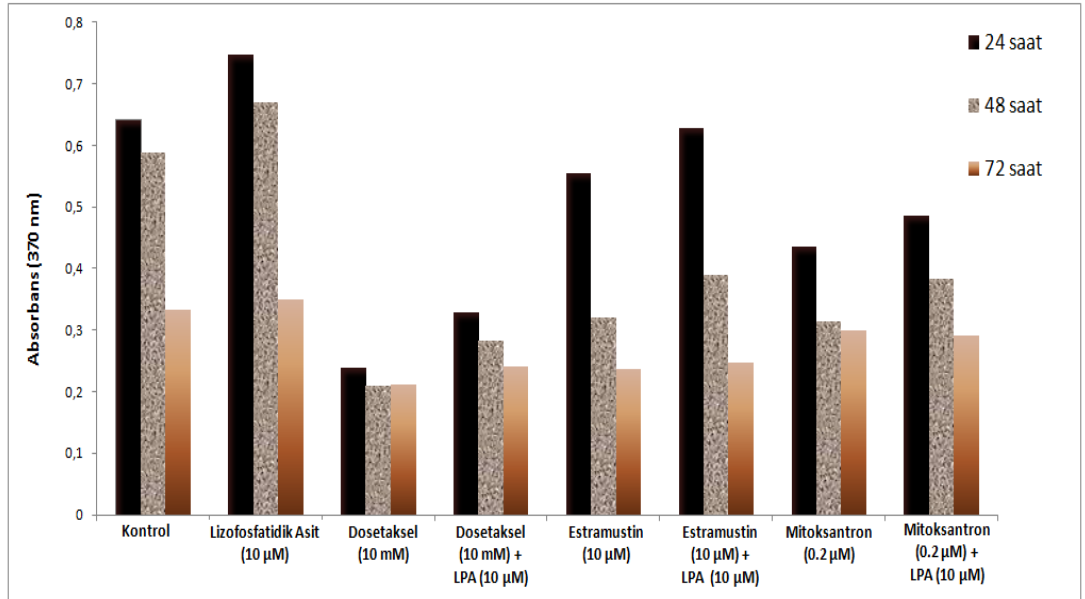
Şekil 4.14. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 µM), mitoksantron (0.2 µM) ve mitoksantron (0.2 µM) + LPA (10µM) ile 72 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi. a: 10 µM LPA ve kontrol, b: 0.2 µM mitoksantron ve kontrol, c: 0.2 µM mitoksantron ve 10 µM LPA, d: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve kontrol, e: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve 10 µM LPA, f: 0.2 µM mitoksantron+10 µM LPA ve 0.2 µM mitoksantron gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması (*p<0.001) (Değerler $\bar{X} \pm \text{SEM}$ olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit ve kontrol grupları kıyaslandığında, lizofosfatidik asit grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve kontrol grupları kıyaslandığında, mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron ve LPA grupları kıyaslandığında mitoksantron grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri, LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron +LPA ve kontrol grupları kıyaslandığında mitoksantron +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron +LPA ve LPA grupları kıyaslandığında, mitoksantron +LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri LPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Mitoksantron +LPA ve mitoksantron grupları kıyaslandığında, mitoksantron+LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri mitoksantron grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$).

PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, LPA, dosetaksel, estramustin, mitoksantron, dosetaksel+LPA, estramustin+LPA ve mitoksantron+LPA gruplarının 72 saat inkübasyonu sonunda elde edilen hücre proliferasyonu sonuçları Şekil 4.15’de gösterildi.



Şekil 4.15. Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14'deki verilerin bir arada gösterimi.

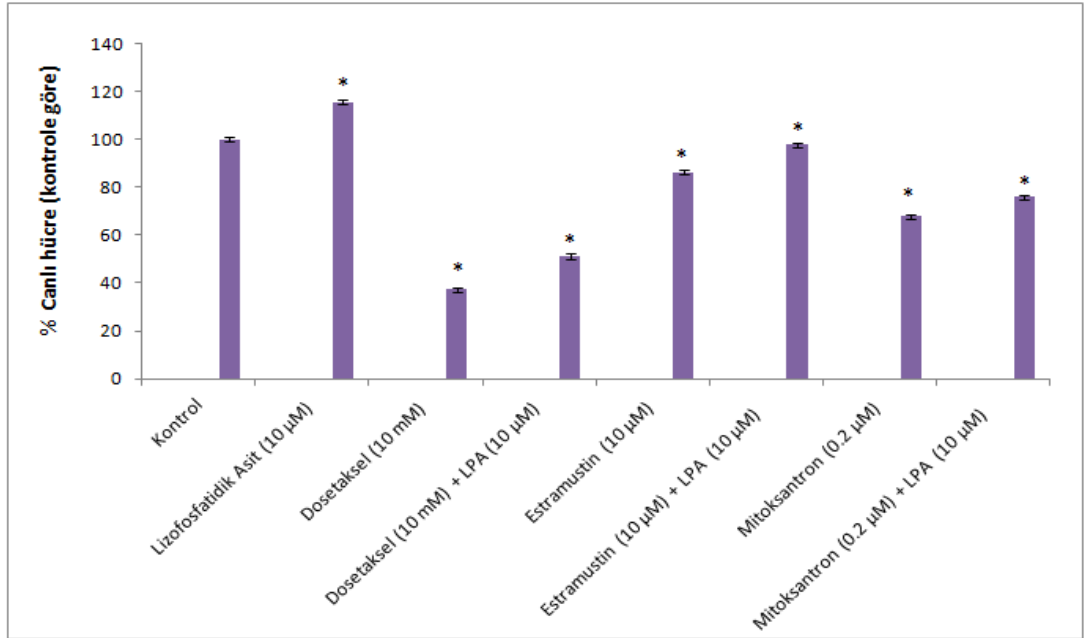


Şekil 4.16. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA), dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+ LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin hücre proliferasyonuna etkisi.

Hücre proliferasyonu sonuçlarına göre, absorbans değerlerinin 24 saat inkübasyon süresi sonunda daha yüksek olduğu belirlendi. Bu nedenle 24 saatlik inkübasyon süresi en etkili süre olarak kabul edildi ve yapılan tüm deneylerde 24 saatlik inkübasyon süresi uygulandı. Kontrol, LPA, dosetaksel, dosetaksel+LPA,

estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron, mitoksantron+LPA gruplarının 24 saat inkübasyonu sonrası elde edilen hücre proliferasyonu sonuçlarına göre, LPA grubunun hücre proliferasyonu ölçüm değeri, kontrol ve diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Dosetaksel ($p<0.001$), dosetaksel + LPA ($p<0.001$), estramustine ($p<0.001$), estramustin + LPA ($p<0.001$), mitoksantron ($p<0.001$), mitoksantron + LPA ($p<0.001$) gruplarının hücre proliferasyonu ölçüm değerleri, kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu. Dosetaksel+ LPA, estramustin+ LPA ve mitoksantron+ LPA uygulanan grupların hücre proliferasyonu ölçüm değerleri sırasıyla dosetaksel, estramustin, mitoksantron gruplarından daha yüksek bulundu.

PC3 hücreleri ile oluşturulan kontrol, lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA gruplarının 24 saat inkübasyonu sonunda elde edilen canlı hücre yüzdeleri Şekil 4.17’de gösterildi.



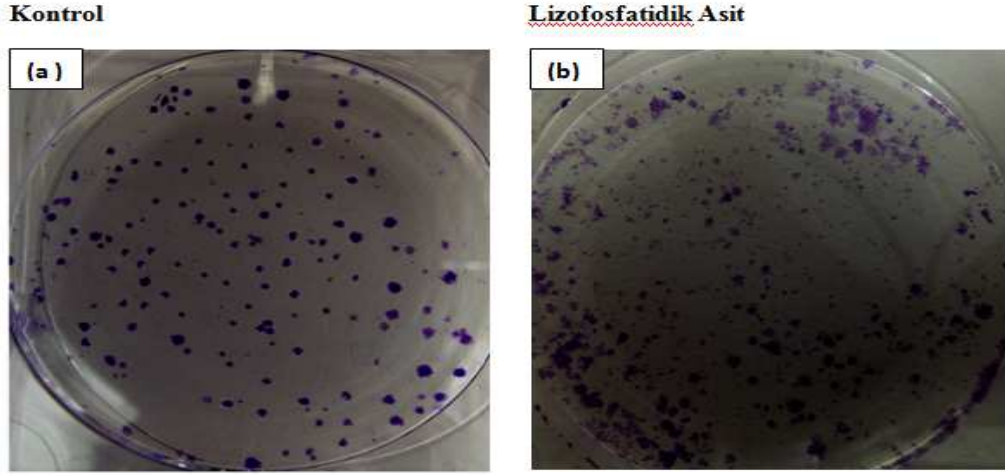
Şekil 4.17. PC3 hücrelerinin lizofosfatidik asit (LPA) (10 μ M), dosetaksel (10 mM), dosetaksel (10 mM) + LPA (10 μ M), estramustin (10 μ M), estramustin (10 μ M) + LPA (10 μ M), mitoksantron (0.2 μ M) ve mitoksantron (0.2 μ M) + LPA (10 μ M) gruplarının canlı hücrelerinin yüzdesi (* $p<0.001$) (Değerler $\bar{X}\pm$ SEM olarak verildi, n:10).

Lizofosfatidik asit grubunun % canlı hücre değeri kontrol ve diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Dosetaksel ($p<0.001$), dosetaksel + LPA ($p<0.001$), estramustine ($p<0.001$), estramustin + LPA ($p<0.001$), mitoksantron ($p<0.001$) ve mitoksantron + LPA ($p<0.001$) gruplarının % canlı hücre değerleri kontrole ve LPA gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. Dosetaksel ve dosetaksel + LPA grupları kıyaslandığında, dosetaksel + LPA grubunun % canlı hücre değeri dosetaksel grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Estramustin ve estramustin + LPA grupları kıyaslandığında, estramustin + LPA grubunun % canlı hücre değeri estramustin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Mitoksantron ve mitoksantron + LPA grupları kıyaslandığında,

mitoksantron + LPA grubunun % canlı hücre değeri mitoksantron grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$).

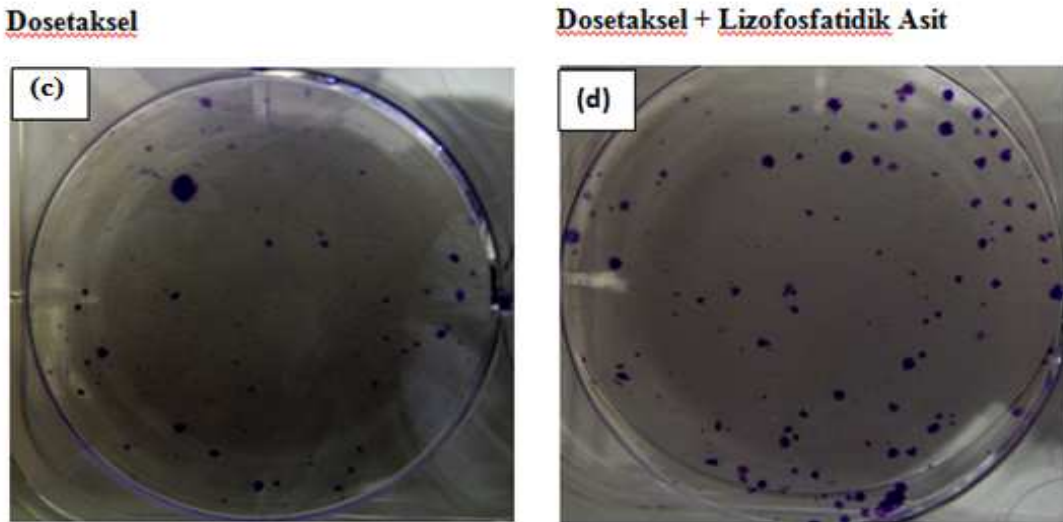
4.3. Lizofosfatidik Asit, Dosetaksel, Estramustin ve Mitoksantronun PC3 Hücrelerinde Koloni Oluşumuna Etkisi

Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel + LPA, estramustin, estramustin + LPA, mitoksantron, mitoksantron + LPA uygulanan PC3 hücrelerinin oluşturduğu kolonilerin görüntüleri sırası ile Şekil, 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21’de gösterildi.



Şekil 4.18. Kontrol (a) ve lizofosfatidik asit (LPA) (b) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri.

