



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**FENİLBORONİK ASİTİN ANDROJEN BAĞIMLI (LNCaP) VE
ANDROJEN BAĞIMSIZ (PC3) PROSTAT KANSERİ
HÜCRELERİNE ETKİSİNİN MAP KİNAZLAR
ÜZERİNDEN, 2D VE 3D KÜLTÜR YÖNTEMLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

DUYGU GÜRSOY

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. İLKNUR KESKİN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. M. BAŞAK TUNALI

İSTANBUL – 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Duygu GÜRSOY
Tez Başlığı : Fenilboronik Asitin Androjen Bağımlı (LNCaP) ve Androjen Bağımsız (PC3) Prostat Kanseri Hücrelerine Etkisinin MAP Kinazlar Üzerinden, 2D ve 3D Kültür Yöntemleri İle Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 26.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Doç.Dr. İlknur KESKİN	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üyeleri</u>		
Dr.Öğr.Üyesi Seda KARABULUT	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Doç.Dr. Sultan Sibel ERDEM	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Doç.Dr. Gökhan CÜCE	Necmettin Erbakan Üniversitesi	
Prof.Dr. Haydar Kamil ÇAM	Marmara Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Duygu Gürsoy

TEŞEKKÜR

Hem profesyonel akademik hayatımda hem de doktora eğitimimde her an ilgisini ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez danışmanlığından çok daha fazlasını paylaşabilme fırsatı bulduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. İlknur Keskin'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez deney sürecimi yakından takip eden ve her zaman desteğini hissettiğim kıymetli ikinci danışman hocam Doç. Dr. Başak Tunalı'ya

Eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübeleri ile yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a, Doç. Dr. Sultan Sibel Erdem'e ve Dr. Yasemin Yozgat'a

Deneylerim süresince SABİTA bünyesinde faydalandığım imkanlardan dolayı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Bahar Güntekin'e, Dr. Öğr. Üyesi Pakize Yiğit'e, Dr. Öğr. Üyesi Neşe Ayşit'e, Dr. Öğr. Üyesi Çağrı Çakıcı'ya,

Tez çalışmam boyunca katkı ve desteklerinden dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Şule Ayla'ya, Dr. Öğr. Üyesi Bircan Kolbaşı'na ve tüm anabilim dalı ekibimize,

Tez deneylerime özveri ve fedakarlıkla yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Öğr. Görevlisi Arzu Güneş'e ve Arş. Gör. Arife Ahsen Kaplan'a,

Tez sürecimde desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. M. Volkan Bülbül, Öğr. Gör. S. Mervenur Kalender, Dr. Mehmet Şerif Aydın'a, Arş. Gör. Olgu Enis Tok'a, Dr. Şükriye Bilir'e, Nihan Verimli'ye, Oğuzhan Köse'ye, İlham Bahhar'a, İlayda Aydın'ya, Emre Vatandaşlar'a, Burcu Vatandaşlar'a, Tuba Oğuz'a, Erhan Demirel'e, Dr. Ünsal Veli Üstündağ'a ve Arş. Gör. Feyza Bayramoğlu'na,

Doktora eğitim sürecimin her aşamasındaki resmi işlemler ve tüm manevi destekleri için başta Göknil Erbatu Çelik olmak üzere tüm Sağlık Bilimleri Enstitü Sekreterliği ekibine,

Akademik hayatımın başından beri sabırla destek olan ailem Ömer Gürsoy, Serap Akçaoğlu, Sevda Gürsoy, İlyas Akçaoğlu, kardeşim Erdem Gürsoy'a ve bu süreci omuz omuza paylaştığım hayat arkadaşım Emre Gürgen'e

en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Prostat Kanseri.....	6
4.2. Antikarsinojen Tedaviler	8
4.2.1. Mikrotübül odaklı tedaviler.....	8
4.2.1.1. Kolşisin (C ₂₂ H ₂₅ NO ₆)	11
4.2.1.2. Fenilboronik asit (C ₆ H ₇ BO ₂)	12
4.3. 2D ve 3D Hücre Kültürü Modelleri Karşılaştırılması	14
4.4. Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı	15
4.4.1. Kanserde MAPK	16
5. MATERYAL VE METOD.....	19
5.1. Hücre Kültürü.....	19
5.1.1. 2D hücre kültürü modeli	20
5.1.2. 3D hücre kültürü modeli	20
5.1.3. FBA uygulaması	22
5.1.4. Kolşisin uygulaması	22
5.2. Canlılık Analizleri	23
5.2.1. MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] canlılık analizi.....	23
5.2.2. CellTiter-Glo® 3D hücre canlılık analizi	24
5.3. Koloni Formasyon Analizi	25
5.4. Migrasyon Analizi (Çizik Testi).....	26
5.5. Hücre Proliferasyon Analizi (Ki-67 Testi).....	26
5.5.1. Akış sitometri analizi	27
5.6. İmmünofloresan Analiz	28
5.7. Transmisyon Elektron Mikroskobi.....	29
5.8. İstatistiksel Analiz	30
6. BULGULAR	32
6.1. Canlılık Analizleri	32
6.1.1. 2D kültür modeli	32
6.1.1. 3D kültür modeli	36
6.2. Koloni Formasyon Analizi	41
6.3. Migrasyon Analizi	44

6.4.	Proliferasyon Analizi.....	47
6.5.	İmmünofloresan Analiz.....	56
6.6.	Transmisyon Elektron Mikroskobi.....	92
7.	TARTIŞMA	113
8.	SONUÇ.....	120
9.	KAYNAKLAR.....	121
10.	ETİK KURUL ONAYI.....	135
11.	ÖZGEÇMİŞ.....	137



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

2D: 2 dimension (İki boyutlu)

3D: 3 dimension (Üç boyutlu, sferoid)

CDK: Cyclin-dependent kinases (Siklin bağımlı kinaz)

DMSO: Dimetil sülfoksit

ECM: Extracellular matrix (Ekstra selüler matriks)

EGFR: Epidermal growth factor receptor (Epidermal büyüme faktörü reseptörü)

EMT: Epitelyal-mezenşimal transformasyon

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

FBA: Fenilboronik asit

FGF: Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)

IC₅₀: %50 inhibitory concentration (%50 inhibitör konsantrasyon)

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

L2F: 24 saat FBA uygulanan LNCaP hücreleri

L2K: 24 saat Kolşisin uygulanan LNCaP hücreleri

L4F: 48 saat FBA uygulanan LNCaP hücreleri

L4K: 48 saat Kolşisin uygulanan LNCaP hücreleri

LK: Kemoterapötik uygulanmayan LNCaP hücreleri

LNCaP: İnsan kastrasyon bağımlı prostat kanseri hücre hattı

MAPK: Mitogen-activated protein kinases (Mitojen aktive protein kinaz)

MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

P2F: 24 saat FBA uygulanan PC3 hücreleri

P2K: 24 saat Kolşisin uygulanan PC3 hücreleri

p38: p38 MAPK proteini

P4F: 48 saat FBA uygulanan PC3 hücreleri

P4K: 48 saat Kolşisin uygulanan PC3 hücreleri

p53: Hücre sel tümör antijeni

PBS: Phosphate buffer solution (Fosfat tampon solüsyonu)

PC3: İnsan kastrasyon bağımsız prostat kanseri hücre hattı

PDGF: Platelet-derived growth factor (Platelet türevli büyüme faktörü)

PK: Kemoterapötik uygulanmayan PC3 hücreleri

PTEN: Phosphatase and tensin homologue (Fosfataz ve tensin homolog)

R2F: 24 saat FBA uygulanan RWPE-1 hücreleri

R2K: 24 saat Kolşisin uygulanan RWPE-1 hücreleri

R4F: 48 saat FBA uygulanan RWPE-1 hücreleri

R4K: 48 saat Kolşisin uygulanan RWPE-1 hücreleri

RWPE-1: İnsan normal prostat epiteli hücre hattı

TGF: Transforming growth factor (Transforme edici büyüme faktörü)

Wnt: Wingless/Integrated

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1 Deney gruplarının kısaltmaları ve açıklımları.....	23
Tablo 6.1 2D kültür modelinde RWPE-1, LNCaP ve PC3 hücrelerine FBA ve Kolşisin uygulamalarının IC ₅₀ değeri.....	35
Tablo 6.2 3D kültür modelinde LNCaP ve PC3 hücrelerine uygulanan FBA ve Kolşisin IC ₅₀ değeri.....	40
Tablo 6.3 Kontrole kıyasla gruplardaki proliferasyon yüzdelerinde azalma (%)	56



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 Mikrotübülün dinamik instabilitesi (77).....	10
Şekil 4.2 Mikrotübül hedefli kemoterapötiklerin bağlanma bölgeleri (78).....	10
Şekil 4.3 Kolşisin'in üretildiği ve acı çiğdem olarak bilinen (A) Colchicum autumnale bitkisi ve (B) karakteristik üçlü hegzamerik yapısı (75, 83).....	11
Şekil 4.4 (A) Mikrotübül oluşumu ve (B) Kolşisin bağlanma bölgesi (74)	12
Şekil 4.5 FBA'nın kimyasal yapısı (91)	13
Şekil 4.6 MAPK sinyal yolağı (Bu şekil BioRender.com programındaki "Three Major MAP Kinase Pathways_ ERK, JNK, p38" taslağının düzenlenmesi ile oluşturuldu) 16	
Şekil 5.1 Çalışmada kullanılan hücre hatları (Bu şekil BioRender.com programında oluşturuldu)	19
Şekil 5.2 Koloni formasyonu uygulama zamanı çizelgesi (Bu şekil BioRender.com programında oluşturuldu).....	25
Şekil 6.1 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerine ait grupların IC ₅₀ grafikleri	33
Şekil 6.2 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinin IC ₅₀ grafikleri	34
Şekil 6.3 2D kültür modelinde RWPE-1 hücrelerinin IC ₅₀ grafikleri.....	35
Şekil 6.4 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinin IC ₅₀ grafikleri	37
Şekil 6.5 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinin IC ₅₀ grafikleri	38
Şekil 6.6 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinin IC ₅₀ grafikleri. IC ₅₀ değerlerinin üzerindeki konsantrasyonlar uygulanan doz aralığı değerleridir	39
Şekil 6.7 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinin IC ₅₀ grafikleri. IC ₅₀ değerlerinin üzerindeki konsantrasyonlar uygulanan doz aralığı değerleridir	40
Şekil 6.8 2D kültür modelinde kemoterapötik uygulanan LNCaP hücre hattına ait tedavi grupların 3 tekrarlı ve Kontrol grubunun koloni formasyon petripleri	42
Şekil 6.9 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin koloni sayıları.....	42
Şekil 6.10 2D kültür modelinde kemoterapötik uygulanan PC3 hücre hattına ait 3 tekrarlı ve Kontrol grubunun koloni formasyon petripleri.....	43
Şekil 6.11 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin koloni sayıları.....	43
Şekil 6.12 FBA ve Kolşisin uygulanmış LNCaP hücrelerinde migrasyon alanları. Büyütme: 10X	45
Şekil 6.13 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin migrasyon alanı kapanma oranları	45
Şekil 6.14 FBA ve Kolşisin uygulanmış PC3 hücrelerinde migrasyon alanları. Büyütme: 10X	46
Şekil 6.15 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin migrasyon alanı kapanma oranları	46
Şekil 6.16 2D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri	48
Şekil 6.17 2D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri	49
Şekil 6.18 2D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri	50

Şekil 6.19 2D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri	51
Şekil 6.20 3D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri	52
Şekil 6.21 3D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri	53
Şekil 6.22 3D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri	54
Şekil 6.23 3D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri	55
Şekil 6.24 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) LK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X.....	59
Şekil 6.25 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	60
Şekil 6.26 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2K ve (B) L4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	61
Şekil 6.27 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) PK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X.....	62
Şekil 6.28 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	63
Şekil 6.29 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2K ve (B) P4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	64
Şekil 6.30 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) LK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	65
Şekil 6.31 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	66
Şekil 6.32 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2K ve (B) L4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	67
Şekil 6.33 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) PK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	68
Şekil 6.34 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	69

Şekil 6.35 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2K ve (B) P4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	70
Şekil 6.36 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) LK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	71
Şekil 6.37 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	72
Şekil 6.38 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2K ve (B) L4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	73
Şekil 6.39 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) PK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	74
Şekil 6.40 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	75
Şekil 6.41 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2K ve (B) P4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	76
Şekil 6.42 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) LK ve (C) L2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	77
Şekil 6.43 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	78
Şekil 6.44 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) PK ve (C) P2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	79
Şekil 6.45 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X	80
Şekil 6.46 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) LK ve (C) L2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	81
Şekil 6.47 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	82
Şekil 6.48 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) PK grup ve (C) P2K grupları. Beyaz ok	

immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	83
Şekil 6.49 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X	84
Şekil 6.50 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) LK grup ve (C) L2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	85
Şekil 6.51 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	86
Şekil 6.52 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) PK grup ve (C) P2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	87
Şekil 6.53 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.....	88
Şekil 6.54 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde ERK immünofloresan intensite oranları.....	89
Şekil 6.55 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinde ERK immünofloresan intensite oranları.....	89
Şekil 6.56 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde JNK immünofloresan intensite oranları.....	90
Şekil 6.57 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinde JNK immünofloresan intensite oranları.....	90
Şekil 6.58 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde p38 immünofloresan intensite oranları.....	91
Şekil 6.59 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinde p38 immünofloresan intensite oranları.....	91
Şekil 6.60 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden gruplarından yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip LNCaP hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X	93
Şekil 6.61 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden. Apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X	94
Şekil 6.62 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip PC3 hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X.....	95
Şekil 6.63 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X.....	96
Şekil 6.64 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X	97
Şekil 6.65 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip bölünmekte olan LNCaP hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X.....	98

Şekil 6.66 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X.....	99
Şekil 6.67 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X.....	100
Şekil 6.68 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X.....	101
Şekil 6.69 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip bölünmekte olan PC3 hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X.....	102
Şekil 6.70 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X.....	103
Şekil 6.71 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X.....	104
Şekil 6.72 2D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Normal morfolojiye sahip nukleus (kırmızı yıldız) ve normal morfolojiye sahip filopodlar (LK, kırmızı ok), apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), apoptotik tomurcuklanma (L2F, kırmızı ok), vakuol (kırmızı kesikli daire),.....	105
Şekil 6.73 2D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Çift nukleolus (kırmızı yıldız), vakuol (kırmızı kesikli daire), hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok)	106
Şekil 6.74 2D kültür modelinde PC3 hücreleri. Normal morfolojiye sahip filopodlar (kırmızı ok), çift nukleolus (kırmızı yıldız), hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok), vakuol (kırmızı kesikli daire).....	107
Şekil 6.75 2D kültür modelinde PC3 hücreleri. Hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok), vakuol (kırmızı kesikli daire).....	108
Şekil 6.76 3D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Normal morfolojiye sahip filopodlar (kırmızı ok), Normal morfolojiye sahip nukleus (kırmızı yıldız), apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), vakuol (kırmızı kesikli daire)	109
Şekil 6.77 3D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), apoptotik cisimler (kırmızı ok) ve vakuol (kırmızı kesikli daire)	110
Şekil 6.78 3D kültür modelinde PC3 hücreleri. Normal morfolojiye sahip nukleus (kırmızı yıldız), normal morfolojiye sahip filopod (kırmızı ok), hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok başı).....	111
Şekil 6.79 3D kültür modelinde PC3 hücreleri. Apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), çift nukleolus (kırmızı yıldız), apoptotik cisim (kırmızı ok).....	112