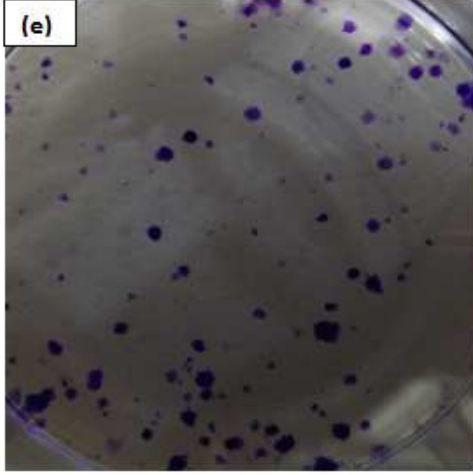
Kontrol ve LPA uygulanan hücre gruplarının oluşturduğu koloniler incelendiğinde, LPA uygulanan hücrelerin oluşturduğu koloni sayısının kontrol grubuna ait koloni sayısına göre daha fazla olduğu görüldü.



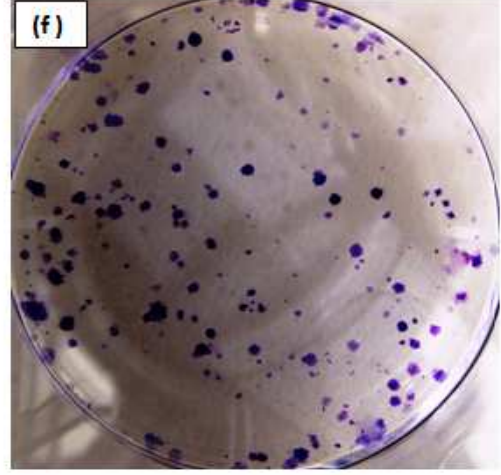
Şekil 4.19. Dosetaksel (c) ve dosetaksel + LPA (d) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri.

Dosetaksel ve dosetaksel + LPA gruplarının oluşturduğu koloniler incelendiğinde, dosetaksel + LPA uygulanan hücrelerin oluşturduğu koloni sayısının dosetaksel grubuna ait koloni sayısına göre daha fazla olduğu görüldü.

Estramustin



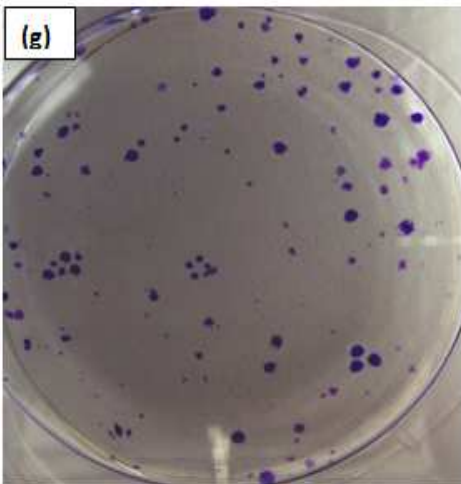
Estramustin + Lizofosfatidik Asit



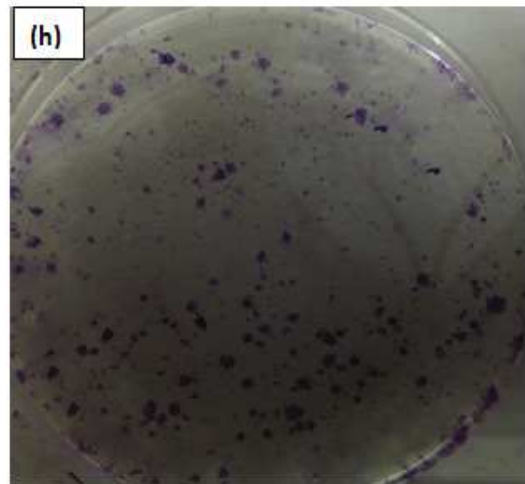
Şekil 4.20. Estramustin (e) ve estramustin + LPA (f) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri.

Estramustin ve estramustin + LPA gruplarının oluşturduğu koloniler incelendiğinde, estramustin + LPA uygulanan hücrelerin oluşturduğu koloni sayısının, estramustin grubuna ait koloni sayısına göre daha fazla olduğu görüldü.

Mitoksantron



Mitoksantron + Lizofosfatidik Asit

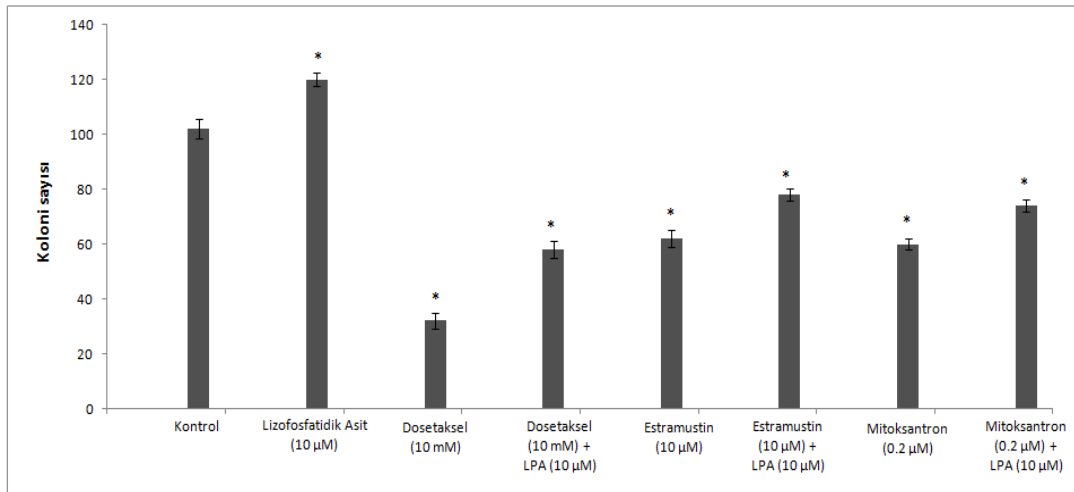


Şekil 4.21. Mitoksantron (g) ve mitoksantron + LPA (h) ile muamele edilen PC3 hücrelerine ait kolonilerin fotografik görüntüleri.

Mitoksantron ve mitoksantron + LPA gruplarının oluşturduğu koloniler incelendiğinde, mitoksantron + LPA uygulanan hücrelerin oluşturduğu koloni sayısının, mitoksantron grubuna ait koloni sayısına göre daha fazla olduğu görüldü.

Koloni görüntüleri incelendiğinde, koloni sayısının LPA grubunda en yüksek olduğu görüldü. Dosetaksel grubunda koloni sayısının en düşük olduğu görüldü. Dosetaksel, estramustin ve mitoksantron gruplarının koloni sayılarının, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü. PC3 hücrelerine dosetaksel+ LPA, estramustin+ LPA ve mitoksantron+ LPA uygulandığında, LPA'nın koloni sayısını arttıran bir etkisi olduğu görüldü.

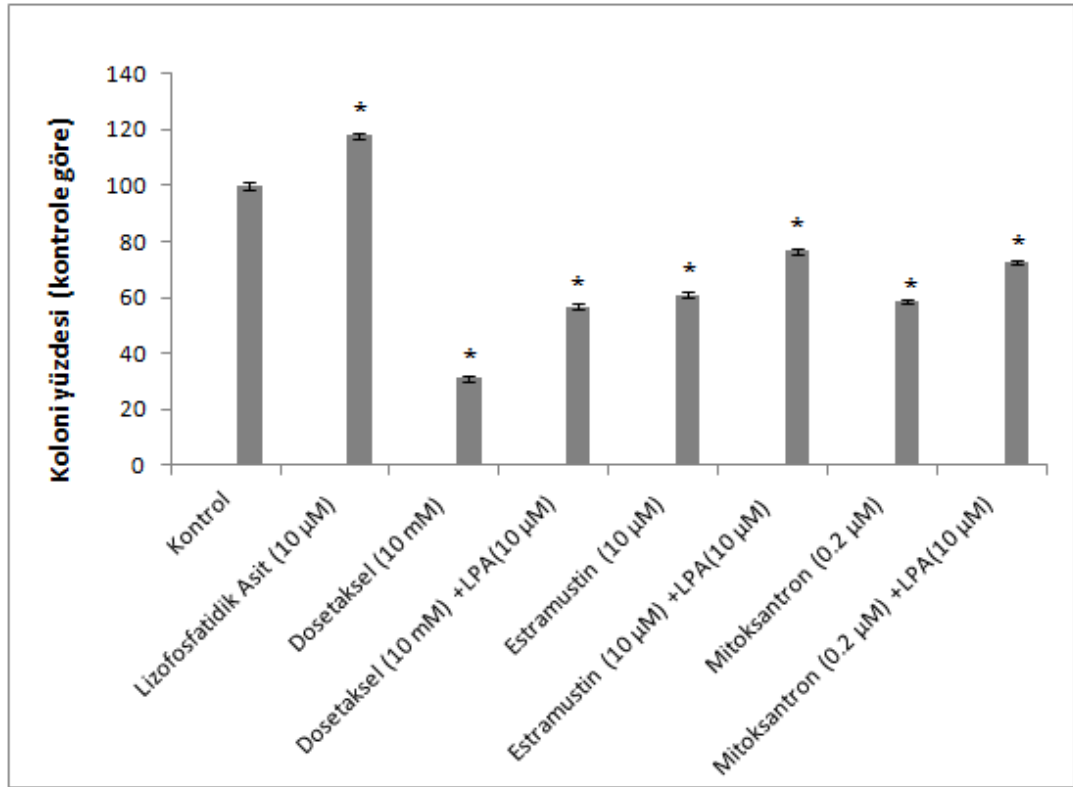
PC3 hücreleri ile oluşturulan lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel + LPA, estramustin, estramustin + LPA, mitoksantron, mitoksantron + LPA gruplarına ait koloni sayıları Şekil 4.22'de gösterildi. Koloni sayıları incelendiğinde, LPA grubunun oluşturduğu koloni sayısının kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0.05$). Dosetaksel grubunun oluşturduğu koloni sayısının, kontrol grubunun oluşturduğu koloni sayısına göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.05$). Estramustin grubunun oluşturduğu koloni sayısı, kontrol grubunun oluşturduğu koloni sayısına göre daha anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Mitoksantron grubunun oluşturduğu koloni sayısı, kontrol grubunun oluşturduğu koloni sayısına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.05$). Dosetaksel+ LPA, estramustin+ LPA ve mitoksantron+ LPA gruplarının oluşturduğu koloni sayıları, sırasıyla dosetaksel, estramustin ve mitoksantron gruplarının oluşturduğu koloni sayısına göre anlamlı olarak artış gösterdi ($p<0.05$). İlaçların tek başına oluşturduğu koloni sayılarının, ilaçlar ile birlikte LPA uygulandıktan sonra arttığı görüldü.



Şekil 4.22. Lizofosfatidik asit (LPA), dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin oluşturduğu koloni sayıları (* $p<0.05$) (Değerler $\bar{X}\pm$ SEM olarak verildi, n:8).

PC3 hücreleri ile oluşturulan lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel + LPA, estramustin, estramustin + LPA, mitoksantron, mitoksantron + LPA gruplarına ait kolonilerin yüzdeleri Şekil 4.23'de verilmiştir. Koloni yüzdeleri, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı. Koloni yüzdeleri incelendiğinde, LPA grubunun

oluşturduğu koloni sayısının, kontrol grubunun oluşturduğu koloni sayısına göre % 17.6 arttığı görüldü. Dosetaksel grubunun oluşturduğu koloni sayısı, kontrol grubunun oluşturduğu koloni sayısına göre % 68.63 azaldı. Estramustin grubunun oluşturduğu koloni sayısı, kontrol grubunun oluşturduğu koloni sayısına göre % 44.82 azaldı. Mitoksantron grubunun oluşturduğu koloni sayısı, kontrol grubunun oluşturduğu koloni sayısına göre % 41.18 azaldı. Dosetaksel + LPA, estramustin + LPA, mitoksantron + LPA gruplarında ise sırasıyla, dosetaksel, estramustin ve mitoksantron gruplarına göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$). İlaçların tek başına oluşturduğu koloni yüzdelерinin, ilaçlar ile birlikte LPA uygulandıktan sonra arttığı görüldü.



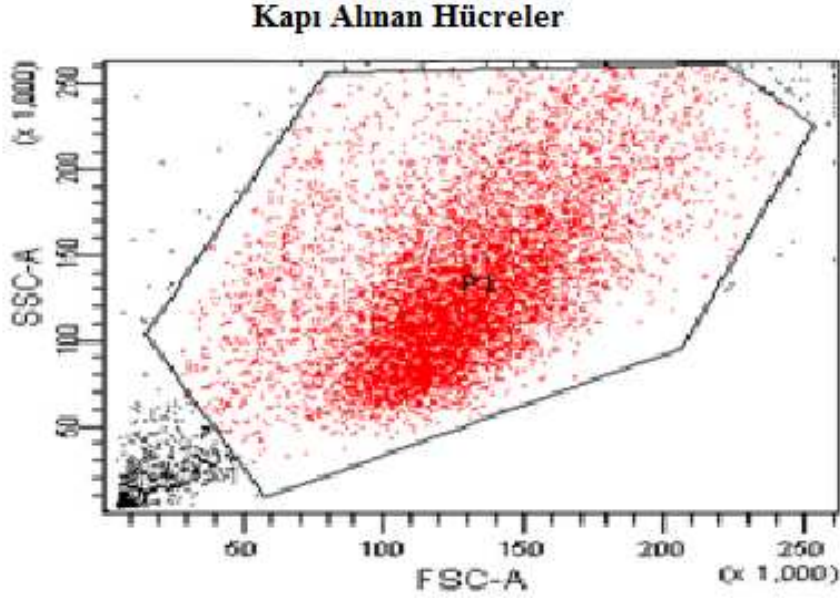
Şekil 4.23. Lizofosfatidik asit (LPA), dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin oluşturduğu koloni sayılarının yüzdesi (Değerler $\bar{X} \pm SEM$ olarak verildi, * $p < 0.05$, n:8).

4.4. PC3 Hücre Dizisinde Annexin V Deney Sonuçları

Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan hücrelerde apoptozisin belirlenmesi amacı ile Annexin V kiti kullanıldı ve Annexin V bağlanma düzeyleri akış sitometrisi ile belirlendi.

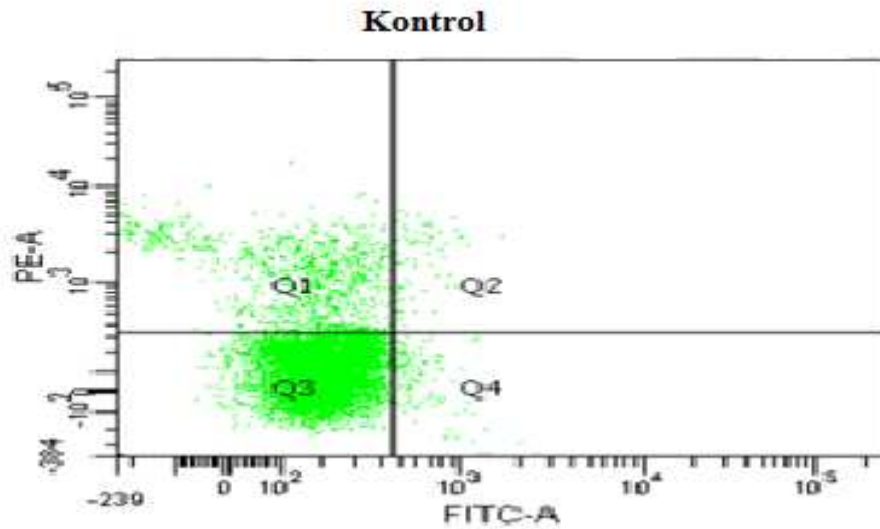
Yapılan bu çalışmada, PC3 hücreleri kullanılarak apoptozis ölçümleri yapıldı. Annexin V kiti kullanılarak yapılan ölçümde, ilaçlar ve LPA ile muamele edilmeyen ve kit prosedüründe yer alan hücre boyama işlemi yapılmayan hücreler ile akış

sitometrisinde kapı alındı. Kapı alınan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü Şekil 4.24'de gösterildi. Apoptozis deneyleri 8 kez tekrarlandı.



Şekil 4.24. Kapı alınan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

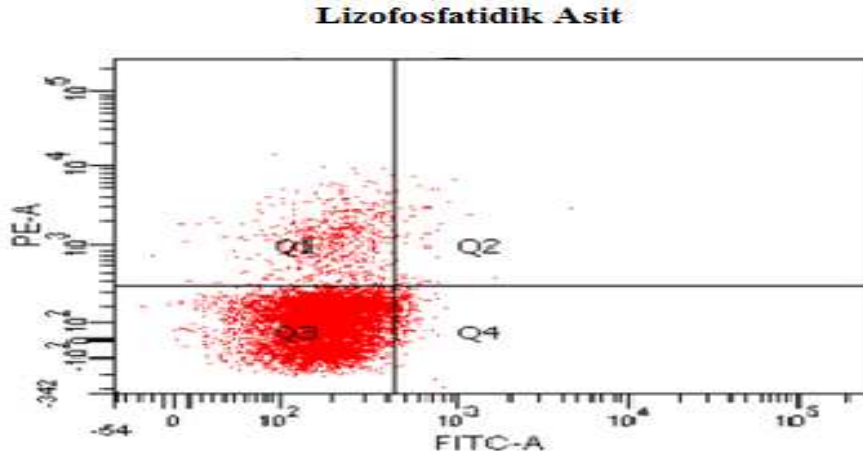
Grup 1: Kontrol grubu için lizofosfatidik asit (LPA), dosetaksel, estramustin ve mitoksantron ile muamele edilmeyen hücreler kullanılarak ölçüm yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra gerçekleştirilen ölçümde elde edilen sonuçlar Şekil 4.25'de gösterildi.



Şekil 4.25. İlaç ve lizofosfatidik asit (LPA) uygulanmayan kontrol grubu PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 12.1, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 0.9, Q3 bölgesinde gösterilen canlı hücrelerin oranı % 85.2 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 1.8 olarak bulundu.

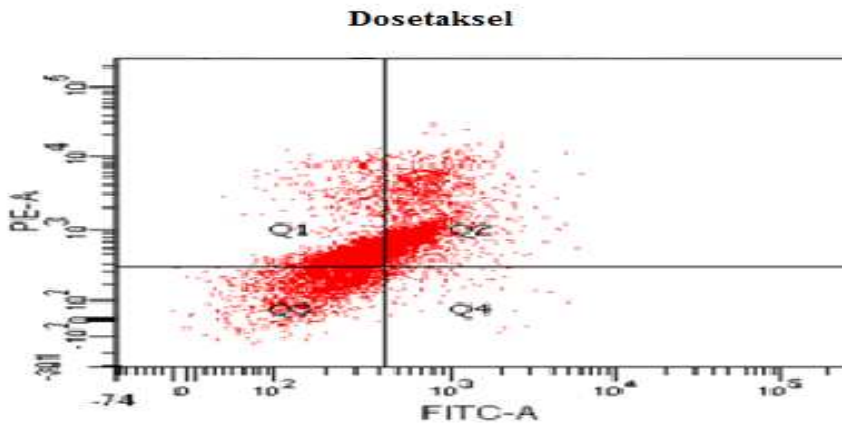
Grup 2: Bu grupta bulunan hücelere 10 μ M lizofosfatidik asit (LPA) uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.26'da gösterildi.



Şekil 4.26. Lizofosfatidik asit (LPA) uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 6.2, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 0.7, Q3 bölgesinde gösterilen canlı hücrelerin oranı % 90.5 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 2.6 olarak bulundu.

Grup 3: Bu grupta bulunan hücelere 10 mM dosetaksel uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.27'de gösterildi.

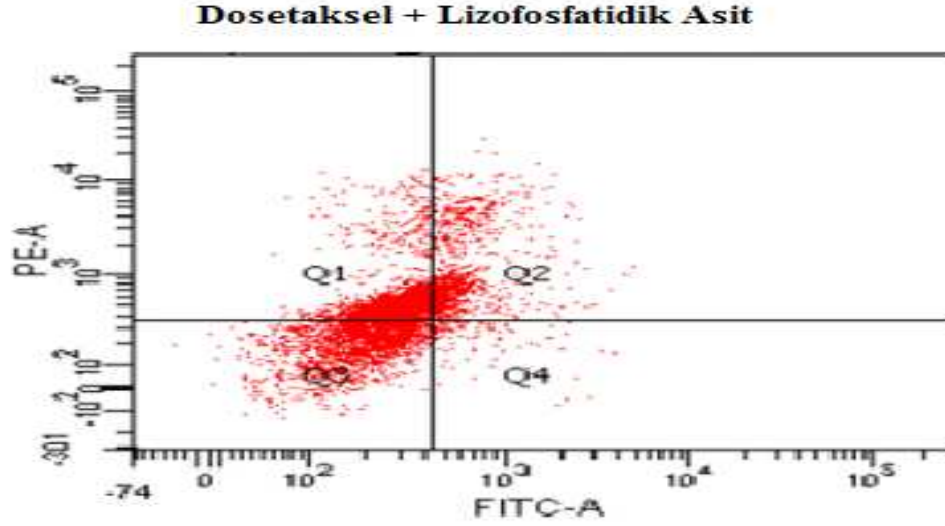


Şekil 4.27. Dosetaksel uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 32.8, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 37.3, Q3 bölgesinde gösterilen canlı

hücrelerin oranı % 27.9 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 1.9 olarak bulundu.

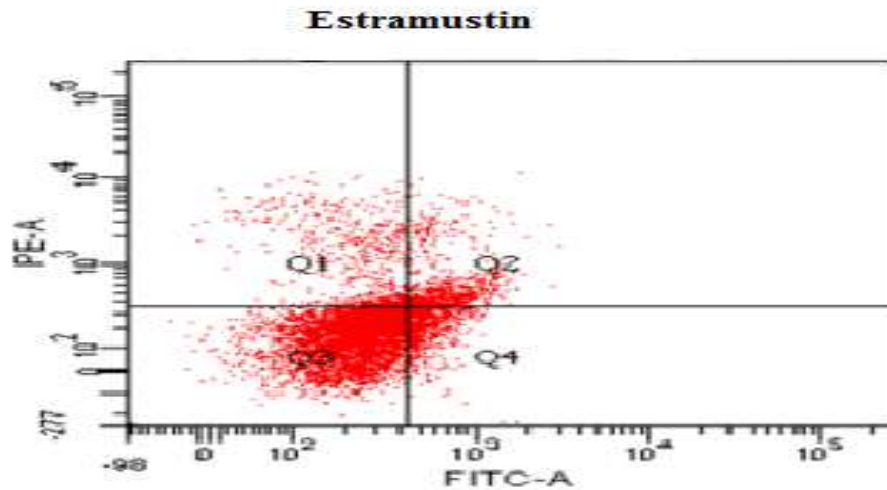
Grup 4: Bu grupta bulunan hücelere 10 mM dosetaksel ve 10 µM lizofosfatidik asit (LPA) uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.28’de gösterildi.



Şekil 4.28. Dosetaksel + LPA uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 38.6, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 20.4, Q3 bölgesinde gösterilen canlı hücrelerin oranı % 38.5 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 2.4 olarak bulundu.

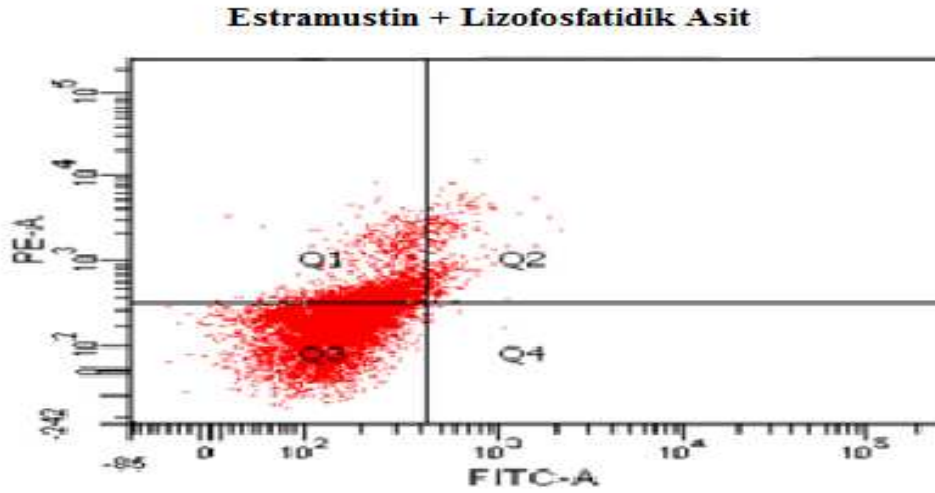
Grup 5: Bu grupta bulunan hücelere 10 µM estramustin uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.29’da gösterildi.