1. ÖZET

Fenilboronik Asitin Androjen Bağımlı (LNCaP) ve Androjen Bağımsız (PC3) Prostat Kanseri Hücrelerine Etkisinin MAP Kinazlar Üzerinden, 2D ve 3D Kültür Yöntemleri ile Araştırılması

Prostat kanseri androjene bağımlı olarak seyrederken, kastrasyon oluşturulduğunda hastalıkta gerileme görülebilmektedir. Çalışmamızda androjen bağımsız PC3, androjen bağımlı LNCaP ve sağlıklı prostat hücre hattı RWPE-1 kullanıldı. İnsan prostat kanserinde mikrotübül hedefli tedavi etkilerini incelemek amacıyla, doğada boron formunda bulunan ve esansiyel bir bileşik olan FBA kemoterapötik olarak seçildi. FBA'nın tubulin polimerizasyon inhibisyonu etkisini karşılaştırabilmek için aynı sınıfta yer alan Kolşisin pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. 2D kültür modelinde 3 hücre hattına FBA ve Kolşisin uygulanarak canlılık analizleri yapıldı. Prostat kanseri hücrelerine koloni formasyon analizi, çoğalma analizi ve migrasyon analizi yapılarak kemoterapötiklerin etkileri karşılaştırıldı. 3D kültür modelinde prostat kanseri hücrelerine FBA ve Kolşisin uygulanarak canlılık ve proliferasyon analizleri yapıldı. 48 saatlik FBA uygulamasının her iki kanser hücre hattında da migrasyonu Kolşisin'den daha fazla engellediği görüldü. Koloni formasyon analizlerinde 24 saatlik FBA uygulamasının formasyonu önlediği görüldü. Her iki kültür modelinde FBA uygulamasının proliferasyon parametrelerinde azalmaya sebep olduğu tespit edildi. FBA'nın oluşturduğu hücresel yanıt, MAPK yolağına ait üç temel kinaz proteinin immünofloresan intensite analizi ile incelendi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlendi. ERK ekspresyon oranı kültür modelleri, uygulama süreleri ve kemoterapötiklere göre farklılıklar gösterdi. 2D kültür modelinde 24 saat FBA uygulamasının PC3 ve LNCaP hücrelerinde JNK ekspresyon oranında azalmaya sebep olduğu görülürken, 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinde kemoterapötik uygulamalarının p38 ekspresyon oranında artışa sebep olduğu görüldü. Yarı ince kesitler incelendiğinde FBA'nın kanser hücrelerinde oluşturduğu morfolojik deformasyon etkisinin Kolşisin uygulanan hücrelere kıyasla daha belirgin olduğu görüldü. FBA'nın neden olduğu morfolojik bozukluklar ultrastrüktürel düzeyde ilk olarak bu çalışmada görüntülendi.

Anahtar Kelimeler: ERK, Fenilboronik asit, JNK, p38, sferoid

2. ABSTRACT

Investigation of the Effect of Phenylboronic Acid on Androgen-Dependent (LNCaP) and Androgen-Independent (PC3) Prostate Cancer Cells via MAP Kinases by 2D and 3D Culture Methods

Although prostate cancer is androgen-dependent, castration might result in regression of the disease. In our study PC3, LNCaP and RWPE-1 were used. In order to examine the effects of microtubule-targeted therapy in human prostate cancer, Phenylboronic acid (PBA), an essential compound found in nature in the form of boron, was selected as a chemotherapeutic. In order to compare the tubulin polymerization inhibition effect of PBA, Colchicine, which belongs to the same class, was included to the study as a positive control. Viability analyses were performed by treating PBA and Colchicine to all 3 cell lines in a 2D culture model. Colony formation analysis, proliferation analysis and migration analysis were performed on prostate cancer cells and the effects of chemotherapeutics were compared. Viability and proliferation analyses were performed by treating prostate cancer cells with PBA and Colchicine in a 3D culture model. In both cancer cell lines, 48 hours of PBA treatment inhibited migration to a greater extent in comparison to Colchicine. Colony formation analysis showed that the 24 hours PBA treatment prevented the formation of colonies. In addition, It was determined that PBA caused a decrease in proliferation parameters in both culture models. The cellular response induced by PBA was examined by immunofluorescence intensity analysis of three basic kinase proteins of the MAPK pathway where statistically significant differences were observed between the groups. There were differences in ERK expression depending on the culture methods, chemotherapeutics and treatment times. In the 2D culture model, 24 hours of PBA treatment caused a decrease in JNK expression in PC3 and LNCaP cells. Both of the chemotherapeutics treatment led to an increase in p38 expression in 3D culture model PC3 cells. On the semi-thin sections it was seen that the morphological deformation effect of PBA on cancer cells was more pronounced compared to Colchicine-treated samples. Morphological defects caused by PBA were first visualized in this study at the ultrastructural level.

Key Words: ERK, Phenylboronic acid, JNK, p38, spheroid,

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Amerikan Kanser Derneği'nin istatistiklerine bakıldığında yaşamı boyunca her 8 erkekten birinde prostat kanseri geliştiği görülmektedir (1). 2011-2017 yılları arasındaki verilerde, tedavinin hayatta kalım oranını hastalığın kemik ve akciğer metastazı yaptığı evre hariç (%30) yaklaşık %90 artırdığı görülmektedir. Bu sebeple tedavi süreci ve tedavi yöntemi büyük önem taşımaktadır.

Androjene bağımlı seyreden prostat kanserinde tedavi seçeneklerinden biri de kastrasyon yöntemleridir. Ancak kastrasyon sonrasında kastrasyona direnç gelişebilmekte ve hastalık androjenden bağımsız seyredebilmektedir (2). Dolayısıyla prostat kanseri kastrasyon bağımlı ve kastrasyon bağımsız olarak 2 fazda değerlendirilmektedir (3). Model organizmaların hastalık ile ilgili anatomik ve fizyolojik farklılıklar gibi dezavantajlarından dolayı insan kaynaklı hücre hatları ile yapılan çalışmalar literatürde geniş yer tutmaktadır (4). Hepsi insan kaynaklı olmak üzere LNCaP ve PC3 kanser hücre hatlarının yanısıra sağlıklı dokudaki etkileri gözlemek için RWPE-1 de çalışmamıza dahil edilmiştir (5-7).

Literatürde çoğunlukla yeterli sayıda örnek sayısı içermeyen klinik raporlar ve 2D kültür modeli üzerindeki incelemeler yer almaktadır (8-16). İlaç çalışmalarında kullanımı gittikçe artan 3D kültür modeli üzerinde yapılan çalışmalar *in vivo* sonuçlara daha yakın seyretilmektedir (17). Riedl ve arkadaşları kolon kanseri hücre hatlarıyla yaptıkları 2D ve 3D model çalışmalarında hücre büyüklüğü, ATP mekanizması ve AKT-mTOR sinyalizasyonu gibi birçok parametrede farklılıklar olduğunu ifade etmektedirler (18). Bir diğer dikkat çekici nokta ise *in vivo* ilaç direncinin 3D kültürde gözlenirken, 2D kültürde gözlenmemesidir (19-22). Aynı durum apoptoz yanıtı için de geçerlidir (23). Biz de çalışmamızda, FBA uygulamasına karşı oluşacak hücresel yanıtı 2D ve 3D modelleri karşılaştırarak incelemeyi hedefledik.

Çalışmamızda antimitotik terapötik olarak seçtiğimiz FBA, bir Borik asit türevidir. Günlük rutininizde tüketmekte olduğumuz bileşik doğada boron formundadır (24). İçme suyunda tespit edilen bir yerleşim bölgesinde prostat kanseri sıklığının azaldığı ifade edilmektedir (25). Birçok farklı kanser çalışmasında bor ailesinin antikarsinojen olarak iyimser sonuçlar verdiğine rastlanmaktadır (26-28). Çalışmamızda yer alan FBA hakkında ise literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Borik asit uygulanan androjen bağımlı hücre hattında prostat spesifik antijen seviyesinin azaldığı ve yapılan canlılık analizlerinde antikanser etkisi bulunduğu raporlanmaktadır (28). Bir başka çalışmada, farklı dozlarda Borik asit uygulanan LNCaP, DU-145 ve PC3 hücrelerinde proliferasyonun azaldığı belirtilmektedir (29). Literatürde, prostat kanserinin iki formunu ve sağlıklı dokuyu ifade eden üç hücre hattının (PC3, LNCaP, RWPE-1) bir arada değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Antiproliferatif terapötikler mikrotübül üzerindeki stabilize veya destabilize edici etkilerine göre sınıflandırılmaktadırlar. FBA'nın antikarsinojen etkisini sitoskeleti baskılayarak gösterdiği ifade edilmektedir (30). Tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilen FBA, mikrotübül destabilize edici bir kemoterapötiktir (31). Sitoskelet üzerindeki bu deformasyon immünofloresan işaretlemeler ile çalışmalarda gösterilmektedir (7, 32). Ultrastrüktürel bir veri henüz bulunmamaktadır. Çalışmamızda transmisyon elektron mikroskopik görüntüleme ile antiproliferatif etkiyi göstermeyi hedefledik.

Mikrotübül hasarına yol açan ilaçların MAPK sinyalizasyonu üzerinden apoptoz yanıtı oluşturduğu raporlanmaktadır (33). MAPK yolağı hücrenin sağkalım, proliferasyon ve apoptoz gibi metabolik faaliyetlerinde görev almaktadır. Mikrotübül dinamiğine etki eden birçok ilacın incelendiği bir çalışmada p38 MAPK proteininin sadece taxol uygulandığında arttığı, JNK aktivasyonunun indüklendiği ve ERK'in ise etkilenmediği raporlanmaktadır (34, 35). Borik asit uygulanan DU-145 hücre hattında antikanser etkinin Raf/MEK/ERK1/2 MAPK sinyal yolağı üzerinden görüldüğü ifade edilmektedir (36). FBA'nın antikanser etkisinin altında yatan moleküler mekanizma hakkında kısıtlı bilgiye erişilmektedir. Çalışmamızda, FBA'nın androjen bağımlı ve androjen bağımsız insan prostat kanser hücre hatlarına olası antikarsinojen etkilerinin *in vitro* (2D ve 3D) modeller kullanılarak test edilmesi ve etki mekanizmasının ERK, JNK ve p38 MAPK proteinleri üzerinden incelenmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamıza ait özgün değerler:

- FBA'nın insan prostat kanseri çalışmalarında uygulanacak doğru doz-etki süresinin 2D ve 3D kültür modellerinde karşılaştırılması,

- FBA'nın RWPE-1 üzerinde düşük toksisiteye sahip olduğunu ve kanser hedefli etkinlik gösterdiğini kantitatif olarak ortaya koyan ilk çalışma olması,
- İnsan prostat kanseri hücrelerindeki FBA kaynaklı morfolojik bozukluğun, transmisyon elektron mikroskobu ile ultrastrüktürel düzeyde ilk olarak gösterilmesi,
- LNCaP, PC3 ve RWPE-1 hücrelerinde FBA'nın oluşturduğu hücresel yanıtın ERK, JNK ve p38 üzerinden ilk kez incelenmesi ve antikarsinojen etkisinin altında yatan moleküler mekanizmayı anlamaya katkı sağlamasıdır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, Amerika'da 2010 yılından bu yana erkeklerde artan bir insidansa sahip olup kanserle ilişkili ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (37). Amerikan Kanser Derneği 2022 yılı içinde yaklaşık 268,490 yeni vaka ve yaklaşık 34,500 ölüm öngörmektedir (38). Prostatın malign transformasyonu intraepitelyal prostatik neoplazinin başlamasının ardından lokalize kanser yapılanması, lokal invazyonla ileri seviye adenokarsinom oluşumu ve metastatik prostat kanseri şeklinde bir yol izleyerek sonlanmaktadır (39). Hastalığın oluşumu ve seyirinde, steroid hormonların yanı sıra yaş, kalıtsal ve çevresel faktörlerin de rolü bulunmaktadır. Başta kemik olmak üzere karaciğer, böbrek ve lenf nodu gibi çevre dokulara metastaz yaptığı ve ağrıya sebep olduğu bilinmektedir (40).

Karsinogenezdeki epitelyal-mezenşimal transformasyon (EMT) sürecinde, FGF ve TGF sınıfı sinyalizasyonların rolü olduğu belirtilmektedir (41, 42). Stromal kısımdan gelen büyüme faktörü sinyalizasyonundaki artış, integral bir indüktör olarak değerlendirilmektedir (43, 44). Prostat hücreleri EMT sürecine girdiklerinde tümör hücreleri üzerinden bir sinyal sirkülasyonu oluşturarak metastatik sürece zemin hazırlamaktadır. Hücreler sinüzoid duvarı ve kemik iliği gibi fiziksel bariyerleri aşip endosteuma göç ederek kemik metastazını gerçekleştirmektedir (45).

Prostat bezinin embriyolojik gelişimi ve karsinojenik gelişimi arasındaki benzerliğin anlaşılabilmesi için embriyolojik gelişim ve epitelyal-mezenşimal hücre kombinasyonları hakkında çalışmalar bulunmaktadır (4). Karsinogenezin multifokal olması araştırmalarda karşılaşılan zorluklardan birisidir (46). Fare-sıçan ile insan arasında, hastalığın seyriyle ilgili anatomik ve fizyolojik farklılıklar bulunmaktadır. Hastalığın insandaki ve model organizmalardaki işleyen fizyolojik süreçlerinin birbirinden farklı olması ve hastalık modelinin yakın model organizmalardan olan sıçan ve farede oluşturulmasındaki zorluk, prostat kanseri hakkındaki çalışmalarda büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır (47). İnsan ve fare arasında farklılıklar olduğu kadar benzer yönler de bulunmaktadır. Transkriptom profillerine bakıldığında farelerin dorsolateral prostatı insanda prostat bezinin periferal zonuna karşılık gelmektedir (48). Oluşturulacak model ve terapötik yöntemler hastalığın belirli

fazlarını veya yanıtlarını ifade edebileceğinden dikkat gerektirmektedir. Bu sebeple araştırmaların yapıldığı prostat kanseri modelleri farklılık göstermektedir (49). Model organizmalar üzerinde transplant oluşturularak *in vivo* ve hücre hatlarında *in vitro* yapılan araştırmalar da mevcuttur (5, 50–55). Araştırmalarda model organizmalardan elde edilen transgenik hücrelerin yanı sıra insan kaynaklı hücre hatları hastalığın doğal yanıtına yakınlığı açısından daha çok tercih edilmektedir (4).

Normal ve tümörojenik prostat dokusunda androjen reseptörleri bulunmaktadır. Androjenlerin, büyüme ve farklılaşma gibi kritik metabolik etkilere sahip olması; prostat kanseri tedavisinde androjen yoksunluğu oluşturmayı çoğunlukla tercih edilen bir tedavi yöntemi haline getirmektedir (56). Hastalık androjene bağımlı olarak seyrederken, medikal veya cerrahi yol ile kastrasyon oluşturulduğunda, gerileme görülmektedir. Sıklıkla karşılaşılan bir diğer durum ise hastalığın kastrasyona direnerek androjenden bağımsız olarak ilerlemeye devam etmesidir (2). Bu durumda prostat kanseri, kastrasyon bağımlı ve kastrasyon bağımsız olmak üzere iki farklı şekilde değerlendirilmektedir (3).