Şekil 4.29. Estramustin uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 7.7, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 9.7, Q3 bölgesinde gösterilen canlı hücrelerin oranı % 68.7 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 13.9 olarak bulundu.

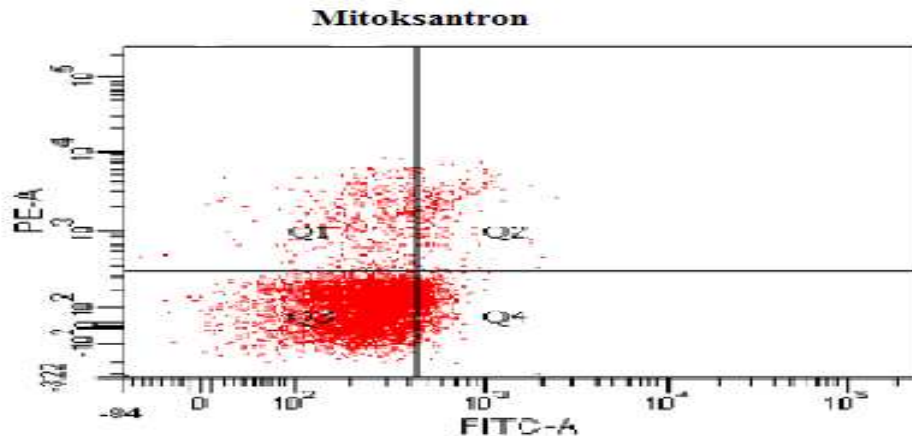
Grup 6: Bu grupta bulunan hücelere 10 µM estramustin ve 10 µM lizofosfatidik asit (LPA) uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.30'da gösterildi.



Şekil 4.30. Estramustin + LPA uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 22.8, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 4.0, Q3 bölgesinde gösterilen canlı hücrelerin oranı % 73.0 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 0.2 olarak bulundu.

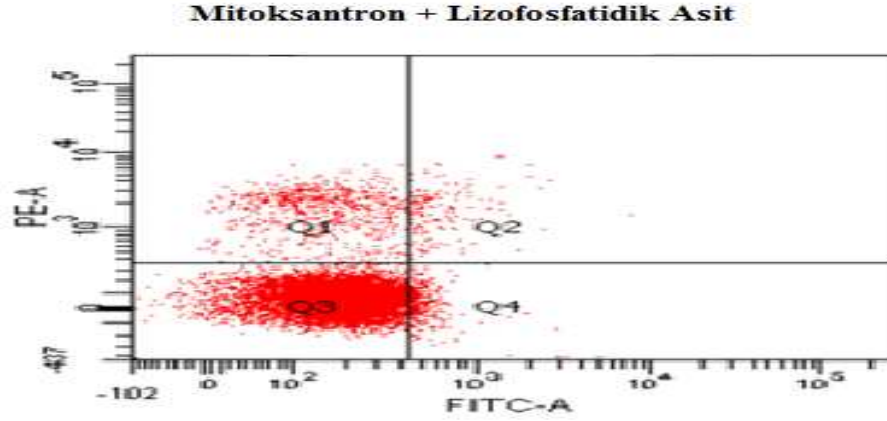
Grup 7: Bu grupta bulunan hücelere 0.2 µM mitoksantron uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.31'de gösterildi.



Şekil 4.31. Mitoksantron uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 5.7, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 3.4, Q3 bölgesinde gösterilen canlı hücrelerin oranı % 79.8 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 11.0 olarak bulundu.

Grup 8: Bu grupta bulunan hücelere 0.2 μ M mitoksantron ve 10 μ M lizofosfatidik asit (LPA) uygulandı ve 24 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.32'de gösterildi.



Şekil 4.32. Mitoksantron + LPA uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometrisi görüntüsü.

Q1 bölgesinde gösterilen nekroza giden hücrelerin oranı % 7.0, Q2 bölgesinde gösterilen apoptozise giden hücrelerin oranı % 1.7, Q3 bölgesinde gösterilen canlı hücrelerin oranı % 86.4 ve Q4 bölgesinde gösterilen erken apoptotik hücrelerin oranı % 4.9 olarak bulundu.

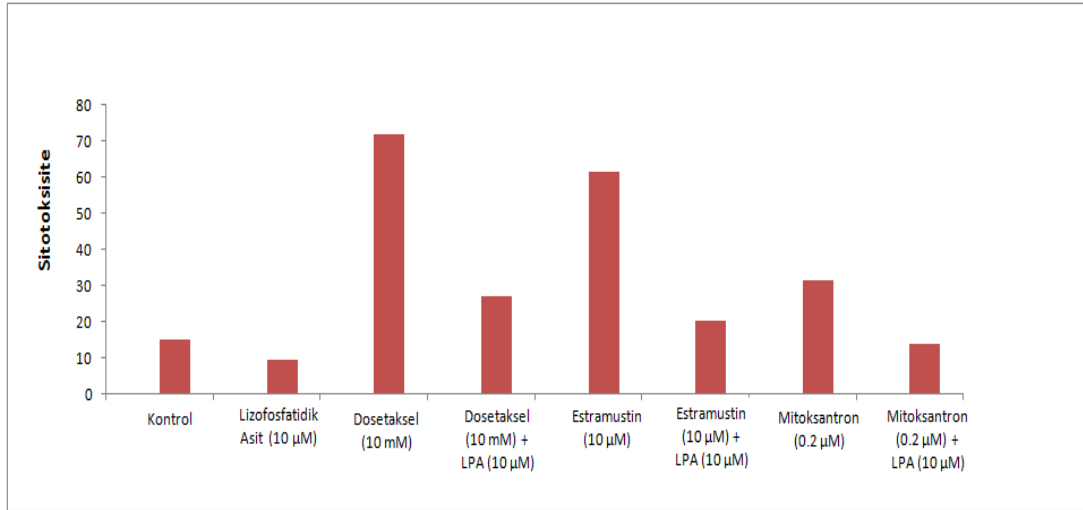
Akış sitometrisinden elde edilen LPA, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA gruplarının apoptozis ölçüm sonuçları Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. Lizofosfatidik asit (LPA), dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin apoptozis değerleri.

Grup	Nekroz % (Q1)	Total apoptozis % (Q2)	Canlı hücre % (Q3)	Erken apoptozis % (Q4)
Kontrol	12.1	0.9	85.2	1.8
LPA	6.2	0.7	90.5	2.6
Dosetaksel	32.8	37.3	27.9	1.9
Dosetaksel+LPA	38.6	20.4	38.5	2.4
Estramustin	7.7	9.7	68.7	13.9
Estramustin+LPA	22.8	4.0	73.0	0.2
Mitoksantron	5.7	3.4	79.8	11.0
Mitoksantron+LPA	7.0	1.7	86.4	4.9

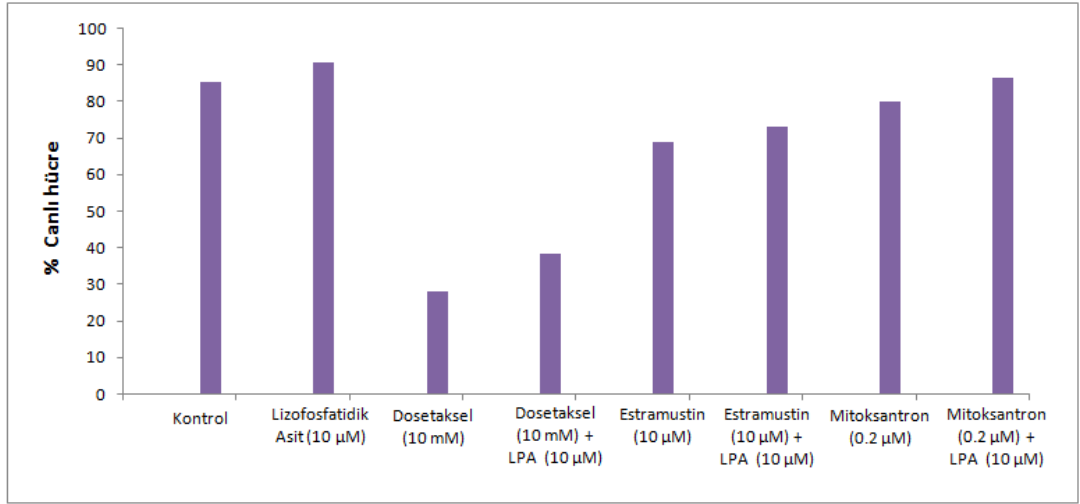
- Q1 : Nekroza giden hücrelerin yüzde oranı.
Q2 : Total apoptozise giden hücrelerin yüzde oranı.
Q3 : Canlı hücrelerin yüzde oranı.
Q4 : Erken apoptotik hücrelerin yüzde oranı.

Lizofosfatidik asit, dosetaksel, estramustin ve mitoksantron uygulanan PC3 hücrelerinin, apoptozis ölçümü sonucunda elde edilen sitotoksosite sonuçları Şekil 4.33'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, PC3 hücrelerinde lizofosfatidik asit kontrol grubuna göre sitotoksisiteyi azaltan etki gösterdi. Dosetaksel, estramustin ve mitoksantron uygulanan gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman, dosetaksel, estramustin ve mitoksantronun sitotoksik etkisi olduğu görüldü. Dosetaksel + LPA, estramustin + LPA, mitoksantron + LPA uygulanan grupların sırasıyla dosetaksel, estramustin ve mitoksantron gruplarından daha düşük sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Böylece, LPA'nın ilaç gruplarının neden olduğu sitotoksisiteyi azalttığı belirlendi.



Şekil 4.33. Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin sitotoksosite (nekroz, erken apoptozis ve total apoptozise giden hücrelerin toplamı) sonuçları.

Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin apoptozis deneyi sonucunda elde edilen % canlı hücre sonuçları Şekil 4.34'de gösterildi. Sonuçlara göre LPA grubuna ait % canlı hücre sayısının kontrol grubundan daha yüksek olduğu görüldü. Dosetaksel, dosetaksel + LPA, estramustin, estramustin + LPA ve mitoksantron gruplarının % hücre sayısı sonuçlarının, kontrol ve LPA gruplarından daha düşük olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlara göre, LPA'nın % canlı hücre sayısını arttırdığı bulundu.



Şekil 4.34. Lizofosfatidik asit, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA uygulanan PC3 hücrelerinin canlı hücre yüzdeleri.

TARTIŞMA

Prostat kanseri batı toplumlarında erkeklerde en sık görülen kanser türüdür (27). Prostat kanseri tanısı konulan hastaların % 30'unda ileri evre hastalık mevcuttur. Bununla beraber % 25 hastada, takipleri sırasında ileri evre hastalık grubuna girmektedir (132). Prostat kanserinin tedavisinde son yıllarda oldukça etkili çalışmalar yapılmıştır. Fakat tekrarlanan terapiler, uygulanan yöntemler hastalarda yan etkilerin ortaya çıkmasına ve toksik etkinin hastaya zarar vermesine başlar. Bu durum hastanın yaşam kalitesinin düşmesine, hatta sekonder nedenle ölümüne neden olabilir. Tekrarlanan terapiler sonrasında, prostat kanseri hastalarında hastalığa direnç mekanizmaları gelişmektedir (133). Metastatik prostat kanserlerinde temel olarak kullanılan tedavi yöntemi cerrahi ya da medikal kastrasyon olmasına rağmen, bu hastaların çoğunda 18-24 ay içerisinde hormona direnç gelişmektedir (51). Başlangıçta “androjen bağımlı” tümörler, tıpkı normal prostat epiteli gibi androjen yokluğunda gerilerler. Cerrahi ya da medikal kastrasyona rağmen büyümesine devam eden tümör “androjen bağımsız” olarak adlandırılır (134). Bu tümörler değişik hormonal yaklaşımlara yanıt verebilirler. Değişik hormonal yaklaşımlara cevap vermeyen tümör “hormona dirençli” olarak kabul edilir. İlk aşamada androjen baskılayıcı tedaviler uygulanan ve daha sonra ilerleyen prostat kanserlerinde en sık kullanılan yöntem antiandrojenlerin geri çekilmesidir. Bu aşamadan sonra ikincil hormonal tedaviler ve sitotoksik kemoterapiler yer almaktadırlar (54).

Kemoterapi, insan vücudunda anormal çoğalan ve sağlıklı dokulara zarar veren hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını durdurmayı veya yok etmeyi amaçlayan bir tedavi biçimidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar oldukça çeşitlilik göstermektedirler. Standart olarak kabul edilebilecek kemoterapi ajanları temel olarak anormal bölünen hücreleri hedef alırlar ve bu hücrelerin çoğalmalarını durdurmayı ve yok etmeyi amaçlarlar. Standart kemoterapi ilaçlarının yanısıra, günümüzde direk zararlı hücrelere yönelik hedefleyici ajanlar, bağışıklık sistemini güçlendiren ilaçlar, hormonal ajanlar ve zararlı hücrelerin biyolojilerini değiştirmeyi amaçlayan ilaçlar artan sıklıkta kullanılmaktadırlar. Her ne kadar kemoterapi ilaçları anormal olarak çoğalmakta ve büyümekte olan zararlı hücreleri hedefliyorsa da, çoğu kere normal hücre büyüme ve çoğalmasına da etki etmektedirler (135).

Etkili bir kemoterapi tedavisi apoptozis sinyal yolağını indüklemelidir. Fakat, kanser hücrelerinde ilaç direncinin gelişmesi veya diğer bazı hücre içi sinyallerin kanser hücrelerinde değişime uğraması sonucu, apoptotik sinyal yolağında hasar meydana gelebilir.

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanlarından olan dosetaksel, estramustin ve mitoksantron bu çalışmada kullanılan ilaçlardır. Dosetaksel bazlı tedaviler, metastatik hormon dirençli prostat kanseri hastalarındaki ilk standart tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmişlerdir (136, 137). Dosetaksel semisentetik taksanın stabil mikrotubul oluşturan türevidir. Dosetaksel'in bu yollarla, hücre döngüsünü

bloke ettiği ve apoptozisi uyarırdığı gösterilmiştir (138). Prostat kanseri kemoterapisinde kullanılan bir diğer ilaç olan estramustinin, mikrotubul bağlı proteine veya tubuline bağlanarak ve mikrotubul fonksiyonunu inhibe ederek etkisini gösterdiği bildirilmiştir (73). Ayrıca, serum testosteron düzeyinde diğer estrogenlere (diethylstilbestrol gibi) benzer şekilde önemli oranda azalmaya sebep olabilmektedir (71). Ancak asıl etki mekanizmasının “mikrotübül ilişkili proteinlere” bağlanmak suretiyle oluştuğu düşünülmektedir (11, 139). Nükleer matriks düzeyinde bağlandığı ve DNA replikasyonunu etkilediği iddia edilmiştir (75). Estramustin de diğer nitrojen mustard kombinasyonları gibi, kanser hücrelerinde Bcl-2 proteinini fosforilleme yoluyla mikrotübülleri bozarak apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (140, 141). Mitoksantron ise, antrasiklin türevi antineoplastik kemoterapi ajanıdır, DNA yapısında hasara neden olarak ve hücre siklusunu geciktirerek etki gösterir (10). Mitoksantron DNA zincirini kırmak, DNA’ya eklenmek, DNA sentezini inhibe etmek, DNA agregasyonuna yol açmak ve hücre siklusunu geciktirmek yollarıyla etki gösterir (79). Mitoksantronun birçok kanser hücre tipinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (142).

Etkili bir kemoterapi tedavisinde kullanılan kemoterapötikler, apoptozis sinyal yolağını indüklemelidir. Fakat, kanser hücrelerinde ilaç direncinin gelişmesi veya diğer bazı hücre içi sinyallerin kanser hücrelerinde değişime uğraması sonucu apoptotik sinyal yolağında hasar meydana gelebilir (18). Yapılan birçok çalışmada çeşitli kanser hücrelerinde LPA sentezinin arttığı, LPA sentezlenmesinde görevli enzim olan lizoPLD’nin gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Lizofosfatidik asit, hücre içinde G protein bağlı reseptörleri aracılığıyla hücre proliferasyonu, migrasyon ve sağkalımda indükleyici olarak etki gösterir. Ayrıca, apoptozis yolağının inhibe edilmesinde de fonksiyonu vardır (18, 143, 144). Lizofosfatidik asidin bu özelliklerinin anlaşılmasından sonra, çeşitli kanser hücrelerinde kemoterapötiklerin oluşturduğu sitotoksositeye karşı LPA’nın etkisi incelenmiştir. Samadi ve arkadaşlarının (18) yaptığı bir çalışmada MCF-7 meme kanseri ve MDA-MB-435 melanoma hücre dizilerinde taksolün indüklediği apoptozise karşı lizoPLD’nin etkisi araştırılmış ve lizoPLD aracılı olarak sentezlenen LPA’nın apoptozisi inhibe ettiği ve kullanılan kemoterapi ajanının sitotoksitesini düşürdüğü görülmüştür. Bu çalışmada, kemoterapi ajanlarının kullanıldığı hücrelerde apoptozisin, bu hücrelere LPA eklendiğinde düştüğü görülmüştür.

Yapılan bazı çalışmalarda, LPA’nın hücre kültüründe kullanılan dozları belirlenmiştir. Umezu-Goto ve arkadaşları (105) yaptıkları bir çalışmada, A-2058 melanoma hücrelerinde LPA’nın en etkin dozunu 10 μ M olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada PC3 hücrelerinde LPA doz denemesi yapıldı. Lizofosfatidik asit 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 15 μ M konsantrasyonlarda hücre kültürüne eklendi. 24 saat inkübasyon yapıldıktan sonra en etkin LPA dozunun 10 μ M olduğu belirlendi. Daha sonra yapılan hücre proliferasyonu, koloni oluşumu ve apoptozis deneylerinde 10 μ M LPA kullanıldı. Xie ve arkadaşları (89) PC3 hücreleri ile yaptığı çalışmada 10 μ M LPA dozunu kullanmışlardır. Bu araştırmacıların PC3 hücrelerinde kullandıkları LPA dozu bizim kullandığımız doz ile tamamen uyumludur. Ptaszynska ve arkadaşları (145), insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ile yaptıkları deneylerde 1-5 μ M arasındaki LPA’yı kullanmışlardır. Araştırmacıların farklı

dozlarda LPA kullanılmasının nedeni, farklı tip hücre dizilerinde çalışılmaları olabilir.

Metastaz anjiogenez, invazyon, migrasyon-motilite ve proliferasyon gibi birbirleriyle ilişkili bir dizi basamakla gerçekleşir. Yapılan birçok çalışmada LPA'nın kanser hücrelerinde fazla sentezlendiği ve metastazın basamakları olan proliferasyonu ve migrasyonu arttırdığı ve bu yolla metastazda etkili olabileceği bildirilmiştir (146).

Prostat kanseri PC3 hücrelerinde kullanılan bazı kemoterapi ajanlarının oluşturduğu hücre toksisitesini gösterebilmek için, hücre proliferasyonu, koloni oluşumu ve apoptozis deneyleri yapıldı. Hücre proliferasyon deneylerinde LPA, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron +LPA PC3 hücrelerine uygulandı.

Hücre proliferasyonunun LPA grubunda kontrol grubuna göre arttığı görüldü. Son zamanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre, LPA'nın Ras-ERK yoluyla PC3 hücrelerinde hücre proliferasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (147). Yaptığımız bu çalışmada elde edilen bulgular, daha önceki çalışmaların sonuçları ile uyum içindedir.

Bu çalışmada, dosetakselin hücre proliferasyonu üzerine etkisi incelendi. İlaç uygulanmayan kontrol grubuna göre, dosetakselin hücre proliferasyonunu düşürdüğü görüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, dosetaksel hücrelerde sitotoksik antimikrotubul ajan olarak fonksiyon gösterir ve apoptozis yolunu aktive eder. Dosetaksel uygulanan hücreler de apoptozise gittiği için hücre proliferasyonu düşer (148). Dosetaksel LPA ile birlikte uygulandığında, LPA'nın apoptozisi inhibe etmesi ile hücrelerin proliferasyonunda artış görüldü (113). Bu bulgu Kramer ve arkadaşları (148) ile Samadi ve arkadaşlarının (18) sonuçları ile uyumludur.

Bu çalışmada, estramustin uygulanan hücrelerin proliferasyonunda kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. Fakat estramustin uygulanan hücre grubu ile dosetaksel uygulanan hücre grubu kıyaslandığında, dosetaksel uygulanan hücre grubunda proliferasyonun daha fazla azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Hücrelere estramustin ile birlikte LPA uygulandığında, estramustin grubuna göre hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Estramustin ile ilgili yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi, estramustin mikrotubul fonksiyonunu inhibe ederek ve DNA replikasyonunu etkileyerek, hücrenin ölümüne neden olmaktadır ve apoptozis yolunu etkin hale getirmektedir. Lizofosfatidik asidin hücre sağkalımında etkin rol oynadığı daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Literatürde yer alan bilgiler ile uyumlu olarak yaptığımız bu çalışmada da, LPA'nın estramustinin oluşturduğu hücre toksisitesine karşı koruyucu bir etkisi tespit edilmiştir.

Mitoksantron ile yaptığımız bu çalışmada, mitoksantronun ilaç uygulanmayan kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu düşürdüğü görüldü. Benzer şekilde mitoksantron ile LPA birlikte uygulandığında, LPA'nın mitoksantronun neden olduğu hücre ölümüne karşı hücrelerin proliferasyonunu arttıran etkisi bulundu. Bütün bu sonuçlardan elde ettiğimiz bilgilere göre, LPA'nın prostat kanseri

kemoterapisinde kullanılan dosetaksel, estramustin ve mitoksantronun oluşturduğu hücre toksisitesine karşı koruyucu etkisinin olduğu ve hücre proliferasyonunu arttırdığı tespit edildi.

İlaç grupları arasında değerlendirme yapıldığında ise, en etkili ilacın dosetaksel olduğu görüldü. Bunun nedeni, dosetaksel'in oluşturduğu mikrotubulün (ortalama 13.4 tubulin subünitesi) büyük olması, hücre içine daha hızlı alınması ve hücre içinde daha uzun süre kalması olabilir. Bu özelliklerinden dolayı in vivo ve in vitro antitümör aktivite çalışmalarında dosetaksel'in daha kuvvetli olduğu görülmüştür (63, 149).

Çeşitli kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda LPA uygulanan hücrelerin, hücre sayısı ve koloni oluşumu, hücre sayma yöntemi veya koloni oluşturma tekniği ile incelenmiştir (150). Bu çalışmada yapılan hücre proliferasyonu deneyinin ardından, LPA ve kemoterapi ilaçlarının uygulandığı hücrelerde koloni oluşumu incelenmiştir.

İlaç uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında, LPA uygulanan hücrelerin oluşturduğu koloni sayısının arttığı, buna karşı dosetaksel, estramustin ve mitoksantron uygulanan hücrelerin oluşturduğu koloni sayısının kontrole göre daha düşük olduğu görüldü. Dosetaksel+LPA, estramustin+LPA ve mitoksantron+LPA uygulanan hücre gruplarında, koloni sayıları kontrol grubuna göre düşük, sırasıyla dosetaksel, estramustin ve mitoksantron gruplarına göre yüksek, LPA grubuna göre düşük olarak gözlemlendi. Yapılan diğer bir çalışma da benzer şekilde LPA'nın yumurtalık kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu arttıran etkisi gözlemlenmiştir (150). Bu sonuçlara göre, PC3 hücrelerinde kemoterapi ilaçlarının oluşturduğu toksisiteye karşı LPA'nın koloni oluşumunu arttırdığı ve hücreleri koruduğu sonucuna varıldı.