Kastrasyon bağımlı ve bağımsız hücre hatları temel prostatik özellikler açısından karşılaştırıldığında androjen reseptörünün bulunup bulunmaması ve prostata özgü antijen üretimi gibi farklılıklar göstermektedirler. Bu sebeple kemoterapötiklere karşı oluşan hücresel yanıtlarda da farklılıklar ortaya çıkabilmektedir (57). PC3 hücreleri metastatik kapasitesinin çok yüksek olması, androjene duyarsız olması ve prostata özgü antijen üretmemesi ile karakterizedir. LNCaP hücreleri ise metastatik özelliklerinin daha az olması, androjen hassasiyeti bulunması ve prostata özgü antijeni üretebilmesi ile bilinmektedir (4). Metastatik açıdan incelenen çalışmalarda PC3'ün PTEN ve p53'ten yoksun iken, TGF α , EGFR ve transferin reseptörünü yüksek derecede eksprese ettiği, LNCaP hücrelerinde ise tam tersinin söz konusu olduğu ifade edilmektedir (58–62). Androjen reseptörü ve JNK proteini arasındaki ilişkinin LNCaP ve PC3 hücrelerinde incelendiği bir çalışmada androjenlerin JNK'yı bloklayarak hücreyi apoptoza götürdüğünden bahsedilmektedir (63). PC3 ve LNCaP ksenograflarının incelendiği çalışmada anjiyogenez davranışlarındaki farklılıklardan dolayı PC3 tümör yapısında nekrotik merkezi alan bulunurken, LNCaP hücrelerinde perfüzyonun daha iyi olduğu, tümör merkezinde kan lakünalarının bulunduğu gösterilmektedir (64). PC3 ve LNCaP hücrelerinin tüm genom sekanslamaları

karşılaştırıldığında farklılıklar olduğu raporlanmaktadır (65). PC3 ve LNCaP hücre hatlarında proliferasyon inhibisyonu için farklı dozlarda terapötik uygulanması gerektiği vurgulanmaktadır (7). Doğal bir kemoterapötik etkilerinin incelendiği bir çalışmada PC3 ve LNCaP hücrelerinde antikanser etkisini farklı dozlarda gösterdiği ve aynı doz uygulandığında ise LNCaP hücrelerinde migrasyonu daha fazla önlediği ifade edilmektedir (66). Tüm bu veriler göz önüne alındığında tek tip hücre hattıyla yapılan çalışmaların yetersiz kalacağı söylenebilmektedir.

4.2. Antikarsinojen Tedaviler

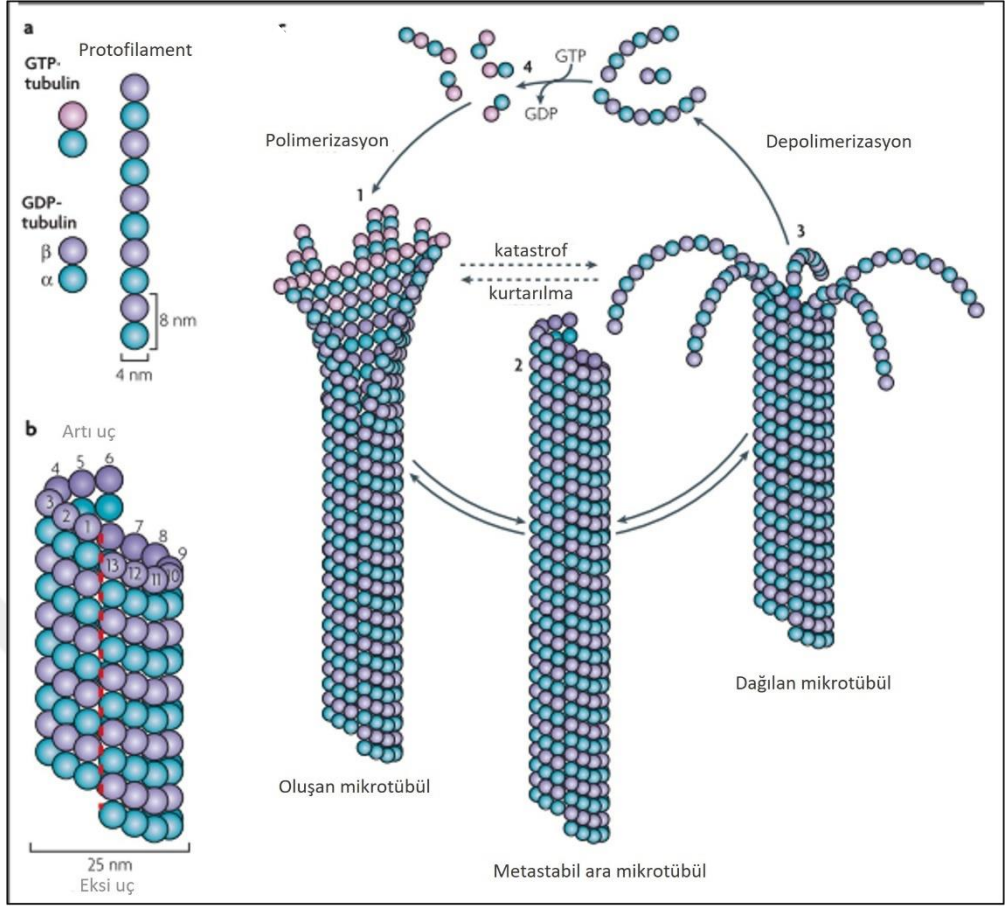
Prostat kanseri tedavi seçenekleri arasında kanserli dokunun tamamının alındığı operasyonlar, sadece tümör dokusu üzerine uygulanan radyasyon terapi, ısı ile kanser hücrelerinin yok edilmesi prensibine dayanan yüksek intensite odaklı ultrason terapi, androjenler üzerinde etki gösteren hormon terapi, immün sistemi tetikleyerek kanser hücrelerinin tanınması hedeflenen immunoterapi, immün kontrol noktası proteinlerinin işlevlerinin geri kazanımı ile uygulanan immün kontrol noktası protein inhibitörleri, angiogenez oluşumunu inhibe etme odaklı hedefli terapi ilaçları ve hücrelerin sitoskeletonini hedef alan kemoterapi gibi yöntemler bulunmaktadır (67). İleri prostat kanserinin erken döneminde kastrasyon tedavisi uygulandıktan sonra çoğunlukla gelişen kastrasyon direncinde taxane temelli kemoterapi ile tedavi sürdürülmektedir (68). Gelişen direnç ile hücrelerde Wnt, PDGF ve MAPK yolları dahil olmakla beraber pek çok sinyal mekanizmasında değişiklikler görülmektedir (69). Deneysel çalışmaların sayılarının artmasıyla klinik kullanıma alternatif katkı sunabilecek birçok farklı kemoterapötik hakkında literatür zenginleşmektedir. Çalışmalar metastazı önlemeye yönelik ve/veya tümör hücrelerini apoptoza indüklemeye yönünde yoğunlaşmaktadır (6, 63, 70–72). Bu çalışmalar arasında mikrotübül odaklı tedaviler de geniş yer tutmaktadır.

4.2.1. Mikrotübül odaklı tedaviler

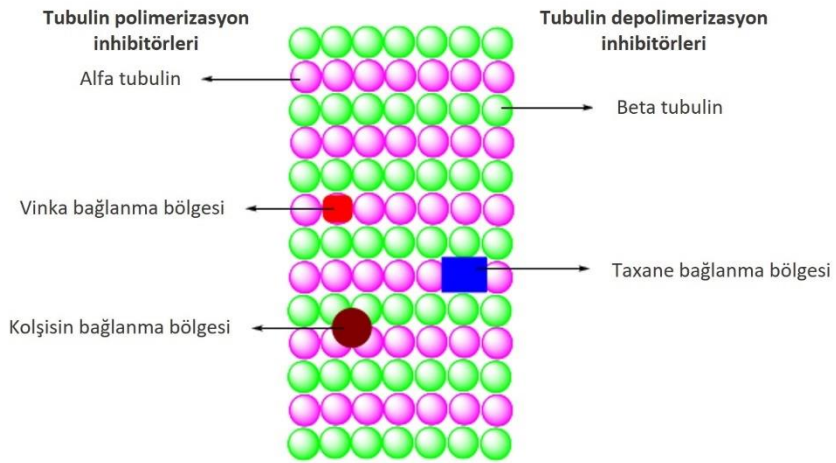
Sağlıklı hücrede olduğu gibi kanser hücresinde de sitoskeletonin önemli görevlerinden birisi proliferatif aktiviteye katılmaktır. Kanser hücresinde bölünmenin yönetilmesi ve önlenemez çoğalma davranışının temelinde mikrotübüller yer almaktadır. Kanser hücresi proliferasyonun devamında metastatik davranış gereği tümör

mikroçevresinden ayrılıp göç etmek için mikrotübülleri kullanmaktadır (73). Tümörden kopan hücreler metastatik tohumlar olarak farklı organlara yerleşmekte ve EMT sürecine girmektedir. Prostat kanserinin ilerlemesindeki basamaklarda mikrotübüllerin katkısı, kanser tedavileri için mikrotübülleri hedef haline getirmektedir (74).

Mikrotübül, sürekli oluşum ve yıkım sürecinde dinamik instabiliteye sahip olan bir yapıdır (75) (Şekil 4.1). Mikrotübül hedefli tedavi uygulamalarında mikrotübül dinamiğini bozan antimitotik (mikrotübül polimezrasyonunu veya depolimerizasyonunu inhibe edici) kemoterapötikler kullanılmaktadır (31). Bu terapötikler mikrotübül üzerindeki 3 bağlanma bölgesinden (Taxane, Vinka alkaloid veya Kolşisin) hangisine bağlandığına göre isimlendirilirler (Şekil 4.2). Polimerizasyon inhibisyonu, mikrotübülleri oluşturan α -tubulin ve β -tubulin heterodimerlerinin polimerizasyonunun engellenmesi ile gerçekleşmektedir (75). Depolimerizasyon inhibisyonu ise mikrotübülleri stabil halde kalmaya zorlama prensibine dayanmaktadır. Depolimerizasyon inhibisyonuna sebep olan kemoterapötikler, taxane bağlanma bölgesi grubunda bulunmaktadır (33). Polimerizasyon inhibisyonuna sebep olanlar ise vinka bağlanma bölgesi grubu ve Kolşisin bağlanma bölgesi grubu kemoterapötiklerdir (31) Antimitotik molekül maruziyeti, kanser hücrelerinde apoptotik ölüm, mitotik süreçten çıkış veya anöploidi (hücrede olması gerekenden fazla kromozom sayısı bulunması) gibi geri döndürülemez sonuçlar ortaya koymaktadır (76). Her iki etkideki kemoterapötiklerin değerlendirildiği bir derlemede ilaçların tek başına ve belki yüksek dozlarda kullanılması yerine sinerjistik etki oluşturacak kombine tedavilerin uygulanmasının ilaç dozlarını düşürebileceğini ve muhtemel toksisitenin önüne geçilebileceğini ifade etmektedir (74). Bu yönde deneysel ve klinik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.



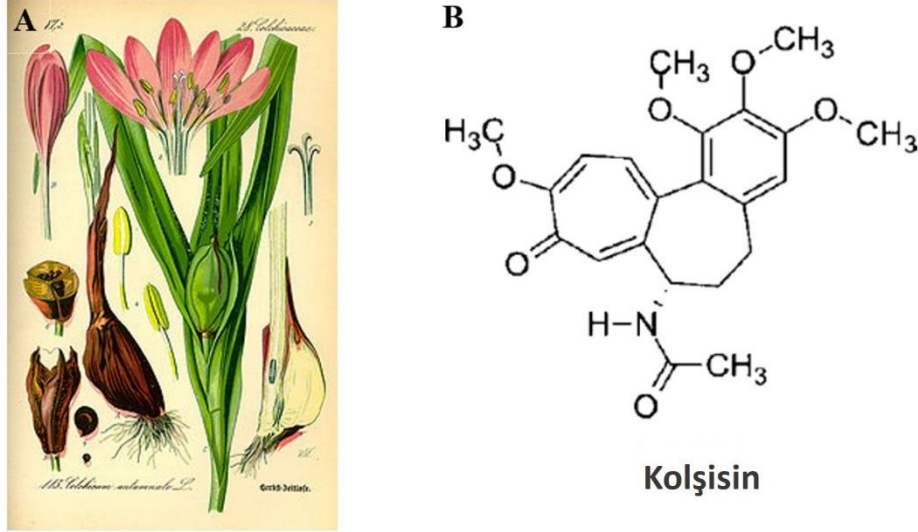
Şekil 4.1 Mikrotübülün dinamik instabilitesi (77)



Şekil 4.2 Mikrotübül hedefli kemoterapötiklerin bağlanma bölgeleri (78)

4.2.1.1. Kolşisin ($C_{22}H_{25}NO_6$)

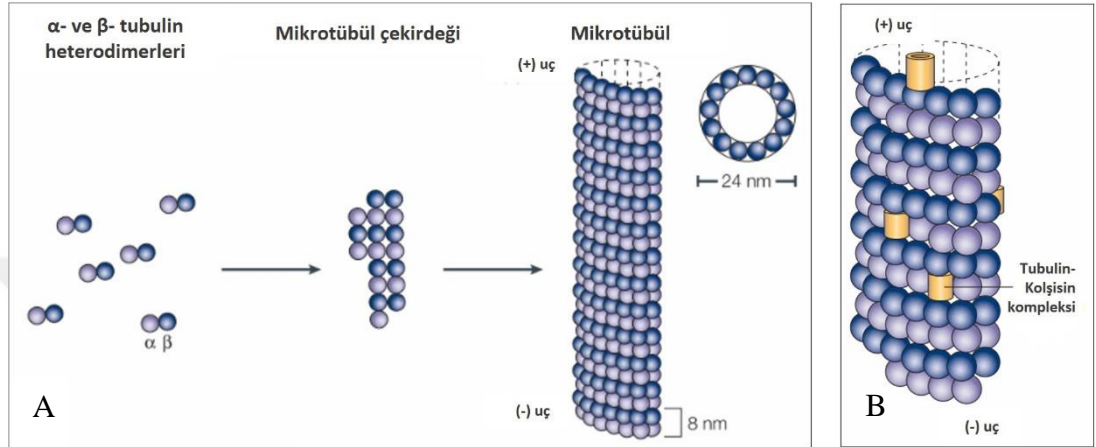
Tubulinin, Kolşisin'in tubuline duyduğu yüksek afiniteden faydalanılarak keşfedildiği ve bu sebeple ilk olarak 'Kolşisin'e bağlanan protein' olarak adlandırıldığı ifade edilmektedir (79, 80) Kolşisin, ilk olarak zehirli safran bitkisi *Colchicum autumnale*'den elde edilmiştir (Şekil 4.3). Klinikte kullanılan ilk antimitotik ilaçlardan biri olarak literatürde yer almaktadır (81). Amerikan Besin ve İlaç Kuruluşu (FDA/USFDA, Food and Drug Administration) onaylı olarak, gut ve Akdeniz Ateşi gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (82).