Yaptığımız bu çalışmada LPA, dosetaksel, dosetaksel+LPA, estramustin, estramustin+LPA, mitoksantron ve mitoksantron+LPA ile muamele edilen PC3 hücrelerinin apoptotik davranışı incelendi. Akış sitometrisi ile yapılan deneylerin sonucunda elde ettiğimiz bilgilere göre, kontrol grubunun canlı hücre sayısı (Q3) 85.2 olarak belirlendi. Bulunan sonuçlara göre, LPA'nın kontrole göre canlı hücre sayısını arttırdığı tespit edildi. Lizofosfatidik asit uygulanan hücrelerde apoptozise giren hücre sayısı (Q2+Q4) 3.3 olarak belirlendi. Hücrelerin sağkalımının artması ve apoptozisin engellenmesi için ERK aktivasyonu gereklidir. LPA sağkalımı arttırmak için MAPK/ERK aktivasyonunu sağlar. LPA, ERK1/ERK2 fosforilasyonunu gerçekleştirerek bu mekanizmayı aktive eder ve hücre sağkalımını artırır (113). Lizofosfatidik asit, G_i proteini aracılığıyla $G_{\beta\alpha} \rightarrow EGFR \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow ERK$ sinyalini başlatır ve ERK1/ERK2 aktivasyonunu gerçekleştirerek hücre sağkalımını artırır (113). İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur (151). Prostat kanseri ile birlikte birçok tümör hücresinde ERK aktivasyonu artış gösterir. Bizim bulduğumuz sonuçlarda LPA uygulanan hücrelerde sağkalımın artmasının ve apoptozisdeki azalmanın nedeni LPA'nın ERK aktivasyonuna neden olan sinyal yolağını aktive etmesi olabilir.

Bu çalışmada PC3 hücrelerinde, kemoterapi ilaçları olan dosetaksel, estramustin ve mitoksantronun indüklediği apoptozise karşı LPA'nın etkisi incelendi.

Dosetaksel uygulanan hücrelerde apoptozise giren hücre sayısı (Q2+Q4) 39.2 olarak belirlendi. Hücrelere dosetaksel ile birlikte LPA uygulandığında apoptozise giren hücre sayısı (Q2+Q4) 22.8'e düştü. Bu verilere göre, LPA'nın dosetakselin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiği tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda bildirildiği gibi, dosetaksel hücrelerde mikrotubul stabilizasyonunu sağlayarak sitotoksik antimikrotubul ajan olarak fonksiyon gösterir ve apoptozis yolağını aktive eder (148). Bcl-2 değişik uyarılarla oluşan apoptozisi baskılayabilen, Bcl-2 ailesine ait antiapoptotik proteindir. İnsanda en az 17 Bcl-2 ailesi vardır. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: Bcl-2, Bcl-X1, Mcl-1'dir. Daha önce yapılan çalışmalarda, insan prostat kanseri PC3 hücrelerinde Bcl-2'nin normal hücrelere göre 3 kat daha fazla ekprese olduğu bildirilmiştir (152). Dosetaksel Bcl-2 proteininin fosforilasyonunu ve inaktivasyonunu indükleyerek hücrenin apoptozise gitmesini sağlar. Bizim bulduğumuz sonuçlarda dosetaksel uygulanan hücrelerdeki apoptozisin artmasının nedeni Bcl-2 proteininin inaktivasyonunun gerçekleşmesi olabilir. LPA'nın aktive ettiği ERK sinyali Bcl-2 proteininin ekspresyonunu arttırarak dosetakselin etkisini azaltır (153). LPA'nın aktive ettiği ERK sinyali Bcl-2 proteininin ekspresyonunu arttırarak dosetakselin etkisini azaltır (153).

Estramustin uygulanan hücrelerde, apoptozise giren hücre sayısı (Q2+Q4) 23.6 olarak belirlendi. Hücrelere estramustin ile birlikte LPA uygulandığında hücre sayısı (Q2+Q4) 4.2'ye düştü. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, LPA'nın estramustinin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiği tespit edildi. Estramustin, diğer mikrotubul ajanları gibi apoptozise neden olur. Estramustin, nitrojen mustard komponentinin alkilleyici özelliği ile mikrotubul fonksiyonunu inhibe ederek ve Bcl-2 proteininin fosforilasyonu yoluyla apoptozise neden olur (154). Bizim bulduğumuz sonuçlarda estramustin uygulanan hücrelerdeki apoptozisin artmasının nedeni, estramustinin Bcl-2 proteinini fosforillemesi olabilir.

Mitoksantron uygulanan hücrelerde, apoptozise giren hücre sayısı (Q2+Q4) 14.4 olarak bulundu. Hücrelere mitoksantron ile birlikte LPA uygulandığında apoptozise giren hücre sayısı (Q2+Q4) 6.6 olarak tespit edildi. LPA'nın mitoksantronun neden olduğu apoptozisi inhibe ettiği tespit edildi. Mitoksantron, DNA topoizomeraz II'yi stabilize ederek ve serbest radikaller oluşturarak DNA üzerinde kırıklar oluşturur. Böylece mitoksantron hücre ölümüne neden olur. Topoizomeraz, DNA'nın topolojisinde görülen bir izomeraz enzimidir. Topoizomerazlar, DNA'nın uzaydaki üç boyutlu geometrik şeklini değiştirir. Topoizomeraz II DNA'nın iki kolunu da kırar. Mitoksantron, topoizomeraz II inhibitörü olarak apoptozise neden olur. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda, mitoksantronun diğer bir mekanizma olan c-jun aktivasyonunu gerçekleştirerek kanser hücrelerinde apoptozise neden olduğu bildirilmiştir. C-jun aktivasyonu ise ERK tarafından düzenlenir (142, 155). Mitoksantron hücrede, MEKK1→MKK4→JNK→c-JUN iletim mekanizması ile apoptozise neden olur (156). Bizim bulduğumuz sonuçlara göre, mitoksantron uygulanan hücrelerdeki apoptozisin artmasının nedeni c-jun sinyal yolağının aktive olması olabilir.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre PC3 hücrelerinde en çok apoptozise neden olan ilacın dosetaksel olduğu görüldü.

Literatürde çeşitli kemoterapi ilaçları ile yapılan çalışmalarda ilaçların neden olduğu hücre sitotoksitesi gösterilmiştir (142, 157). Ayrıca, LPA'nın hücre sağkalımını, proliferasyonunu ve migrasyonunu artırdığını gösteren birçok çalışma vardır (158, 159). Daha önce yapılan çalışmalarda değişik hücre hatlarında LPA ile kemoterapi ilaçlarının etkileşimi incelenmiştir. Ancak, literatürde prostat kanseri PC3 hücrelerinde bazı kemoterapi ilaçlarının neden olduğu hücre toksisitesi üzerine LPA'nın etkisini inceleyen herhangi bir araştırmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle bu çalışma prostat kanseri PC3 hücreleri ile yapılan ilk çalışma olması nedeniyle literatüre katkıda bulunacaktır. Yaptığımız tüm deneylerin sonuçlarına göre, LPA'nın kemoterapi ajanlarının sitotoksik etkisini azalttığı bulundu. Kemoterapi ajanlarının neden olduğu hücre sitotoksitesini arttırmak için, kanser hücrelerinde salınımı artan LPA miktarının azaltılmasının önemli olabileceği kanısındayız.

SONUÇLAR

Bu araştırmanın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Prostat kanseri PC3 hücrelerinde, lizofosfatidik asidin (LPA) en etkin dozu 10 μ M olarak belirlendi.
2. PC3 hücrelerinde hücre proliferasyonu ölçümü yapılarak, lizofosfatidik asidin kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlendi. Lizofosfatidik asit kontrol grubuna göre % 15,58 oranında hücre proliferasyonunu arttırdı.
3. Hücre proliferasyonu ölçümü sonucunda, dosetaksel, estramustin ve mitoksantronun hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttıkları belirlendi.
4. Dosetaksel, kontrol grubuna göre % 62.77 oranında hücre proliferasyonunu azalttı.
5. PC3 hücrelerine dosetaksel ile birlikte LPA uygulandığında, hücre proliferasyonunda kontrole göre % 48.75 azalma olduğu belirlendi. Dosetaksel ile birlikte LPA uygulandığında, dosetaksel uygulanan hücrelere göre hücre proliferasyonunda artış görüldü.
6. Estramustin hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre % 13.55 oranında azalttı.
7. PC3 hücrelerine estramustin ile birlikte LPA uygulandığında, hücre proliferasyonunda kontrole göre % 2.18 azalma olduğu belirlendi. Estramustin ile birlikte LPA uygulandığında, estramustin uygulanan hücrelere göre hücre proliferasyonunda artış görüldü.
8. Mitoksantron hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre % 32.25 oranında azalttı.
9. PC3 hücrelerine mitoksantron ile birlikte LPA uygulandığında, hücre proliferasyonunda kontrole göre % 24.14 azalma olduğu belirlendi. Mitoksantron ile birlikte LPA uygulandığında, mitoksantron uygulanan hücrelere göre hücre proliferasyonunda artış görüldü.
10. İlaçlar (dosetaksel, estramustin ve mitoksantron) ile birlikte LPA uygulanması hücre proliferasyonunu ilaç gruplarına göre arttırdı.

11. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon denemelerinde hücre proliferasyonu ölçüm değerlerinin, 24 saat sonunda daha yüksek olduğu belirlendi. 24 saat inkübasyonun en etkili süre olduğu belirlendi.
12. Yapılan hücre proliferasyonu deneyi sonuçlarına göre dosetaksel hücre proliferasyonunu düşüren en etkili ilaç olarak belirlendi.
13. Yapılan koloni oluşumu deneyi sonuçlarına göre, LPA uygulanan hücrelerden elde edilen koloni sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Kontrol grubunun koloni sayısı 100 kabul edilerek yüzdeler belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, LPA grubunun koloni yüzdesi kontrol grubuna göre % 17.6 arttığı bulundu.
14. Dosetaksel grubunun koloni yüzdesi kontrole göre % 68.6 oranında azalma gösterdi.
15. Dosetaksel+LPA grubunun, kontrole göre koloni yüzdesini % 43.14 oranında azalttığı görüldü. Dosetaksel+LPA grubu, dosetaksel grubuna göre koloni yüzdesinde artış gösterdi.
16. Estramustin grubunun koloni yüzdesi kontrole göre % 44.82 oranında azalma gösterdi.
17. Estramustin+LPA grubunun koloni yüzdesinde kontrole göre % 23.53 oranında azalttığı görüldü. Estramustin+LPA grubunun koloni yüzdesinde estramustin grubuna göre artış görüldü.
18. Mitoksantron grubunun koloni sayısı kontrole göre % 41.18 oranında azalma gösterdi.
19. Mitoksantron +LPA grubunun koloni yüzdesi kontrole göre % 27.76 oranında azalma gösterdi. Mitoksantron +LPA grubunun koloni yüzdesi mitoksantron grubuna göre artış gösterdi.
20. Kontrol grubu ile kıyaslandığında dosetaksel, estramustin ve mitoksantron uygulanan hücrelerde koloni oluşumu azaldı.
21. İlaçlar (dosetaksel, estramustin ve mitoksantron) ile birlikte LPA uygulanması koloni oluşumunu ilaç gruplarına göre arttırdı.
22. Prostat kanseri hücrelerinde gerçekleşen apoptozis, akış sitometri cihazında Annexin V kiti kullanılarak yüzde olarak belirlendi.
23. Akış sitometrisi ile elde edilen apoptozis ölçüm sonuçlarına göre, kontrol grubunun canlı hücrelerinin yüzdesi (Q3) 85.2 ve LPA uygulanan hücrelerin canlı hücrelerinin yüzdesi (Q3) 90.5 olarak belirlendi.

24. Dosetaksel uygulanan hücrelerde apoptozise giden hücrelerin yüzdesi (Q2+Q4) 39.2 olarak belirlendi.
25. PC3 hücrelerine dosetaksel ile birlikte LPA uygulandığında, canlı hücre yüzdesi (Q2+Q4) 22.8'e düştü. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, LPA'nın dosetakselin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiği tespit edildi.
26. Estramustin uygulanan PC3 hücrelerinde, apoptozise giden hücrelerin yüzdesi (Q2+Q4) 23.6 olarak belirlendi.
27. PC3 hücrelerine estramustin ile birlikte LPA uygulandığında, apoptozise giden hücrelerin yüzdesi (Q2+Q4) 4.2'ye düştü. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, LPA'nın estramustinin neden olduğu apoptozisi inhibe ettiği belirlendi.
28. Mitoksantron uygulanan hücrelerde, apoptozise giden hücrelerin yüzdesi (Q2+Q4) 14.4 olarak belirlendi.
29. PC3 hücrelerine mitoksantron ile birlikte LPA uygulandığında, apoptozise giden hücrelerinin yüzdesi (Q2+Q4) 6.6 olarak tespit edildi. Bu araştırmanın sonuçlarına göre, LPA'nın mitoksantronun neden olduğu apoptozisi inhibe ettiği tespit edildi.
30. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, PC3 hücrelerinde en çok apoptozise neden olan ilacın dosetaksel olduğu bulundu.
31. Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre, PC3 hücrelerinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının (dosetaksel, estramustin ve mitoksantron) oluşturduğu hücre toksisitesi, kanser hücrelerinde salınımı artan LPA aracılığı ile azalmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları ile birlikte LPA sentezini engelleyen bir inhibitörün kullanılması tedavi açısından daha yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C and Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.*, 56:106-130, 2006.
2. Wingo PA, Tong T and Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin.*, 45: 8-30, 1995.
3. Anderson J. Treatment of prostate cancer-the role of primary hormonal therapy. *EAU Update series*, 1:32-39, 2003.
4. Hellerstedt BA and Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin.*, 52:154-179, 2002.
5. Daskivich TJ and Oh WK. Recent progress in hormonal therapy for advanced prostate cancer. *Curr Opin Urol.*, 16: 173-178, 2006.
6. Abrahamsson P. Revaluations in the management of hormone refractory prostate cancer. *Eur Urol Suppl.*, 2:1-2, 2003.
7. Gleave M and Kelly WK. High-risk localized prostate cancer: a case for early chemotherapy. *J Clin Oncol.*, 23: 8186-8191, 2005.
8. Bracarda S, Logothetis C, Sternberg CN and Oudard S. Current and emerging treatment modalities for metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.*, 107(2):13-20, 2011.
9. Slack NH and Murphy GP. Clinical toxicity and long-term results of Emcyt therapy for prostate cancer. *Urology*, 23: 73-77, 1984.
10. Varadwaj P, Sharma A, Kumar R. Mitoxantrone: an agent with promises for anticancer therapies. *Elect J of Biology*, 6: 36-42, 2010.
11. Rutberg M, Friden B, Bjork P and Wallin M. Proteolytic cleavage of high-molecular-weight microtubule-associated proteins by the prostatic estramustine-binding protein. *Prostate*, 15: 287-297, 1989.
12. Stiffness M and Wall M.E. Discovery and development of taxol. In: *Taxol: Science and Applications*. Suffness M, Ed. Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 3-25, 1995.
13. Ringel I and Horwitz SB. Studies with RP 56976 (Taxotere): A semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst.*, 83: 288-291, 1991.

14. Eklov S, Nilsson S, Larson A, Bjork P and Hartley-Asp B. Evidence for a non-estrogenic cytostatic effect of estramustine on human prostatic carcinoma cells in vivo. *Prostate*, 20:43-50, 1992.
15. Rowinsky EK, Wright M, Monsarrat B, Lesser GJ and Donehower RC. Taxol: pharmacology, metabolism and clinical implications. *Cancer Surv.*, 17:283-304, 1993.
16. Bese T, Barbaros M, Baykara E, Guralp O, Cengiz S, Demirkiran F, Sanioglu C and Arvas M. Comparison of total plasma lysophosphatidic acid and serum CA-125 as a tumor marker in the diagnosis and follow-up of patients with epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol.*, 21:248-254, 2010.
17. Fang XJ, Schummer M, Mao ML, Yu SX, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, Tanyi JL, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J and Mills GB. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *BBA-Mol and Cell Biol of Lipids.*, 1582:257-264, 2002.
18. Samadi N, Gaetano C, Goping IS and Brindley DN. Autotaxin protects MCF-7 breast cancer and MDA-MB-435 melanoma cells against Taxol-induced apoptosis. *Oncogene*, 28:1028-1039, 2009.
19. Maranchie JK and Linehan WM. Genetic disorders and renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.*, 30:133-141, 2003.
20. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000.
21. Walsh PC, Vaughan ED and Wein AJ. *Campbell Üroloji. (Çeviri editörü: Anafarta MK and Yaman MÖ). İstanbul, Güneş Tıp Kitabevi Ltd. Şti, p. 4, 2005.*
22. Hsing AW, Tsao L and Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer.*, 85: 60-67, 2000.
23. Potosky AL, Kessler L, Gridley G, Brown CC and Horm JW. Rise in prostatic cancer incidence associated with increased use of transurethral resection. *J Natl Cancer Inst*, 82:1624-1628, 1990.
24. Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC and Kramer BS. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *JAMA.*, 273:548-552, 1995.
25. Yatani RCI, Akazaki K, Syemmermann GN, Welsh RA and Correa P. Geographic pathology of latent prostatic carcinoma. *Int J Cancer*, 29:611-616, 1982.

26. Abrahamsson PA, Falt K and Grimelius L. The course of neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas. An immunohistochemical study testing chromogranin A as an "endocrine marker". *Pathol Res Pract.*, 185:373-380, 1989.
27. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ and Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.*, 55:10-30, 2005.
28. Sakr WA and Crissman JD. High grade prostatic intraepithelial noplasia (HGPIN) and prostatic edenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo*, 8:439-443, 1984.
29. Chan JM, Jou RM and Carroll PR. The relative impact and future burden of prostate cancer in the United States. *J Urol.*, 172: 13-16, 2004.
32. Zorlu F and Fidaner C. İzmir ilinde ürogenital kanserlerin insidans hızları (1995-1996). *Üroonkoloji Bülteni*, 1:2-9, 2004.
33. Je M. Prostate. In: *Histology for pathologists*, 2nd Ed. Sternberg SS, Ed. Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers, pp.1003–1004, 1997.
34. Je M. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr Urol.*, 9:36-54, 1988.
35. Abate-Shen C and Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.*, 14:2410-2434, 2000.
36. Stephenson RA and Mineau GP. The fall in incidence of prostate carcinoma. *Cancer*, 77: 1342-1348, 1995.
37. Rodriguez C, Calle EE, Miracle-McMahill HL, Tatham LM, Wingo PA, Thun MJ and Heath CW. Family history and risk of fatal prostate cancer. *Epidemiology*, 8: 653-657, 1997.
38. Carter BS and Beaty TH. Hereditary prostate cancer: epidemiology and clinical features. *J Urol.*, 150:797-802, 1993.
39. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC and Henderson BE. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet*, 339: 887-889, 1992.
40. Walsh PC, Vaughan ED and Wein AJ. *Campbell's Urology*, 7th Ed. Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 2489-2625, 1998.
41. Chan JM, Giovannucci E, Andersson SO, Yuen J, Adami HO and Wolk A. Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control*, 9: 559-566, 1998.

42. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB and Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*, 150:797-802, 1993.
41. Brasso K, Friis S, Kjaer SK, Jorgensen T and Iversen P. Prostate cancer in Denmark: a 50-year population-based study. *Urology*, 51: 590-594, 1998.
42. Brasso K and Iversen P. Prostate cancer in Denmark. Incidence, morbidity and mortality. *Scand J Urol Nephrol Suppl.*, 203:29-33, 1999.
43. Grimberg A and Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol*, 183:1-9, 2000.
44. Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergstrom R, Signorello LB, Lagiou P, Adami HO and Trichopoulos D. Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study. *J Natl Cancer Inst.*, 90:911-915, 1998.
45. Bild AH, Potti A and Nevins JR. Linking oncogenic pathways with therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 6:735-741, 2006.
46. http://akdeniz.edu.tr/tip/akreditasyon/urology/prostat%20kanseri_org.doc.
47. De Vita VT. The evolution of therapeutic research in cancer. *N Engl J Med.*, 298:907-910, 1978.
48. Frei ACJ and Miller D. The concept of neoadjuvant chemotherapy. In: *Adjuvant therapy of cancer*. Salmon SE, Ed. 5th ed. Orlando, FL, pp.67-68, 1987.
49. Goldie JH. Scientific basis for adjuvant and primary (neoadjuvant) chemotherapy. *Semin Oncol.*, 14:1-7, 1987.
50. De Vita VT. On the value of response criteria in therapeutic research. *Bull Cancer*, 75: 863-869, 1988.
51. Isaacs JT. The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol Clin North Am.*, 26: 263-273, 1999.
52. Janknecht RA. Estramustine phosphate and other cytotoxic drugs in the treatment of poor prognostic advanced prostate cancer. *Prostate Suppl.*, 4: 105-110, 1992.
53. William K and Oh MD. Chemotherapy for patients with advanced prostate carcinoma: a new option for therapy. *Cancer*, 88: 3015-3021, 2000.
54. Calabro F and Sternberg CN. Current indications for chemotherapy in prostate cancer patients. *Eur Urol.*, 51: 17-26, 2007.

55. Attard GC and de Bono JS. Steroid hormone receptors in prostate cancer: a hard habit to break? *Cancer Cell*, 16: 610-620, 2009.
56. Reid AH, Attard G, Barrie E and De-Bono JS. CYP17 inhibition as a hormonal strategy for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol.*, 5: 610-620, 2008.
57. Zivi A, Massard C and De-Bono J. Changing therapeutic paradigms in castrate-resistant prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*, 8: 17-22, 2011.
58. Di Lorenzo G, Buonerba C, Autorino R, De Placido S and Sternberg CN. Castration-resistant prostate cancer: current and emerging treatment strategies. *Drugs*, 70: 983-1000, 2010.
59. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Schmid HP, Van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F and Heidenreich A. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.*, 59: 572-583, 2011.
60. Gueguen G, Granci V, Rogalle P, Briand-Mesange F, Wilson M, Klæbe A, Terce F, Chap H, Salles JP, Simon MF and Gaits F. A lysophosphatidic acid analogue is revealed as a potent inhibitor of phosphatidylcholine synthesis, inducing apoptosis. *Biochem J.*, 368: 447-459, 2002.
61. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P and McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.*, 93: 2325-2327, 1971.
62. Arbuck SG and Blaylock BA. Taxol: Clinical results and current issues. In *Taxol: Science and Applications*. Suffness M. Ed. Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 379-415, 1995.
63. Eisenhauer E and Vermorken JB. The Taxoids. *Drugs*, 55: 5-30, 1998.
64. Lacroix H and Ligeza C. Docetaxel (Taxotere) - an update. *Expert Opin Investig Drugs*, 7: 273-281, 1998.
65. Rose WC. Preclinical antitumor activity of taxanes. In *Taxol: Science and Applications*. Suffness M. Ed. Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 209-236, 1995.
66. Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med.*, 48:353-374, 1997.
67. Schiff PB, Fant J and Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277: 665-667, 1979.

68. Bruno R and Sanderink GJ. Pharmacokinetics and metabolism of Taxotere (docetaxel). *Cancer Surv.*, 17: 305-313, 1993.
69. Harris JW, Katki A, Anderson LW, Chmurny GN, Paukstelis JV and Collins JM. Isolation, structural determination, and biological activity of 6 alpha-hydroxytaxol, the principal human metabolite of taxol. *J Med Chem.*, 37:706-709, 1994.
70. Pienta KJ and Lehr JE. Inhibition of prostate cancer growth by estramustine and etoposide: evidence for interaction at the nuclear matrix. *J Urol.*, 149: 1622-1625, 1993.
71. Fossa SD, Fossa J and Aakvaag A. Hormone changes in patients with prostatic carcinoma during treatment with estramustine phosphate. *J Urol.*, 118:1013-1018, 1977.
72. Panda D, Miller HP, Islam K and Wilson L. Stabilization of microtubule dynamics by estramustine by binding to a novel site in tubulin: a possible mechanistic basis for its antitumor action. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 94: 10560-10564, 1997.
73. Tew KD, Glusker JP, Hartley-Asp B, Hudes G and Speicher LA. Preclinical and clinical perspectives on the use of estramustine as an antimetabolic drug. *Pharmacol Ther.*, 56:323-339, 1992.
74. Hudes G. Estramustine-based chemotherapy. *Semin Urol Oncol.*, 15:13-19, 1997.
75. Dahllof BA, Cabral F and Hartley Asp B. Estramustine depolymerizes microtubules by binding to tubulin. *Cancer Res.*, 53:4573-4581, 1993.
76. Speicher LA, Barone LR, Chapman AE, Hudes GR, Laing N, Smith CD and Tew KD. P-glycoprotein binding and modulation of the multidrug-resistant phenotype by estramustine. *J Natl Cancer Inst.*, 86:688-694, 1994.
77. Hedlund PO, Jacobsson H, Vaage S, Hahne B, Sandin T, Kontturi M, Nordle O and Esposti P. Treatment of high-grade, high-stage prostate cancer with estramustine phosphate or diethylstilbestrol. A double-blind study. The SPCG-1 Study Group. *Scand J Urol Nephrol.*, 31: 167-172, 1997.
78. Tew KD and Stearns ME. Hormone-independent, non-alkylating mechanism of cytotoxicity for estramustine. *Urol Res.*, 15: 155-160, 1987.
79. Ehninger G, Schuler U, Proksch B, Zeller KP and Blanz J. Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone. *Clin Pharmacokinet.*, 18: 365-380, 1990.