Şekil 4.3 Kolşisin'in üretildiği ve acı çiğdem olarak bilinen (A) *Colchicum autumnale* bitkisi ve (B) karakteristik üçlü heksamerik yapısı (75, 83)

Kolşisin, tubulin heterodimerlerinin intradimerik α - β arayüzüne tutunarak α -tubulinin GTP bağlanma bölgesine doğru devam eden bir bağlanma yüzüne sahiptir (58, 84). Polimerize olmamış tubulin alt ünitelerine önce yarı kararlı ve geri dönüştürülebilir şekilde bağlanmakta, sonrasında kararlı ve tubulin dimerinde konformasyonel değişikliğe yol açan, yüksek enerjiye sahip tubulin-Kolşisin kompleksini oluşturmaktadır (75) (Şekil 4.4). Bu mekanizma mikrotübül büyürken

serbest tubulinlerle birlikte tubulin-Kolşisin komplekslerinin de mikrotübüle eklenmesi ile devam etmekte ve depolimerizasyon aşamasında tubulinlerin ayrılmayarak bir arada kalmasına sebep olmaktadır (85–87). Mikrotübül dinamiğinin stabilizasyonu hücre siklusu blokajı ve devamında apoptoz ile sonuçlanmaktadır (74).

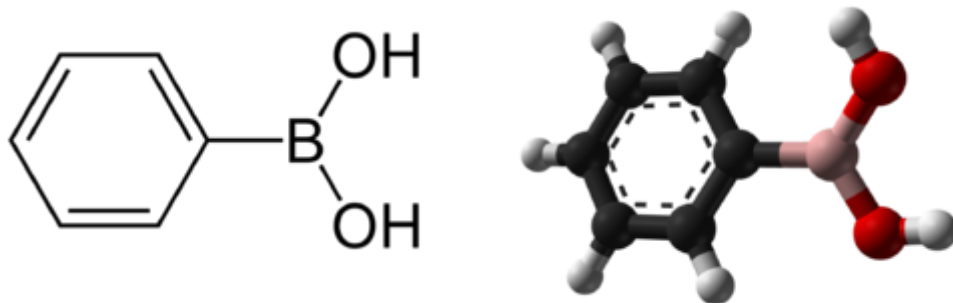


Şekil 4.4 (A) Mikrotübül oluşumu ve (B) Kolşisin bağlanma bölgesi (74)

4.2.1.2. Fenilboronik asit ($C_6H_7BO_2$)

Çalışmamıza antimitotik terapötik olarak seçtiğimiz FBA bir Borik asit türevidir (Şekil 4.5). Doğada boron formunda bulunan Borik asit, günlük tüketimle vücudumuza aldığımız esansiyel bir bileşiktir (24). Kozmetik, takviye gıda üretimi, sterilizasyon çalışmaları ve cam üretimi gibi pek çok alanda kullanıldığını bildiğimiz bor ve türevlerinin tedavi edici yönlerinin olup olmadığı araştırmalara konu olmaktadır (88). 2007 yılında yapılan çalışmada, içme suyunda bulunduğu tespit edilen bir yerleşim bölgesinde prostat kanseri sıklığının ve ölüm oranlarının azaldığı raporlanmaktadır (25). Bor ve türevlerinin direkt veya nano partiküllere yüklenmesiyle farklı kanser hücre hatlarında olumlu sonuçlar ortaya koyduğu belirtilmektedir (26–28). FBA ise kemoterapötik ajan olarak literatürde henüz yer almaya başlamaktadır. 2D kültür yöntemi ile çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, FBA'nın aktin sitoskeletonunu baskılayarak migrasyonu durdurduğunu ifade edilmektedir (30).

Prostat kanseri özelinde baktığımızda ise Borik asitin LNCaP hücreleri üzerindeki antikanser etkisi, uygulamadan sonra hücrelerde azalan prostat spesifik antijen miktarı ile gösterilmektedir (28). Androjen negatif prostat kanseri hücre hatları ve androjen pozitif prostat kanseri hücre hattının canlılık analizlerinin karşılaştırıldığı 2004 yılında yapılan bir çalışmada Borik asitin antikanser etkisi raporlanmaktadır (28). DU-145 hücre hattına uygulanan FBA etkisinin incelendiği bir çalışmada hücre siklusu analiz edilerek proliferasyonu önlediği ifade edilmektedir (29). Çalışmalar FBA'nın sağlıklı prostat hücre hattı üzerinde bir etkisi olmadığını ifade ederken, doza bağlı olası toksisitenin göz önünde bulundurulması gerektiğini vurgulamaktadırlar (29, 89). Literatürde PC3, LNCaP ve RWPE-1 hücre hatlarının beraber değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmalarda Borik asitin uygulama doz ve süreleri ile ilgili farklı bilgilere rastlanmaktadır. 1 mM konsantrasyonda 24 saat süre ile DU-145 ve PC3 hücrelerine uygulanan Borik asitin sırasıyla %98 ve %77 canlılık oranından bahsedilirken, bir diğer çalışmada %52 ve %100 şeklinde verilen farklı canlılık oranlarının karmaşaya sebep olduğu söylenebilmektedir (89, 90). Barranco ve Echert'in yaptığı çalışmada Borik asitin oluşturduğu birincil hücresel yanıtın apoptoz olmayabileceği vurgulanmıştır (36). İnsan prostat ve meme kanseri hücreleri üzerinde 1 mM konsantrasyonda FBA'nın etkileri incelenirken 1 ve 8 günlük kültür süreleri karşılaştırılmakta ve 1 günlük uygulamada bir etki görülmediği ifade edilmektedir (89). Bu bilgiden yola çıkarak çalışmamıza 24 saate ek olarak 48 saatlik uygulama süresi ekledik ve etkilerini gözlemledik.



Şekil 4.5 FBA'nın kimyasal yapısı (91)

FBA hakkındaki çalışmalara baktığımızda kemoterapötik etkisini antiproliferatif yönde ortaya koyduğu ifade edilmektedir (27). Bu özellikteki diğer kemoterapotikler mikrotübül stabilize ve destabilize edici ajanlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. FBA tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği için mikrotübül destabilize edici sınıfa dahil edilmektedir (31). Her iki gruptaki kemoterapötik ajanların hücre iskeletinde oluşturdukları hasar immünofloresan görüntüler ile literatürde yer almaktadır (7, 32). Fakat FBA'nın antiproliferatif etkisinin oluşturduğu morfolojik değişikliği gösteren bir mikrograf bulunmamaktadır.

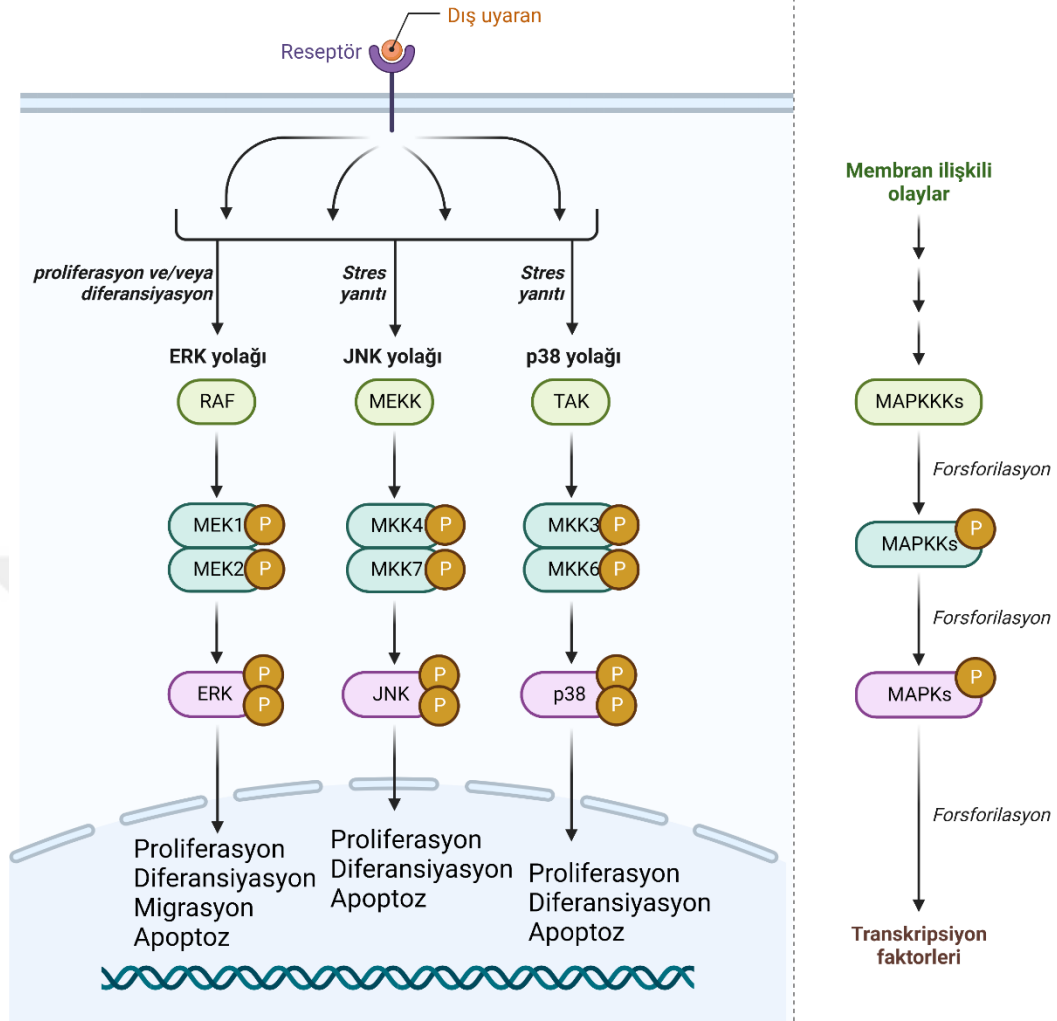
4.3. 2D ve 3D Hücre Kültürü Modelleri Karşılaştırılması

Mevcut antikanser çalışmalarının çoğunun 2D kültür modeli ile gerçekleştirildiği veya istatistiksel anlamlılığa erişemeyecek sayıda örnek içeren klinik raporlar olduğu dikkat çekmektedir (8–16). Bu dezavantajı ortadan kaldırmak adına yeni modeller geliştirilmektedir. 2D kültür modeline alternatif olarak, hücrelerin *in vivo*'ya daha benzer fizyolojik özellikler gösterebileceği 3D kültür modelleri geliştirilmektedir. Çoğu kanser araştırmalarının yapıldığı 2D kültür modelinde hücrelerin lateral bağlantılar hariç birbirleri ile bağlantı kuramadıkları bilinmektedir (92). 2D kültür modelinde büyütülen hücrelerde dokuya özgü özelliklerin kaybı görülmektedir (13, 93, 94). 2D kültür modeli ile karşılaştırıldığında, 3D kültür modelleri (sferoidler) yapısal ve fonksiyonel özellikler açısından gerçek dokulara daha çok benzemektedirler (17). Önemli hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerini hesaba katan 3D kültür modeli, hücrelerin morfoloji, diferansiyasyon, polarite, proliferasyon hızı, hücre heterojenite ve besin erişimi de dahil olmak üzere dokularda bulunan birçok kritik özelliği kopyalamasına ortam sağlamaktadır (95–98). Hepatosit sferoidlerinin 2D kültür modeline kıyasla daha yüksek hücre canlılığı, fenotip farklılıkları ve detoksifikasyon kapasitesinin bulunması gibi avantajlara sahip olduğu raporlanmaktadır (99). Riedl ve arkadaşları kolon kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarında 2D ve 3D model arasında fenotipik farklılıklar, sferoidlerde hücre siklusu progresyonunda azalma ve AKT–mTOR ve MAPK sinyalizasyonunda değişiklikler gibi birçok parametrede farklılıklar olduğunu ifade etmektedirler (18). İki modelin karşılaştırıldığı bir derlemede 2D kültür modelinde bölünme aşırı hızlı iken 3D'de daha gerçekçi seviyede olduğu, ekspresyon seviyelerinin 2D kültür modelinde

klonikteki sonuçlarından çok farklı iken 3D kültür modelinde kabul edilebilir bir fark aralığında olduğu ifade edilmektedir (100). Birçok alışmada 2D kültür modelinde hücrelerin uygulanan ilaca karşı direnç geliştirmediği ve ilacın hücreler tarafından iyi metabolize edilmediği, 3D kültür modelinde ise hücrelerin ilaca direnç geliştirdiği ve uygulanan ilacın daha iyi metabolize edildiği belirtilmektedir (19–22). Apoptoz açısından kıyaslandığında ise 2D kültür modelinde hücrelerin kolaylıkla indüklendiği, 3D kültür modelinde ise hücrelerin *in vivo*'da olduğu gibi ilaca bağımlı apoptoza direnç geliştirdiği raporlanmaktadır (23). Fontana ve ark. PC3 ve DU-145 hücre hatlarında 2D ve 3D kültür modelinde epitelyal mezenşimal dnşimde rol alan proteinleri inceleyerek 3D kültür modelinde ekspresyonun arttığını, hücresel bağlantıların oluştuğunu ifade etmektedirler (101).  prostat kanseri hücre hattını da kullanarak yapılan bir araştırmada 2D kültür modeline kıyasla 3D kültür modelinde *in vivo*'ya benzer sonuçlar elde edildiği, ilaca direncin arttığı, proliferasyon hızının azaldığı ve gen ekspresyon profilinde azalmalar olduğu belirtilmektedir (102). Kanser araştırmalarında 3D kanser modelleri, ilaçların fizyolojik tepkilerini taklit etmek için prelinik sistemler olarak kullanılabilir (103, 104). Canlı bir dokunun karmaşık ortamını gerçekçi modellemesi nedeniyle, 3D hücre kültürü modelleri memeli organogenezini ve kanserogenezini anlamamızı hızlandırmış olup, ilaç testi ve kişiselleştirilmiş tıpta daha gelişmiş yaklaşımlara yol açmaktadırlar (105).

4.4. Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı

MAPK yolağı hücrenin sağkalımı, proliferasyonu ve apoptozu gibi birçok metabolik faaliyette görev almaktadır (106). Aktive olan kinaz proteinin adı ile anılan 3 ayrı MAPK yolağı 'da şematize edilmektedir (107). Bu yolakta yer alan  kinaz; JNK1/2/3, ERK1/2 ve p38'dir (108). Stres aktive proteinler JNK ve p38'in apoptoz ve inflamasyonda önemli rolü olduğu bilinmektedir (109, 110). Hücrenin yaşamsallığında görev alan ERK ise proliferasyon ve diferansiyasyonda rol oynamaktadır (106, 111). MAPK yolakları, bir terminal kinazı (MAPK/MAP kinaz) aktive eden MAPK kinaz (MAPKK) ve onu aktive eden MAPKK kinaz (MAPKKK) içermektedir. ERK, JNK ve p38 MAP kinazlar bu sistemin terminal kinazları olarak gen ekspresyonunu düzenlemede rol almaktadırlar (112).



Şekil 4.6 MAPK sinyal yoluğu (Bu şekil BioRender.com programındaki “Three Major MAP Kinase Pathways_ ERK, JNK, p38” taslağının düzenlenmesi ile oluşturuldu)

4.4.1. Kanserde MAPK

ERK sinyal yoluğu, insan kanserlerinin en az üçte birinde hasara uğradığından en çok çalışılan MAPK yoluğudur (113). ERK sinyalizasyonu hücre proliferasyonu ile eş anlamlı ifade edilirken, yolaktaki bozulmaların tümör fenotipinin diğer birçok yönü ile bağlantılı olduğu ifade edilmektedir (114). ERK yoluğında Raf tarafından fosforillenenek aktiflenen MEK1/2, ERK1/2’yi fosforilleyerek aktive etmektedir (106). Raf ise reseptör tirozin kinazın aktiflediği Ras tarafından aktivasyon kazanır. Birçok kanser ilişkili lezyonda ERK sinyal yoluğının bu basamakları incelenmiş ve

reseptör tirozin kinaz mutasyonu, reseptör tirozin kinazın fazla ekspresyonu, aktifleyici ligandların otokrin veya parakrin yollarla üretimi gibi yönelimlerden bahsedilmektedir (114). Diğer yandan erken büyüme sinyalleri ile ilişkili başka extraselüler reseptörlerin amplifikasyonu veya bozuklukları Ras sinyalizasyonunu aktifleyebilmektedir (115). Aktive olan ERK, transkripsiyon faktörleri, kinazlar, fosfatazlar ve sitoskelet proteinleri gibi birçok nüklear ve sitoplazmik yapıyı fosforile edebilmektedir (116). ERK sinyalizasyonunun, hücre tipine bağlı olmakla birlikte hayatta kalım, proliferasyon, migrasyon, diferansiyasyon, kromatin modellemesi ve anjiogenez gibi birçok mekanizmayı düzenlediği bilinmektedir (117). Murphy ve Blenis, ERK proteininin birbirinden bu kadar farklı rolleri nasıl gerçekleştirebildiği sorusunu, proteinin hücre içindeki lokalizasyonu ve gücünün değişkenliği ile ilişkili olabileceği şeklinde cevaplamıştır (118). Düzenli ERK sinyalizasyonu, hücre siklusuna girmeyi sağlayan siklin D1 birikimini yönetmesinin yanı sıra, proliferasyon inhibitör genlerini de baskılamaktadır (119). Diğer yandan yüksek miktarda ERK sinyalizasyonu ise CDK inhibitörü p21 proteininin ekspresyonunu indükleyerek, hücre siklusu arrestine sebep olabildiği çalışmalarda ifade edilmektedir (120, 121).

Bazı kanser hücrelerinin, proliferasyona devam edebilmek için, Akt ve Rho sinyalizasyonları gibi bu indüksiyonu etkisiz hale getirecek başka iletişimler kullandığı ifade edilmektedir (122, 123).

JNK sitokinler, büyüme faktörleri yoksunluğu, bazı G-kapılı reseptörler gibi uyaranlar tarafından aktiflenebilmektedir (124). Apoptozu indüklemesinden dolayı tümör baskılayıcı fonksiyonunun bulunduğu ifade edilmektedir (125). Ras gibi onkogenler tümöröjenizasyon boyunca JNK indükleyici apoptozu baskılamak için devamlı NF- κ B aktivasyonunu indükleyici rolü olduğu belirtilmektedir (126). Kanserde NF- κ B ve JNK sinyalizasyonu birbirlerine zıt etki göstermektedir (127, 128).

Memelilerde p38 izoformları çevresel stres ve inflamatuvar sitokinler ile aktiflenmektedir (129). Hipoksi, X ray, oksidatif stres, UV maruziyeti ve sitokinler gibi çeşitli stres faktörleri tarafından indüklenen MAPKKK tarafından aktiflenen MEK-3 ve MEK-6, p38'i fosforillemektedir. Bazı durumlarda p38, JNK aktivatörü olarak bilinen MEK-4 tarafından aktiflenebilmektedir. Aktiflendiğinde p38 sitozolden, birçok substratına ait serin/treonin rezidüleri bulunan nukleusa doğru translokasyona uğrayabilmektedir (114). Büyüme faktörleri ve hormonlar gibi birçok extraselüler

stimülasyon, farklı MAPKKK'ları aktifleyerek bu yolağı çalıştırmaktadır. Ayrıca p53 ile indüklenmiş apoptoza ve p53 aktivasyonuna katılmaktadır (129–131). Hücre siklusu progresyonunda da negatif regülatör rolü olduğu bilinmektedir (132, 133). Hepatosellüler karsinom ile yapılan bir çalışmada p38 aktivitesinin normal dokuya göre azaldığı ve tümör büyüklüğü ile ters ilişkili olduğu raporlanmaktadır (134).

Mikrotübül dinamiğini bozan ilaçların etkilerinin araştırıldığı meme kanseri ve epidermal karsinom üzerine yapılan çalışmalarda JNK aktivasyonunun indüklendiği, ERK'in etkilenmediği, p38'in ise sadece meme kanseri hücre hattına taxol uygulandığında arttığı ifade edilmektedir (34, 35). 2016 yılında yazılan bir derlemede mikrotübül dinamiğini bozan ilaçların MAPK sinyalizasyonunu regüle ederek tümörojenik hücreyi apoptoza götürdüğü ifade edilmektedir (33). Antimitotik kemoterapötiklerin etki mekanizmalarının çözülmesiyle MAPK gibi major yolları hedef alan terapiler geliştirilerek kanser odaklı, dirençle karşılaşılmayan, düşük toksisite ve düşük terapötik maruziyetli yöntemlerin üretilmesi, yapılan çalışmaların klinikteki yansımalarını ifade etmektedir.

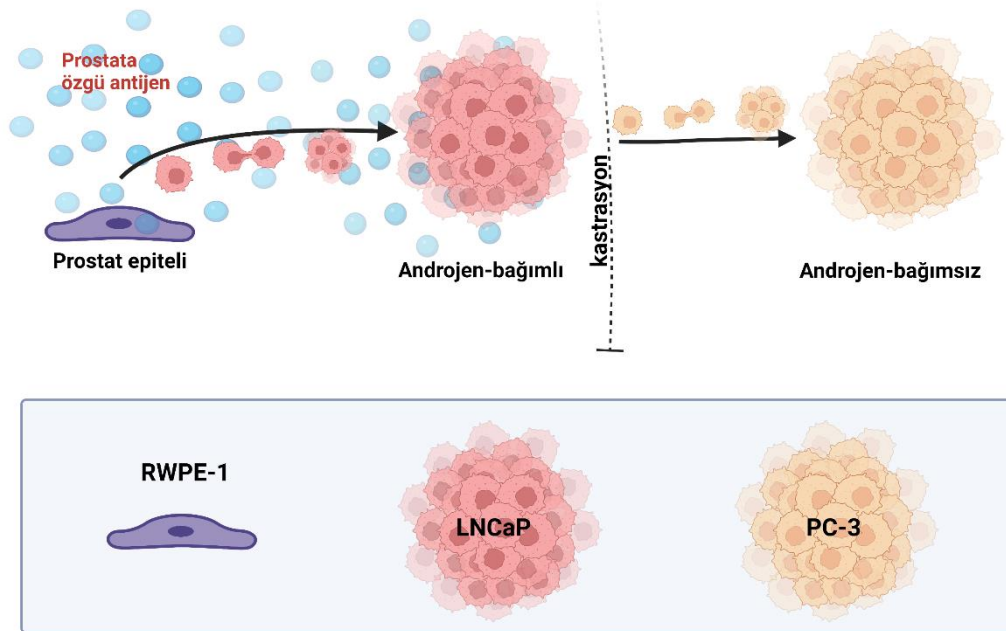
5. MATERYAL VE METOD

5.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan 3 farklı hücre hattının (Şekil 5.1) ilki PC3'tür. PC3; prostat kanserinde dördüncü seviyede olan 62 yaşındaki bir insanın, hastalığın primer metastaz bölgesi olan, kemik dokusundan elde edilmiş androjen bağımsız hücre hattıdır. İstanbul Medipol Üniversitesi REMER araştırma bünyesinden temin edildi.

İkinci hücre hattı LNCaP; 50 yaşında prostat kanseri bir insanın sol supraklavikular lenf nodu metastaz bölgesinden elde edilmiş androjen bağımlı hücre hattıdır. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dekanı ve Moleküler Kanser Uygulama ve Araştırma Merkezi (İSÜMKAM) direktörü olan Prof. Dr. Engin Ulukaya tarafından bağışlandı.

Üçüncü hücre hattı RWPE-1; 50 yaşındaki sağlıklı bir insanın prostat dokusundan elde edilmiş epitelyal hücre hattıdır. İstanbul Medipol Üniversitesi REMER araştırma bünyesinde görev yapan Dr. Yasemin Yozgat tarafından paylaşıldı.



Şekil 5.1 Çalışmada kullanılan hücre hatları (Bu şekil BioRender.com programında oluşturuldu)

Hücre hatları -80°C 'de saklanmaktadır. Kanser hücre hatları %10 FBS, %1 antibiyotik-antimikotik içeren L-glutaminli RPMI besiyerine açıldı. RWPE-1 antibiyotik-antimikotik içermeyen keratinosit besiyerine açıldı. Dondurulmuş hücreler uygun besiyerleri üzerlerine eklenerek yavaş yavaş çözdürüldü. Karışım, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet 5 mL uygun besiyeri ile karıştırılarak T25 flasklara ekildi. Flasklar, %5 CO_2 ve %20 O_2 gazları içeren 37°C 'lik inkübatöre kaldırıldı.

Çalışmada yer alan gruplar kullanılan hücre hatlarının isimleri, kemoterapötiklerin isimleri ve uygulama sürelerine göre kodlandı, 2D ve 3D kültür modelleri aynı kısaltmalar ile ifade edildi (Tablo 5.1).

5.1.1. 2D hücre kültürü modeli

PC3 ve LNCaP hücre hatları %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş RPMI besiyerinde, RWPE-1 ise antibiyotik-antimikotik olmadan Keratinosit-SFM besiyerinde büyütüldü. Hücreler zeminden kaldırılmadan önce Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı. Büyüdükleri flaskın zemininin yaklaşık %80-90'ını kaplayan hücreler, 500 μL tripsin eklenerek 37°C 'lik inkübatörde, PC3 hücreleri 5 dakika ve LNCaP hücreleri 3 dakika bekletildi. 5 mL uygun besiyeri ile süspansiyon oluşturularak santrifüj tüplerine alındı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra taze besiyeri ile karıştırıldı. Bu süspanse hücre karışımından alınan 10 μL 'lik örnek hemasitometre Neubauer-improved lamında sayıldıktan sonra, belirlenen hücre miktarı ve hacmi hesaplandı. Uygulanacak deney planına göre hücre sayımı ve ekimi yapıldıktan sonra gerekli ise hücreler tekrar pasajlandı.

Canlılık deneylerinin ardından belirlenen FBA ve Kolşisin dozları, hücrelerin bir gün yüzeye yapışması beklendikten sonra uygulandı. Takip eden 24 ve 48 saatlerin sonunda örnekler toplandı ve planlanan deneylere alındı.

5.1.2. 3D hücre kültürü modeli

3D kültür modeli için gereken yapışkan olmayan yüzey agaroz jel ile oluşturuldu. Distile su içinde hazırlanan %3'lük agaroz (çok amaçlı kullanıma uygun

tip1a) çözeltisi öncelikle mikrodalga fırında baloncuk oluşturmamaya dikkat ederek eritildi. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra 60 °C'lik ısıtıcı tabla üzerinde tutularak donması engellendi. Hızlıca, 96 kuyulu petrinin her bir kuyusuna yaklaşık iki damla (50-100 µL) agaroz jel çözeltisi damlatılarak hareketsiz bir şekilde bekletildi. Böylece kuyunun dibinde 'U' formunda bir çukur elde edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen petriyer, +4 °C'de 15 dakika bekletildikten sonra steril hücre kültürü kabiniinde 30 dakika UV ışığa maruz bırakılarak steril edildi.

-80 °C'de stoklanmış 1.000.000 adet hücreye sahip stoklar, çözdürülüp ekildikten bir pasaj sonra 3D protokolüne alındılar. 2D modelde büyütülen hücreler, pasajlama protokolünde olduğu gibi tripsin uygulanarak zeminden kaldırıldı. Uygun medya ile petriyerin zemini yıkanarak elde edilen hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılarak taze medya ile karıştırıldı.

Literatürdeki bilgiler ışığında kümeleşme süreci 5. günde sferoid çapları 350-400 µm aralığında olacak şekilde optimize edildi (135, 136). Deneylere alınacak örneklerin çap ölçümleri yapılarak bu aralık dışındaki örnekler deney dışı bırakıldı. Örnek alınarak sayım yapıldıktan sonra PC3 hücreleri 200 µL hacimde 10000 hücre, LNCaP hücreleri ise 200 µL hacimde 50000 hücre olacak şekilde hesaplanarak uygun hacimlerde agaroz jel kaplı 96 kuyucuklu petriye ekim yapıldı. LNCaP hücrelerinin metabolik hızlarının yavaşlığından dolayı, kümeleşme süreci santrifüj ile desteklendi. Ekilen LNCaP hücreleri 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek, agar çukurunda birbirlerini bulmaları kolaylaştırıldı (137). Sferoidler toplam 200 µL medya içinde gün aşırı yarı yarıya medya değiştirilerek büyütüldü. Optimal çapa (375-380 µm) ulaşan sferoidler 5. kültür gününde deneylere alındı. RWPE-1 hücrelerinin metabolik hızlarının yavaş olmasından ve kanser hücresi gibi agresif metabolik aktiviteye sahip olmadıklarından dolayı hücre popülasyonu az sayıda olmakla beraber 2D kültürde en fazla iki pasaja kadar çoğaltılabildi. Hücrelerin büyüme hızlarının yavaş olmasından dolayı sferoid oluşturma becerileri kanser hücre hatlarına kıyasla daha zayıf olduğundan sferoid optimizasyonu doğrultusunda yeterli çapa ulaşamadıkları için 3D kültüre dahil edilemedi.

5.1.3. FBA uygulaması

Toz formda satın alınan FBA (P20009, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) RPMI besiyerinde çözdürülerek uygulandı. Kütle-molarite hesabı yapılarak belirlenen miktarda tartılan toz kimyasal, RPMI medya ile karıştırıldıktan sonra 37 °C'lik sonikatörde 10 dakika bekletildi. Yapılan deneylerde Bradke ve arkadaşlarının uyguladığı konsantrasyonlar hücre ölümüne sebep olmadığından konsantrasyonlar revize edilerek yükseltildi (89). Belirlenen dozlar (1 mM- 20 mM) 24 ve 48 saatlik süre ile uygulandı.

Canlılık testi sonuçları doğrultusunda, çalışmanın devamında sadece hesaplanan IC₅₀ değerindeki dozlar her uygulama öncesi taze olarak hazırlanıp 24 ve 48 saatlik süre ile uygulandı.

5.1.4. Kolşisin uygulaması

Tubulin polimerizasyonunu inhibe ettiği bilinen Kolşisin, FBA'nın pozitif kontrolü olarak çalışmada yer aldı. Toz formda satın alınan Kolşisin (C9754, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) DMSO içinde çözdürüldü. Işığa hassas olmasından dolayı kimyasalın kendisi ve DMSO içinde hazırlanan yüksek konsantrasyondaki stok, karanlıkta ve oda sıcaklığında saklandı. Hücrelere uygulanabilirliğinin mümkün olması açısından, DMSO'lu stok 1: 1000 oranında uygun medya ile seyreltilerek belirlenen dozlar (0.05 µM-0.5 µM) hazırlandı. DMSO'nun olası toksisitesi göz önünde bulundurularak sadece %0,1'lik DMSO uygulanan hücrelere de canlılık analizi yapıldı. Toksikiteye rastlanmadığından stok çözelti bu şekilde hazırlanarak uygulandı.

Terapötikler, terapötikletin uygulanma süreleri ve hücre gruplarına göre isimlendirilen deney grupları tabloda listelenmiştir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1 Deney gruplarının kısaltmaları ve açıklamaları

2D	3D
<ul style="list-style-type: none">○ L2F: LNCaP 24 saat FBA○ L4F: LNCaP 48 saat FBA○ L2K: LNCaP 24 saat Kolşisin○ L4K: LNCaP 48 saat Kolşisin○ LK: LNCaP Kontrol (Uygulama yapılmamış)<ul style="list-style-type: none">• LK2: LNCaP 24 saatlik Kontrol• LK4: LNCaP 48 saatlik Kontrol <ul style="list-style-type: none">□ P2F: PC3 24 saat FBA□ P4F: PC3 48 saat FBA□ P2K: PC3 24 saat Kolşisin□ P4K: PC3 48 saat Kolşisin□ PK: PC3 Kontrol (Uygulama yapılmamış)<ul style="list-style-type: none">• PK2: PC3 24 saatlik Kontrol• PK4: PC3 48 saatlik Kontrol <ul style="list-style-type: none">□ R2F: RWPE-1 24 saat FBA□ R4F: RWPE-1 48 saat FBA□ R2K: RWPE-1 24 saat Kolşisin□ R4K: RWPE-1 48 saat Kolşisin	<ul style="list-style-type: none">○ L2F: LNCaP 24 saat FBA○ L4F: LNCaP 48 saat FBA○ L2K: LNCaP 24 saat Kolşisin○ L1K: LNCaP 12 saat Kolşisin○ LK: LNCaP Kontrol (Uygulama yapılmamış)<ul style="list-style-type: none">• LK2: LNCaP 24 saatlik Kontrol• LK4: LNCaP 48 saatlik Kontrol <ul style="list-style-type: none">□ P2F: PC3 24 saat FBA□ P4F: PC3 48 saat FBA□ P2K: PC3 24 saat Kolşisin□ P1K: PC3 12 saat Kolşisin□ PK: PC3 Kontrol (Uygulama yapılmamış)<ul style="list-style-type: none">• PK2: PC3 24 saatlik Kontrol• PK4: PC3 48 saatlik Kontrol

5.2. Canlılık Analizleri

Terapötiklerin toplam hücre popülasyonunun yarısını öldürdüğü doz, terapötik maddenin IC₅₀ değeri olarak bilinmektedir (138). Kolşisin ve FBA tüm hücre hatlarına uygulanarak, her hücre hattına ve maruziyet süresine özgü bir IC₅₀ değeri belirlendi. Bu değerlerin belirlenebilmesi için 2D kültürlerde MTT, 3D kültürlerde CellTiter-GLO 3D canlılık analizleri yapıldı.

5.2.1. MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) canlılık analizi]

MTT analizi 2D kültür modelinde, hücrelerin metabolik canlılığının kolorimetrik olarak ölçüldüğü bir yöntemdir (139). Canlı hücrelerde bulunan

mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi MTT bileşimini, çözünemez formdaki formazan kristallerine indirgemektedir. Böylece canlılığı yüksek olan hücreler mor renk almaktadır. Formazan kristallerinin ölçülebilmesi için analizin sonunda saf DMSO uygulanarak kristaller çözdürülür. Ölçümün normalize edilebilmesi için saf DMSO negatif kontrol olarak kullanılmaktadır. Örneklerin optik densitesi mikro petri okuyucuda kolorimetrik ölçüm ile absorbans değeri olarak kaydedilmektedir.

Her üç hücre hattından 10.000'er hücre 96 kuyucuklu petriye ekildikten sonra petriye yapışmaları için bir gece bekletildi. Sonraki gün FBA ve Kolşisin tedavisi 24 ve 48 saatlik süre ile belirlenen doz aralıklarında uygulandı. Uygulamanın ardından mevcut medya kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Hazırlanan MTT: medya (1: 20) solüsyonu, 96 kuyucuklu petrilere 200 µL hacimde eklenerek 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandığında MTT solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Canlı hücrelerde oluşan formazan kristallerini çözdürmek için kuyucuklara saf DMSO eklenerek orbital karıştırıcıda 10 rpm'de 1 saat bekletildi. Mikropetri okuyucu ile 570 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Deney setindeki her doz 6 tekrarlı çalışıldı, her deney 3 defa tekrarlandı. Sonuçlar istatistiksel olarak Graphpad Prism programında analiz edildi.

5.2.2. CellTiter-Glo® 3D hücre canlılık analizi

CellTiter-Glo analizi hücrelerde bulunan ATP miktarı üzerinden canlılık ifadesi sağlayan luminesan bir analizdir. PC3 ve LNCaP hücreleri 3D kültürleri için kullanıldı. Geliştirilmiş litik kapasitesi sayesinde mikro dokularda kullanıma olanak sağlamaktadır. Oluşan luminesan sinyalin yarılanma ömrünün en az 3 saat olması CellTiter-Glo'yu 3D kültürde canlılık analizi için tercih edilebilir kılmaktadır (140–142).

Üreticinin önerileri doğrultusunda -20 °C'de saklanan CellTiter-Glo reaktifi, kullanımdan bir gün önce +4 °C'ye alınarak yavaş bir şekilde çözünmesi sağlandı. Sferoidlere uygulanmasından 30 dakika önce oda sıcaklığına alındı. Reaktifin medya ile 1: 1 oranında karışmış olması için, sferoidler 100 µL mevcut medya hacmi ile pipete alınarak 96 kuyucuklu mat beyaz petrilere taşındıktan sonra kuyucuklara 100 µL reaktif eklendi. Örnek içeren kuyucuklar çoklu pipet yardımıyla 8 defa pipetajlandı. Takip eden 25 dakika boyunca karıştırıcı tabla üzerinde, kapalı bir kutu içinde ve oda

sıcaklığında bekletildi. Toplam 30 dakikalık inkübasyonun sonunda luminesan ışımaya mikropetri okuyucu ile kaydedildi. Deney setindeki her doz 6 tekrarlı çalışıldı, her deney 3 defa tekrarlandı. Sonuçlar istatistiksel olarak Graphpad Prism programında analiz edildi.

5.3. Koloni Formasyon Analizi

Koloni formasyon analizi, kanser hücrelerinin tümörojenik davranışlarını 2D kültürde incelemek için kullanılmaktadır. Koloni formasyon testi için 6 kuyucuklu petriye her kuyucuğa 500 adet hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra toplam 10 gün boyunca koloniler gün aşırı medya değişimi ile büyütüldü. Formasyon süresinin 10 günü aşmaması için 24 saatlik kemoterapi 9.günde ve 48 saatlik kemoterapi 8.günde başlatılarak, belirlenen IC₅₀ dozlarında FBA ve Kolşisin uygulaması yapıldı. Uygulama zaman çizelgesi 'de verilmektedir. Koloni formasyon analizinin 10.gününde %4'lük paraformaldehit ile örnekler fikse edildi. Son olarak hücreler %2'lik krezil viyole (ab246816) boyasında 5 dakika bekletildi. Distile su ile boya kalmayınca kadar yıkama yapıldıktan sonra örnekler fotoğraflandı. Koloniler Image J programında sayıldı. Kemoterapi uygulanmayan gruptaki koloni sayısı, kemoterapi uygulanan gruptaki koloni sayılarına oranlanarak analiz edildi. Her deney setinde bir örnekten 3 adet kuyuya ekim yapıldı. Deneyler 3 adet 6 kuyucuklu petride tekrarlandı. Veriler istatistiksel olarak Graphpad Prism programında analiz edildi.



Şekil 5.2 Koloni formasyonu uygulama zamanı çizelgesi (Bu şekil BioRender.com programında oluşturuldu)

5.4. Migrasyon Analizi (Çizik Testi)

Çizik testi, kanser hücrelerinin metastatik davranışlarını 2D kültürde incelemek için kullanılan yöntemlerden biridir (143). Hücrelerin aralarında oluşturulan boş alana doğru mobiliteler kazanarak göç etme davranışı göstermesi migrasyon kabiliyetini ifade etmektedir(144). Migrasyon modeli için 6 kuyucuklu petriye ekilen hücreler (PC3: 500000 hücre, LNCaP: 700000 hücre) gün aşırı medya tazelenerek 5. günde %70-%80 oranında yüzeyi kapladığında alanın ortasında pipet ucu yardımıyla düz bir çizgi oluşturuldu. Oluşan kirliliğin temizlenmesi için Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren PBS ile kuyucuklar yıkandıktan sonra belirlenen IC_{50} dozlarında FBA ve Kolşisin uygulaması yapıldı. Uygulama sürelerine göre 24 ve 48 saat boyunca aralıklı görüntü alınarak, çizginin kapanması takip edildi. İnkübasyon süresi sonunda kapanmayan alanın (T_f) ilk açılan mesafeye (T_0) oranı ile migrasyon oranı hesaplandı. Her deney setinde bir örnekten 3 adet kuyucuğa ekim yapıldı. Deneyler 3 adet 6 kuyucuklu petride tekrarlandı. Kapanan alan ölçümlerinin ardından, veriler istatistiksel olarak Graphpad Prism programında analiz edildi.

5.5. Hücre Proliferasyon Analizi (Ki-67 Testi)

Mitozun G_0 fazı hariç diğer fazlarında Ki-67 antijeni bulunduğundan proliferasyon belirteci olarak kabul edilmektedir (145). Proliferasyon analizi, Ki-67 antikoru ile işaretlenen, 2D ve 3D kültür modellerinde uygulandı. Örnekler tek sıra hücre dizisi haline getirilerek akış sitometrisinde pozitifliklerine göre kaydedildi.

Her deney grubunda yaklaşık bir milyon hücre içeren 2D kültür örnekleri tripsin ile (PC3 hücreleri 5, LNCaP hücreleri 3 dakika) $37^{\circ}C$ 'lik inkübatörde muamele edildi. Medya kuvvetli bir şekilde petri zeminine uygulanarak hücrelerin zeminden ayrılıp medya içine karışması sağlandı. Hücre içeren medya karışımı falkonlarda toplanarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet, 100 μL fiksasyon tamponu ile karıştırılarak çukur tabanlı 96 kuyucuklu petriye aktarıldı.

3D kültür örneklerinde ise hücrelerin tek sıra haline gelebilmesi için sonikatör uygulaması protokole dahil edildi. Her bir sferoid için ayrı ayrı ependorflara %0,2'lik tripsin tamponu (1 mL Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS, 2 μL tripsin) konuldu. Sferoidler 30 μL medya hacmi ile kuyucuklarından alınıp bu tüplere taşınarak mevcut medya ve kemoterapötiklerin uzaklaştırılması sağlandı. Tekrar 30 μL hacim ile alınarak, 200 μL

tripsin içeren tüplere taşındı. Sonikatör su banyosunda 37 °C'de 10 dakika muamele edildi. Bu uygulama PC3 sferoidleri için 5 dakika su banyosunun ardından 10 saniyelik vorteks uygulaması şeklinde yapılırken LNCaP sferoidlerinde ise vorteks uygulaması hücreleri tahrip ettiğinden kullanılmadı. Tripsinizasyonu durdurmak amacıyla, örneklerin üzerine 2 mL medya ilave edildi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet, 100 µL fiksasyon tamponu ile karıştırılarak çukur tabanlı 96 kuyucuklu petriye aktarıldı.

Fiksasyon için örnekler +4 °C'de 30 dakika %4 PFA içeren fiksasyon tamponunda bekletildi. Kuyucukların üzerine 100 µL perm/wash tamponu eklenerek 1600 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Petri hızlı bir şekilde ters çevrilerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 100 µL perm/wash tamponu (True-Nuclear Transcriptipn Factor Buffer Set, BioLegend, 424401) ile yıkandı. Petri tekrar 1600 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Her kuyucukta 3 µL Ki-67 antikorunu (sc23900, Santa Cruz Biotechnology, USA) olacak şekilde perm/wash tamponu içinde primer antikor karışımı hazırlandı. Petri hızlıca ters çevrilerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 100 µL primer antikor karışımı her kuyucukta pellet ile karıştırılıp +4 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından kuyucukların üzerine 100 µL perm/wash tamponu eklenerek petri 1600 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Petri hızlıca ters çevrilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Perm/wash tampon içinde 1: 2000 oranında keçi anti-fare 568 sekonder antikor karışımı hazırlandı. Her bir pellet 100 µL sekonder antikor solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Kuyucukların üzerine 100 µL FACS tamponu (PBS içinde %2 FBS) eklenerek petri 1600 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Petri hızlıca ters çevrilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Her bir pellet 200 µL FACS tamponu ile karıştırılarak FACS tüplerine aktarıldı. Örnekler FACSymphony cihazında okutularak kaydedildi. Kaydedilen verilerin analizi için FlowJo (Version 10) programı kullanıldı.

5.5.1. Akış sitometri analizi

Akış sitometri cihazı hücreleri büyüklüğüne göre algılayan FSC (forward scatter, laser yolu boyunca ölçüm yapan) ve hücre içeriğindeki nükleus gibi granüler yapıları algılayan SSC (side scatter, 90⁰'lik ölçüm yapan) optik dedektörleri ile örnekteki sinyalleri kaydetmektedir (146). FACSymphony arayüz programında bu sinyallerden

SSC'ye karşı FSC grafiği oluşturarak örnek popülasyonu hakkında bilgi vermektedir. Aynı zamanda belirlenen floresan ışımayı da algılayarak popülasyon içindeki floresan yanıtı da kaydetmektedir. Her bir örnek setine ait SSC-FSC grafiklerinde örnek topluluğu daire içine alınarak örneklem alanı kapılanarak tüm gruplarda aynı alan analiz edildi. Negatif kontrol örneğinde Ki-67 kapısı eşik değeri % 0,2 pozitif değeri verecek şekilde alındı. Oluşturulan bu eşik değeri diğer örnek gruplarına atanarak veriler normalize edildi. Örneklere bu normalize edilen kısımdaki veri, Ki-67 pozitiflik değeri olarak kabul edildi.

5.6. İmmüno Floresan Analiz

2D kültür örnekleri için tüm hücre hatları 12 kuyucuklu IBIDI lamlara ekilerek 1 gece yüzeye tutunması beklendi. Ertesi gün, belirlenen IC₅₀ dozlarında FBA ve Kolşisin 24 ve 48 saat süre ile uygulandı. Kemoterapötik içeren medya kuyulardan uzaklaştırıldıktan sonra kuyulara 100 µL %4'lük paraformaldehit eklenerek 25 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksatif kuyulardan uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi için kuyulara 200 µL PBS eklenerek 5 dakika bekletildi ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Permeabilizasyon işlemi %0,5'lik Triton-X solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika süre bekletilerek gerçekleştirildi. Solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile 3 defa yıkama işlemi tekrarlandı. Örnekler 100 µL bloklama solüsyonu (%0,3 Triton-X, %5 keçi serum) ile oda sıcaklığında 1 saat muamele edildi. Kullanılacak primer antikolar Anti-JNK1+JNK2+JNK3 (ab179461), Anti-p38 (ab17099) ve Anti-ERK1/ERK2 (ab184699) dilüsyon tamponu içinde sırasıyla 1: 200, 1: 100 ve 1: 200 dilüsyonda hazırlandı. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan her kuyucuğuna 100 µL primer antikor konulan lamlar, nemli kutuya alınıp +4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, PBS ile yıkamanın ardından örneklere 1: 1000 dilüsyonda hazırlanan sekonder antikolar Goat anti-mouse 568 (Anti-JNK1+JNK2+JNK3 ve Anti-ERK1/ERK2 için) ve Goat anti-rabbit 488 (Anti p38 için) uygulanarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Ardından PBS ile yıkayıp nükleus boyası (DAPI) ile arka plan boyaması yapıldı. Floromount ile kapatılan lamlar Zeiss LSM 800 mikroskopunda görüntülendi.

3D kültür örneklerinin kontrol gruplarını 375-380 µm çapa ulaşan sferoidler oluşturdu. İmmüno Floresan protokol ependorf tüpler içinde ve 100 µl'lik sıvı hacminde

gerçekleştirildi. Görüntüleme aşamasında sferoidler lamel üzerine yapıştırılan 12 kuyucuklu IBIDI lamlara taşındı. Sferoidler 30 µL medya ile kuyucuklarından alınarak, %4'lük paraformaldehit içeren ependorflara aktarıldı. Bir saat oda sıcaklığında fikse edildikten sonra tüplere 500 µL PBS eklenip uzaklaştırılarak 5 dakika süre ile 3 defa yıkandı. Permeabilizasyon işlemi için örnekler 100 µL %0,5'lik Triton-X ile 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 500 µL PBS eklenerek örnekler yıkandı. Sferoidler, bloklama solüsyonunda (%0,3 Triton-X, %5 keçi serum) 30 dakika 37°C'lik su banyosunda, ardından 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Kullanılacak primer antikolar Anti-JNK1+JNK2+JNK3 (ab179461), Anti-p38 (ab17099), Anti-ERK1/ERK2 (ab184699) dilüsyon tamponu içinde uygun konsantrasyonlarda hazırlandı. Primer antikolar +4 °C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikolarla uyumlu sekonder antikolar ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübe edildi. Sekonder antikor uzaklaştırıldıktan sonra 500 µL PBS tüplere konularak örnekler 5 dakika yıkandı. Ardından tüplere 100 µL nükleus boyası (DAPI) konularak 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. DAPI tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 500 µL dH₂O ilave edildi. Sferoidler 100 µL dH₂O ile tüplerden alınarak 12 kuyucuklu IBIDI lamlara aktarıldı. Lamlar floromount ile kapatılmadan Zeiss LSM 800 mikroskobunda Z-stack modunda 3D olarak görüntülendi.

Primer antikoların intensite ölçümleri Image J programı kullanılarak yapıldı. 2D örneklerde 20X büyütme ile fotoğraflanan 3 alanda yer alan bütün hücrelerde primer antikor intensitesi ölçülerek hücre sayısına bölündü. Her bir proteinin intensite oranı, sadece sekonder antikor uygulanan negatif kontrol örneklerine göre normalize edilerek hesaplandı. 3D örneklerde Z-stack olarak kaydedilen görüntüler Image J programında üst üste birleştirilerek her bir proteinin intensite ölçümü yapıldıktan sonra sferoidin alanına oranlandı. Antikoların intensite oranı sadece sekonder antikor uygulanan negatif kontrol örneklerine göre normalize edilerek hesaplandı.

5.7. Transmisyon Elektron Mikroskopi

Kolşisin ve FBA uygulaması yapılmış 2D hücreler tripsin ile zeminden kaldırıldıktan sonra uygun medyum ile karıştırıldı. Oluşan süspansiyon hücre karışımı

1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen pellet %2,5 glutaraldehit ile karıştırılarak fikse edildi. 3D kültür örnekleri 30 µL hacim ile %2,5 glutaraldehit bulunan ependorflara alınarak fikse edildi. Fikse olan 2D ve 3D örnekler, %1,5'lük agar içine gömülerek takip sürecine alındı. Sferoidler 30 µL medya ile kuyucuklarından alınarak %3'lük ılık agar ile karıştırılırken, 2D örnekler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra elde edilen pelletin üzerine %1,5'lük ılık agar eklendi. Agar ilave edilen örnekler 2 saniye vortekslendi. Ardından 7 saniye mini spinde döndürülerek örneklerin dibe çökmesi sağlandı. Böylece sıvı penetrasyonuna izin verecek gevşeklikte ve örneği bir arada tutmaya yetecek güçte bir ara ortam oluşturuldu.

Agar içindeki örneklere tampon solüsyon ile yıkamadan sonra %1'lik osmiyum tetroksit ile 1 saat post-fiksasyon yapıldı. Ardından yükselen aseton serilerinde (sırasıyla %30, %60, %90, %100) 30'ar dakika bekletilerek dehidratasyon sağlandı. Epoxy-Embedding Kit (Sigma45359) protokolüne uygun hazırlanan epon karışımı, saf aseton ile 1: 1 oranında karıştırıldı. Örnekler bu karışımda 1 saat bekletildikten sonra 1: 2 oranında saf aseton: epon karışımında 1 saat bekletildi. Ardından saf eponda 1,5 saat bekletildi. Hazırlanan epon karışımı kalıplara dökülerek örnekler kalıpların uçlarına denk gelecek şekilde gömüldü. Kalıplar 60 °C'de 24 saat bekletilerek eponun polimerizasyonu sağlandı. Etüvde bekletilen kalıplar ilk 1 saat içinde kontrol edilerek örneklerin yer değiştirme ihtimallerine karşılık, yeniden lokalize edildi. Bloklardan, ultramikrotom (Leica Ultracut R) ile 1 µm kalınlığında yarı-ince kesitler alındı. Kesitler toluidin mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile alan belirlendi. Bloklar bu alana uygun şekilde traşlandıktan sonra 60 nm kalınlığındaki ince kesitler 200 mesh bakır gridler üzerine alındı. Kesitler Zeiss EVO HD 15 STEM mikroskobunda incelendi ve fotoğraflandı.

5.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism programında One-Way Anova testi kullanılarak yapıldı. Canlılık analizinde mikropetri okuyucudan elde edilen absorbans değerleri GraphPad Prism programında normalize edildikten sonra uygulanan konsantrasyonların logaritması alınarak IC₅₀ değerleri elde edildi. Koloni formasyon analizinde petriyer fotoğraflandıktan sonra petriyerin dış duvarına denk gelen kısım

ölçüm dışı bırakılarak koloniler Image J programı ile sayıldı ve elde edilen veriler One-Way Anova testi, Tukey's ve Dunnet's post testi ile istatistiksel olarak analiz edildi. Migrasyon analizinde oluşturulan çiziklerin alanları Image J programında ölçüldükten sonra başlangıç ve bitiş zamanındaki alanların oranlanmasıyla kapanma yüzdesi Microsoft Excel programında hesaplandı. Kapanma yüzdesi verileri One-Way Anova testi ve Tukey's post testi ile istatistiksel olarak analiz edildi. İmmünofloresan analizlerde intensite ölçümleri Image J programında yapılarak Microsoft Excel programında intensite oranı hesaplandı. İntensite oranları One-Way Anova testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

İstatistiksel anlamlılık değeri $p \leq 0,05$ olarak değerlendirildi.



6. BULGULAR

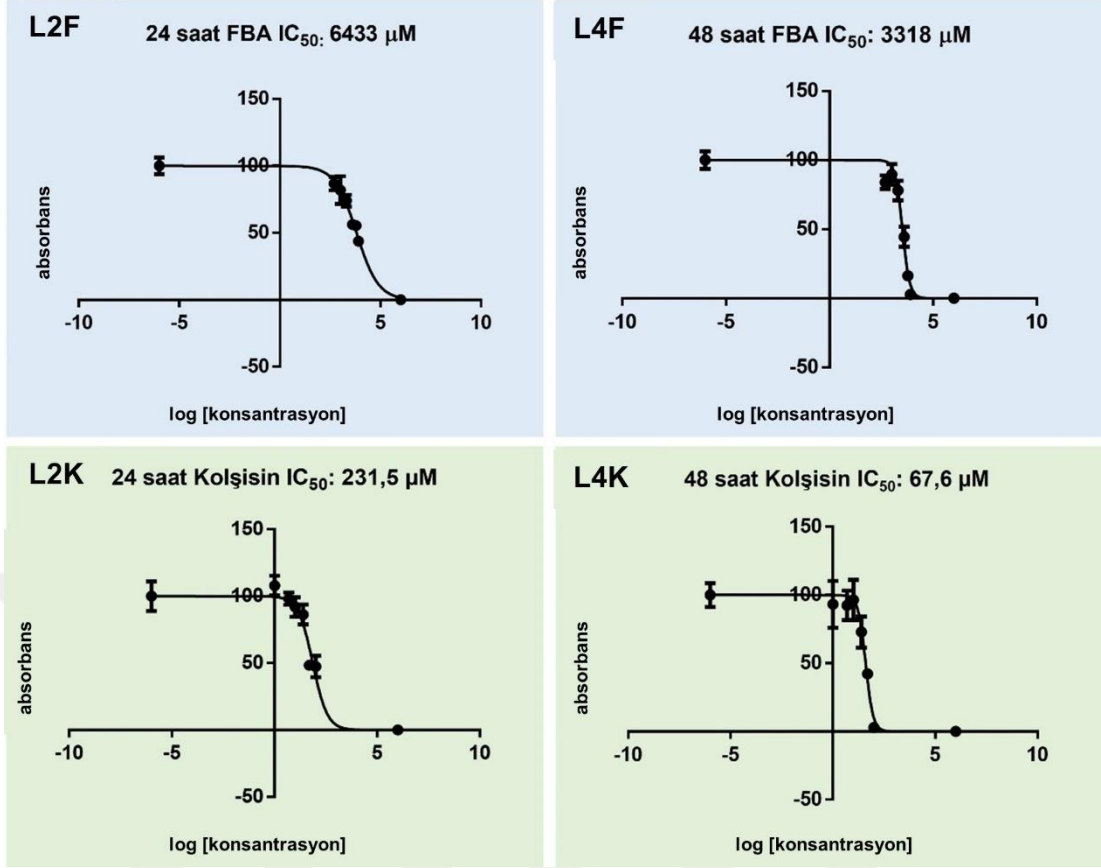
6.1. Canlılık Analizleri

6.1.1. 2D kültür modeli

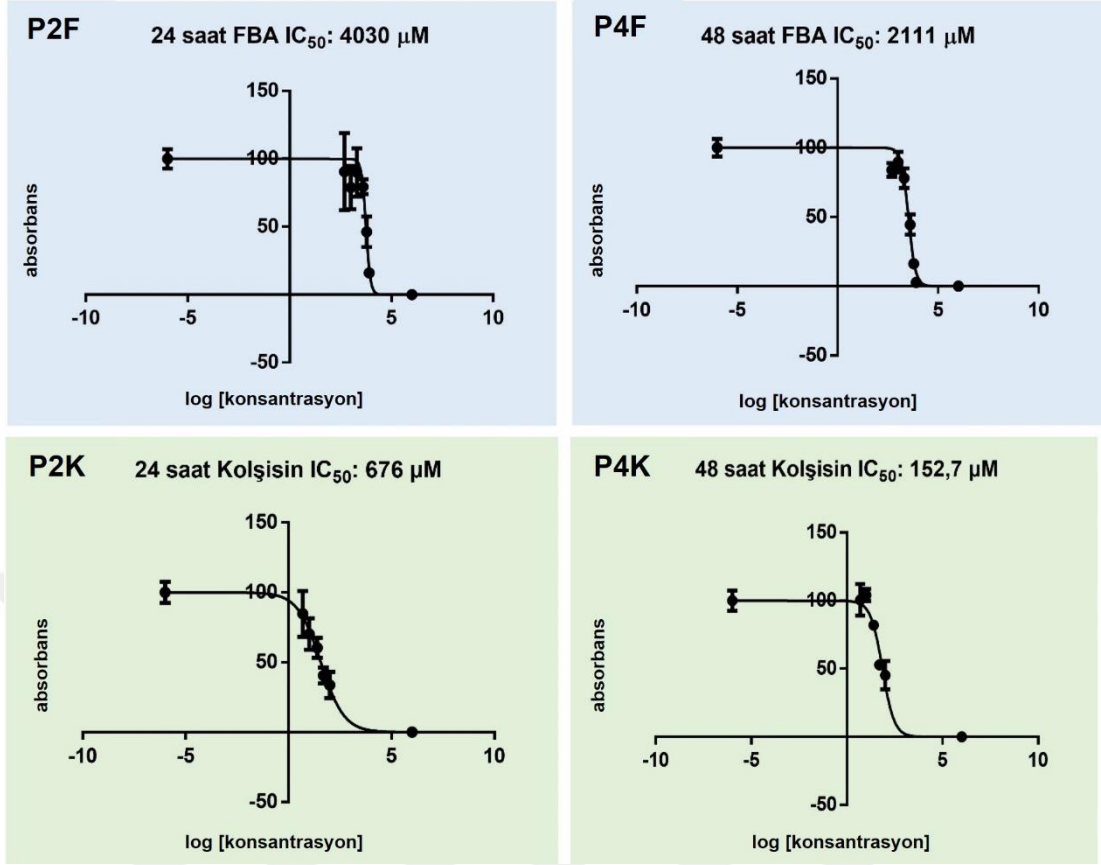
LNCaP, PC3 ve RWPE-1 hücrelerine 24 ve 48 saatlik kemoterapötik uygulamalarının IC_{50} değerlerine ait grafikleri verilmektedir (Şekil 6.1, Şekil 6.2, Şekil 6.3).

Kolşisin uygulaması, DMSO içinde hazırlanan yüksek dozdaki stoktan maksimum uygulanacak doz en fazla 1: 1000 DMSO içerecek şekilde seyreltilerek hazırlandığından literatürü desteklemek adına medya içinde seyreltilmiş 1: 1000 oranındaki DMSO çözeltisi de canlılık analizine dahil edildi. Kemoterapötik uygulanmayan örnek ile benzer sonuçlar elde edildiğinden hücrelerde toksisite oluşturmadığı şeklinde yorumlandı. Kolşisin stoğu bu şekilde hazırlanarak devam edildi.

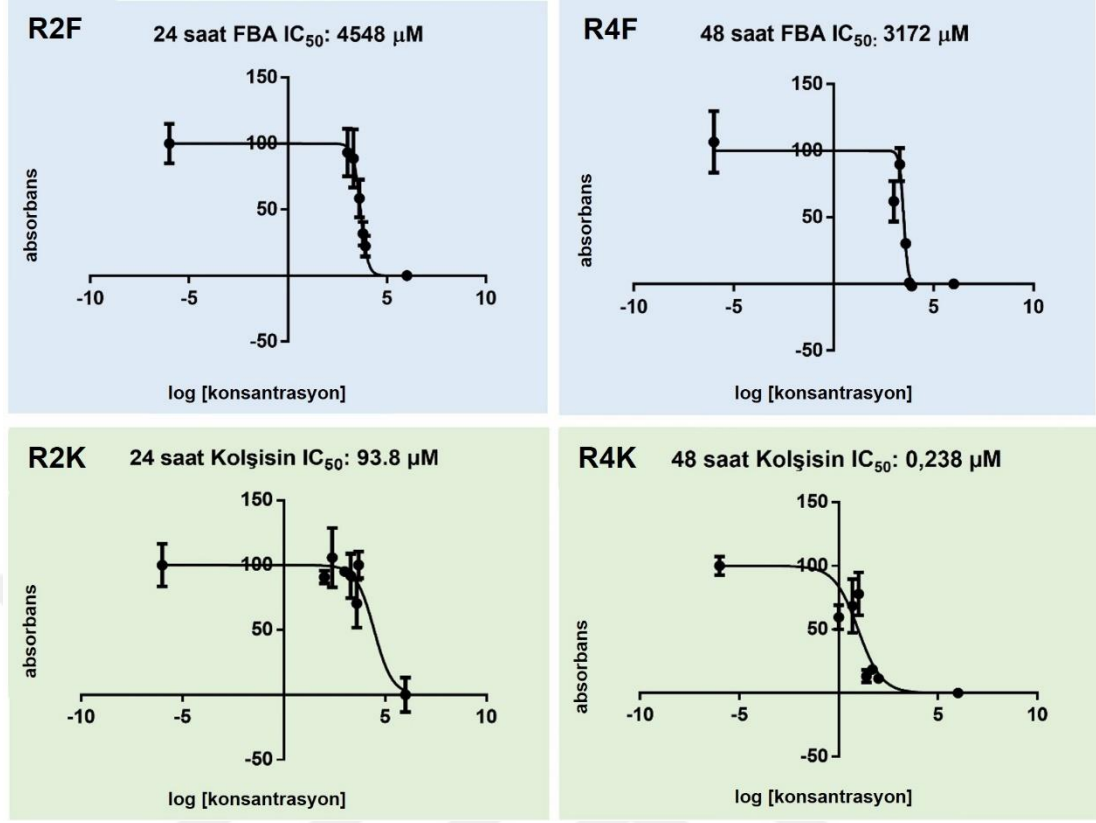
24 ve 48 saatlik Kolşisin ve FBA uygulaması sonucu hesaplanan IC_{50} değerleri Tablo 6.1’de verilmektedir. RWPE-1’e uygulanan kemoterapötiklerin hesaplanan IC_{50} değeri ile PC3 ve LNCaP hücrelerine aynı kategoride uygulanan kemoterapötik ve süreye ait IC_{50} değeri arasındaki farklara bakıldığında; L4F, P2F ve P4F gruplarına ait değerlerin R2F ve R4F gruplarına ait değerlerden düşük olduğunu görmekteyiz. Bu sonuçlar doğrultusunda FBA’ nın 24 saat PC3 hücrelerine, 48 saat LNCaP ve PC3 hücrelerine uygulanması gereken IC_{50} değerinin 24 ve 48 saat RWPE-1 hücrelerine uygulanması halinde sitotoksiteden uzak olabileceğini düşünmekteyiz. L2F grubuna ait IC_{50} değerinin ise R2F grubunun IC_{50} değerine çok yakın olmasından dolayı 24 saatlik bu uygulamanın RWPE hücrelerinde düşük sitotoksisite oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Kolşisin uygulanan grupların IC_{50} değerlerine bakıldığında ise RWPE-1 hücrelerine ait IC_{50} değerlerinden çok yüksek olduğunu görmekteyiz. Bu sonuçlar doğrultusunda süre ve hücre tipi farketmeksizin Kolşisin uygulamasının RWPE-1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu ifade edebilmekteyiz.



Şekil 6.1 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerine ait grupların IC_{50} grafikleri



Şekil 6.2 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinin IC₅₀ grafikleri



Şekil 6.3 2D kültür modelinde RWPE-1 hücrelerinin IC_{50} grafikleri

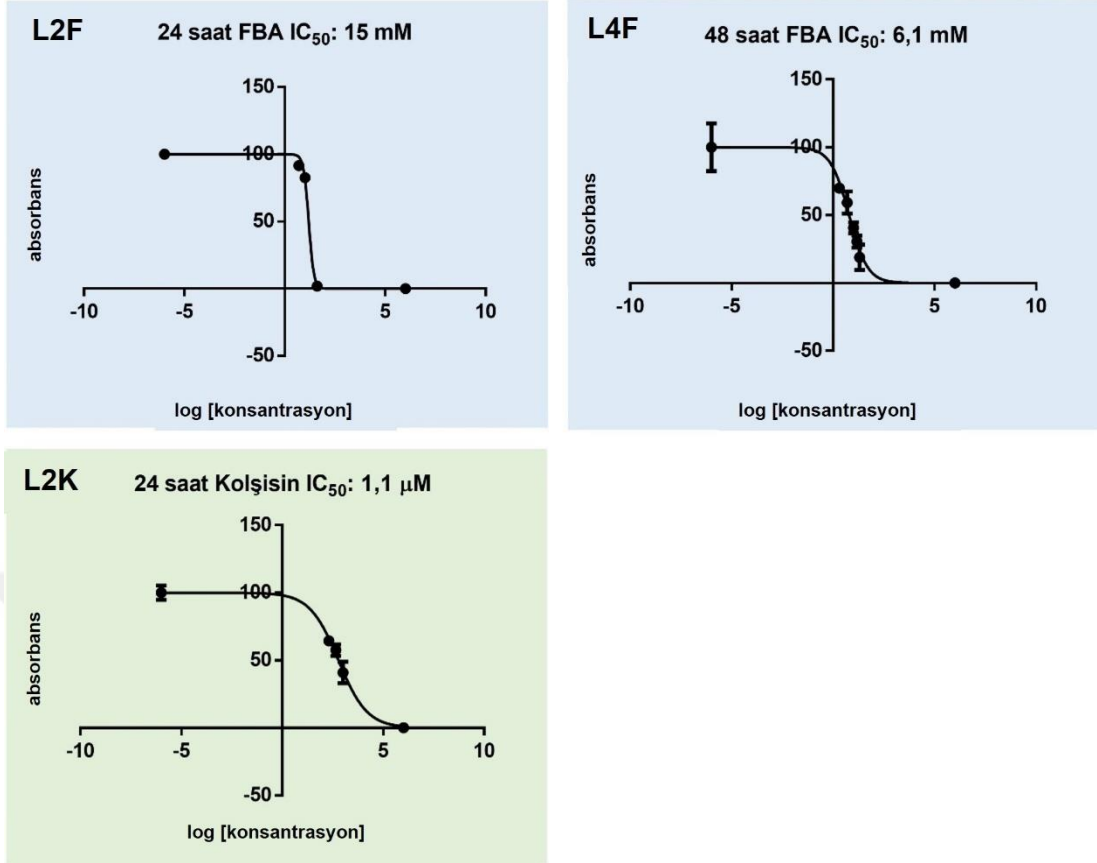
Tablo 6.1 2D kültür modelinde RWPE-1, LNCaP ve PC3 hücrelerine FBA ve Kolşisin uygulamalarının IC_{50} değerleri

	<i>FBA</i>		<i>Kolşisin</i>	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
<i>RWPE-1</i>	4,5 mM	3,2 mM	93.8 μ M	0,238 μ M
<i>LNCaP</i>	6 mM	3,3 mM	231,5 μ M	67,6 μ M
<i>PC3</i>	4 mM	2,1 mM	676 μ M	152,7 μ M

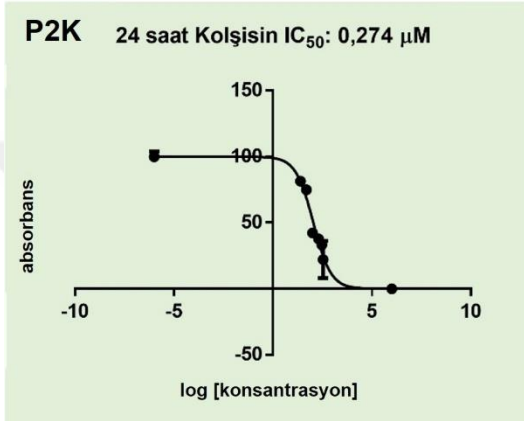
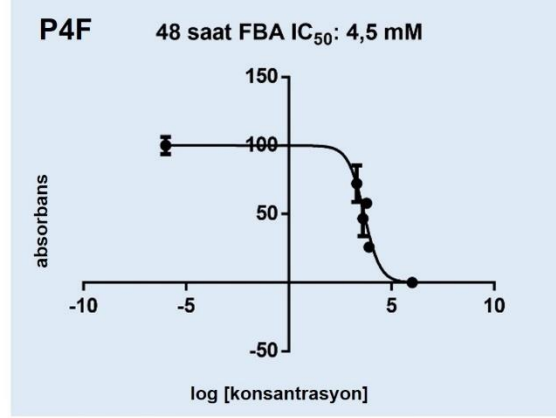
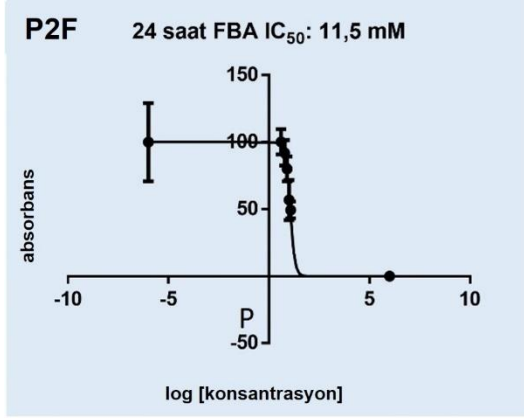
6.1.1. 3D kültür modeli

LNCaP ve PC3 hücrelerine FBA (24 saat ve 48 saat) ve Kolşisin (24 saat) uygulamalarının IC₅₀ değerlerine ait grafikler verilmektedir (Şekil 6.4, Şekil 6.5).

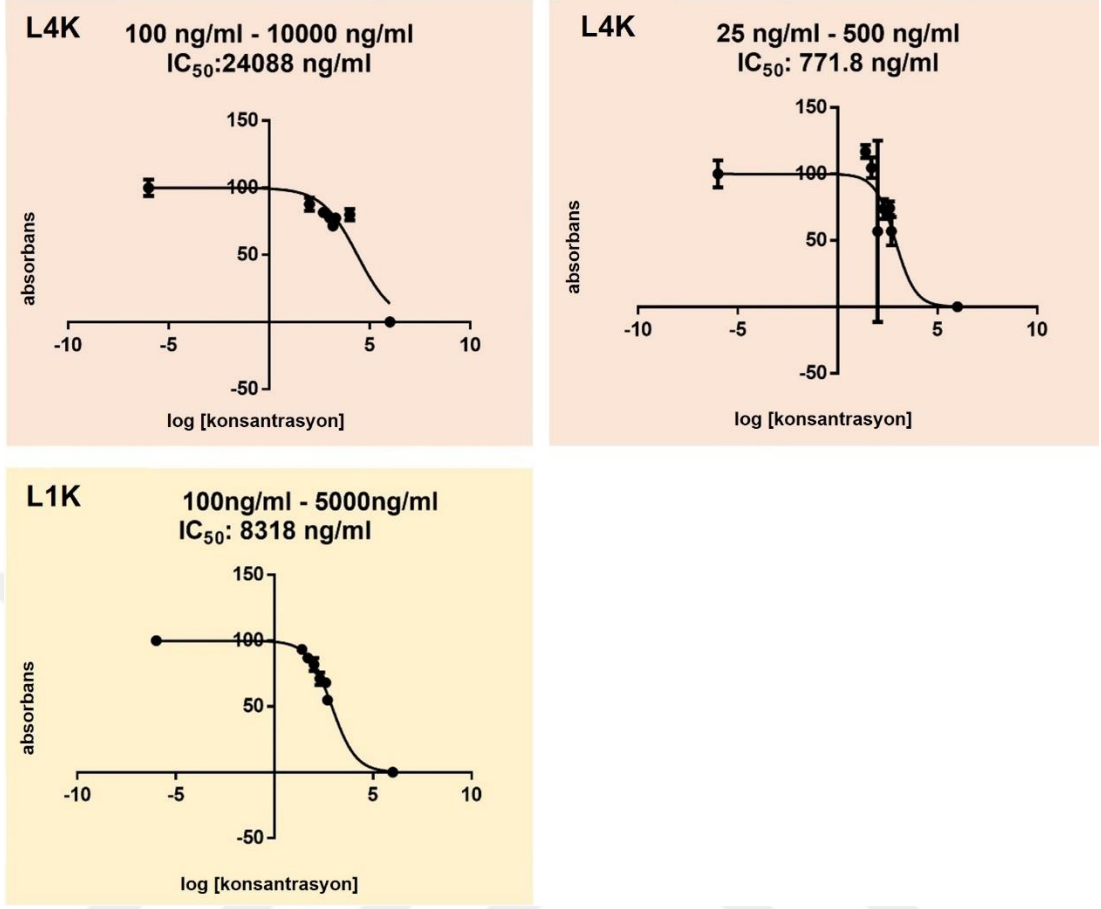
PC3 ve LNCaP hücre hatlarına 48 saatlik Kolşisin uygulamasının analizlerinde, uygulanan doz aralığından daha yüksek IC₅₀ değerleri elde edildi (Şekil 6.6, Şekil 6.7). Bir sonraki denemede konsantrasyon yükseltilmesine rağmen IC₅₀ değerindeki artış doz aralığı dışında kalmaya devam ettiğinden 48 saatlik Kolşisin uygulama gruplarında net bir IC₅₀ değeri bulunamadı ve gruplar deney dışı bırakıldı. Kolşisin'in etkinlik süresinin 3D'de 12 saat olma potansiyeli düşünülerek PC3 ve LNCaP hücrelerinde yapılan canlılık analizinde de uygulanan doz aralığı dışında kalan IC₅₀ değerleri elde edildiğinden bu grup deneye dahil edilmedi (Şekil 6.6, Şekil 6.7). Bu durum literatürde ilaç direnci olarak tanımlanmakta olup LNCaP ve PC3 hücre hatlarının da aralarında bulunduğu benzer sonuçlar elde edilen literatür bilgisi sonucumuzu desteklemektedir (84, 147, 148). Benzer bir durum ile 24 saatlik uygulamada da karşılaşılmış olsa da üç tekrarlı deneylerin birinde doz aralığında bulunan bir IC₅₀ değeri tesbit edildi. Bu sebeple deneylere sadece 24 saatlik Kolşisin uygulanan PC3 ve LNCaP hücreleri ile devam edildi. Uygulanan 24 ve 48 saatlik FBA ve 24 saatlik Kolşisin uygulamaları sonucu hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 6.2' de özetlenmektedir.