80. Rosenberg LJ and Hittelman WN. Direct and indirect clastogenic activity of anthracenedione in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, 43: 3270-3275, 1983.
81. Fidler JM, DeJoy SQ and Gibbons JJ. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol.*, 137:727-732, 1986.
82. Jamison JM, Krabill K, Flowers DG and Tsai C. Enhancement of the antiviral activity of poly r(A-U) by ametantrone and mitoxantrone. *Life Sci.*, 46:653-661, 1990.
83. Moolenaar WH, Van Der Bend RL, Van Corven EJ, Jalink K, Eichholtz T and Van Blitterswijk WJ. Lysophosphatidic acid: a novel phospholipid with hormone- and growth factor-like activities. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 57: 163-167, 1992.
84. Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid signalling. *Curr Opin Cell Biol.*, 7:203-210, 1995.
85. Van Corven EJ, Van Rijswijk A, Jalink K, Van Der Bend RL, Van Blitterswijk WJ and Moolenaar WH. Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J.*, 281(1):163-169, 1992.
86. Moolenaar WH, Jalink K and Van Corven EJ. Lysophosphatidic acid: a bioactive phospholipid with growth factor-like properties. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 119:47-65, 1992.
87. Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol.*, 15:477-489, 2004.
88. Xie Y, Gibbs TC and Meier KE. Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta.*, 1582: 270-281, 2002.
89. Xie Y, Gibbs TC, Mukhin YV and Meier KE. Role for 18:1 lysophosphatidic acid as an autocrine mediator in prostate cancer cells. *J Biol Chem.*, 277:32516-32526, 2002.
90. Lynch KR and Macdonald TL. Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid analogs. *Biochim Biophys Acta.*, 1582: 289-294, 2002.
91. Di Lorenzo G, Buonerba C, Autorino R, De Placido S and Sternberg CN. Castration-resistant prostate cancer: current and emerging treatment strategies. *Drugs*, 70: 983-1000, 2010.

92. Fourcade O, Le Balle F, Fauvel J, Simon MF and Chap H. Regulation of secretory type-II phospholipase A2 and of lysophosphatidic acid synthesis. *Adv Enzyme Regul.*, 38:99-107, 1998.
93. Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaige B, Gassama-Diagne A, Fauvel J, Salles JP, Mauco G, Simon MF and Chap H. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett.*, 410: 54-58, 1997.
94. Goetzl EJ. Pleiotypic mechanisms of cellular responses to biologically active lysophospholipids. *Prostaglandins*, 64: 11-20, 2001.
95. Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol.*, 15:477-489, 2004.
96. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I and Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J.*, 291(3): 677-680, 1993.
97. Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y and Tigyi G. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem.*, 277: 21197-21206, 2002.
98. Pages C, Daviaud D, An S, Krief S, Lafontan M, Valet P and Saulnier-Blache JS. Endothelial differentiation gene-2 receptor is involved in lysophosphatidic acid-dependent control of 3T3F442A preadipocyte proliferation and spreading. *J Biol Chem.*, 276:11599-11605, 2001.
99. Pages C, Simon M, Valet P and Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins*, 64:1-10, 2001.
100. Federico L, Pamuklar Z, Smyth SS and Morris AJ. Therapeutic potential of autotaxin/lysophospholipase D inhibitors. *Curr Drug Targets*, 9: 698-708, 2008.
101. Xie Y and Meier KE. Lysophospholipase D and its role in LPA production. *Cell Signal*, 16:975-981, 2004.
102. Nakamura K, Takeuchi T, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Tozuka M, Aoki J, Arai H, Ikeda H, Ohshima N, Kitamura T and Yatomi Y. Serum lysophospholipase D/autotaxin may be a new nutritional assessment marker: study on prostate cancer patients. *Ann Clin Biochem.*, 44:549-556, 2007.
103. Tokumura A, Miyake M, Nishioka Y, Yamano S, Aono T and Fukuzawa K. Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol Reprod.*, 61:195-199, 1999.

104. Ferguson CG, Bigman CS, Richardson RD, Van Meeteren LA, Moolenaar WH and Prestwich GD. Fluorogenic phospholipid substrate to detect lysophospholipase D/autotaxin activity. *Org Lett.*, 8:2023-2026, 2006.
105. Umezu-Goto M, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J and Arai H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *Cell Biology*, 15:227-233, 2002.
106. Van Meeteren LA. Lysophospholipase D/Autotaxin in lysophospholipid biology. *Curr Enzyme Inhibition*, 3:13-17, 2007.
107. Contos JJ, Ishii I and Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol.*, 58:1188-1196, 2000.
108. Song Li BW, Yan Xu and Junjie Zhang. Autotaxin is induced by TSA through HDAC3 and HDAC7 inhibition and antagonizes the TSA-induced cell apoptosis. *Molecular Cancer*, 10:18, 2011.
109. Guo R, Kasbohm EA, Arora P, Sample CJ, Baban B, Sud N, Sivashanmugam P, Moniri NH and Daaka Y. Expression and function of lysophosphatidic acid LPA1 receptor in prostate cancer cells. *Endocrinology*, 147: 4883-4892, 2006.
110. Moolenaar WH. Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage. *J Cell Biol.*, 158:197-199, 2002.
111. Aoki J and Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta.*, 1781:513-518, 2008.
112. Zeng Y, Kakehi Y, Nouh MA, Tsunemori H, Sugimoto M and Wu XX. Gene expression profiles of lysophosphatidic acid-related molecules in the prostate: relevance to prostate cancer and benign hyperplasia. *Prostate*, 69:283-292, 2009.
113. Fang X, Yu S, LaPushin R, Lu Y, Furui T, Penn LZ, Stokoe D, Erickson JR, Bast RC, Jr. and Mills GB. Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J.*, 352(1):135-143, 2000.
114. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239-257, 1972.
115. Igney FH and Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2: 277-288, 2002.

116. McKnight JJ, Gray SB, O'Kane HF, Johnston SR and Williamson KE. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. *J Urol*, 173:683-690, 2005.
117. Kayıhan E. Akciğer Kanseri tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. Bursa, Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti., p.7, 2001.
118. Riedl SJ. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 5: 897-907, 2004.
119. Shibue T and Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer*, 119:2036-2043, 2006.
120. Holtzman FW, Steiner MR, Keller JN, Mark RJ, Mattson MP and Steiner SM. Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons. *J Neurochem.*, 70:66-76, 1998.
121. Özen HTL. Üroonkoloji. Ankara, Ertem Basım Yayın, p. 31, 2007.
122. Zhang X, Jin TG, Yang H, DeWolf WC, Khosravi-Far R and Olumi AF. Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res.*, 64:7086-7091, 2004.
123. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63, 1983.
124. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267:1456-1462, 1995.
125. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA and Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem.*, 272:26159-26165, 1997.
126. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V and Gazzola GC. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J Histochem Cytochem.*, 46: 895-900, 1998.
127. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST and Van Oers M. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84:1415-1420, 1994.
128. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C and Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3:115-121, 1998.

129. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P and Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod.*, 4:757-762, 1998.
130. Zhang G, Gurtu V, Kain SR and Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*, 23:525-531, 1997.
131. Kockx MJ, Knaapen MWM and De Meyer GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol Res Pract.*, 152:885, 1998.
132. Bono AV. Overview of current treatment strategies in prostate cancer. *European Urology Suppl.*, 3:2-7, 2004.
133. Szasz A. Hyperthermia, a modality in the wings. *J Cancer Res Ther.*, 3:56-66, 2007.
134. Oh WK. Chemotherapy for patients with advanced prostate carcinoma: a new option for therapy. *Cancer*, 88:3015-3021, 2000.
135. Uslu R and Bıçaklı D. *Onkoloji hastaları için kemoterapi el kitabı*. Bornova, İzmir, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, s. 5-8, 2010.
136. Bracarda S, Logothetis C, Sternberg CN and Oudard S. Current and emerging treatment modalities for metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int.*, 107 (2):13-20, 2011.
137. Sartor O, Halstead M and Katz L. Improving outcomes with recent advances in chemotherapy for castrate-resistant prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*, 8:23-28, 2010.
138. Hennequin C, Giocanti N and Favaudon V. S-phase specificity of cell killing by docetaxel (taxotere) in synchronised HeLa cells. *Br J Cancer*, 71:1194-1198, 1995.
139. Sheridan VR, Speicher LA and Tew KD. The effects of estramustine on metaphase and anaphase in DU 145 prostatic carcinoma cells. *Eur J Cell Biol.*, 54:268-276, 1991.
140. Haldar S, Chintapalli J and Croce CM. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 56:1253-1255, 1996.
141. Kondoh M, Usui T, Nishikiori T, Mayumi T and Osada H. Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin. *Biochem J.*, 340(2):411-416, 1999.

142. Boland MP, Fitzgerald KA and O'Neill LA. Topoisomerase II is required for mitoxantrone to signal nuclear factor kappa B activation in HL60 cells. *J Biol Chem.*, 275:25231-25238, 2000.
143. Ishii I, Contos JJ, Fukushima N and Chun J. Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol.*, 58:895-902, 2000.
144. Van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, Van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH and Jonkers J. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol.*, 26: 5015-5022, 2006.
145. Ptaszynska MM, Pendrak ML, Stracke ML and Roberts DD. Autotaxin signaling via lysophosphatidic acid receptors contributes to vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration. *Mol Cancer Res.*, 8:309-321, 2010.
146. Li H, Wang D, Zhang H, Kirmani K, Zhao Z, Steinmetz R and Xu Y. Lysophosphatidic acid stimulates cell migration, invasion, and colony formation as well as tumorigenesis/metastasis of mouse ovarian cancer in immunocompetent mice. *Mol Cancer Ther.*, 8: 1692-1701, 2009.
147. Daaka Y. Mitogenic action of LPA in prostate. *Biochim Biophys Acta.*, 1582: 265-269, 2002.
148. Kramer G, Schwarz S, Hagg M, Havelka AM and Linder S. Docetaxel induces apoptosis in hormone refractory prostate carcinomas during multiple treatment cycles. *Br J Cancer*, 94:1592-1598, 2006.
149. Lavelle F, Bissery MC, Combeau C, Riou JF, Vrignaud P and Andre S. Preclinical evaluation of docetaxel (taxotere). *Semin Oncol.*, 22:3-16, 1995.
150. Wang C, Michener CM, Belinson JL, Vaziri S, Ganapathi R and Sengupta S. Role of the 18:1 lysophosphatidic acid-ovarian cancer immunoreactive antigen domain containing 1 (OCIAD1)-integrin axis in generating late-stage ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.*, 9:1709-1718, 2010.
151. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.*, 351(2):289-305, 2000.
152. Liu QY and Stein CA. Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression. *Clin Cancer Res.*, 3:2039-2046, 1997.

153. Galante JM, Mortenson MM, Bowles TL, Virudachalam S and Bold RJ. ERK/BCL-2 pathway in the resistance of pancreatic cancer to anoikis. *J Surg Res.*, 152: 18-25, 2009.
154. Yoshida D, Noha M, Watanabe K, Takahashi H, Sugisaki Y and Teramoto A. Induction of apoptosis by estramustine phosphate mediated by phosphorylation of bcl-2. *J Neurooncol.*, 54:23-29, 2001.
155. Leppa S, Saffrich R, Ansorge W and Bohmann D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J.*, 17: 4404-4413, 1998.
156. Stadheim TA and Kucera GL. C-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for mitoxantrone- and anisomycin-induced apoptosis in HL-60 cells. *Leuk Res.*, 26: 55-65, 2002.
157. Petrylak DP. Chemotherapy for androgen-independent prostate cancer. *World J Urol.*, 23:10-13, 2005.
158. Yang M, Zhong WW, Srivastava N, Slavin A, Yang J, Hoey T and An S. G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the β -catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 102:6027-6032, 2005.
159. Koh JS, Lieberthal W, Heydrick S and Levine JS. Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J Clin Invest.*, 102:716-727, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Gizem Esra PARLAK, 9 Kasım 1983 tarihinde Zonguldak' da doğdu. İlkokul öğrenimini Rize Reşadiye İlkokulu'nda, ortaokul eğitimini İskenderun Beş Temmuz Ortaokulu'nda ve lise eğitimini Antalya Gazi Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında üniversite lisans eğitimini Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nde tamamladı. 2009 yılı ocak ayında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir.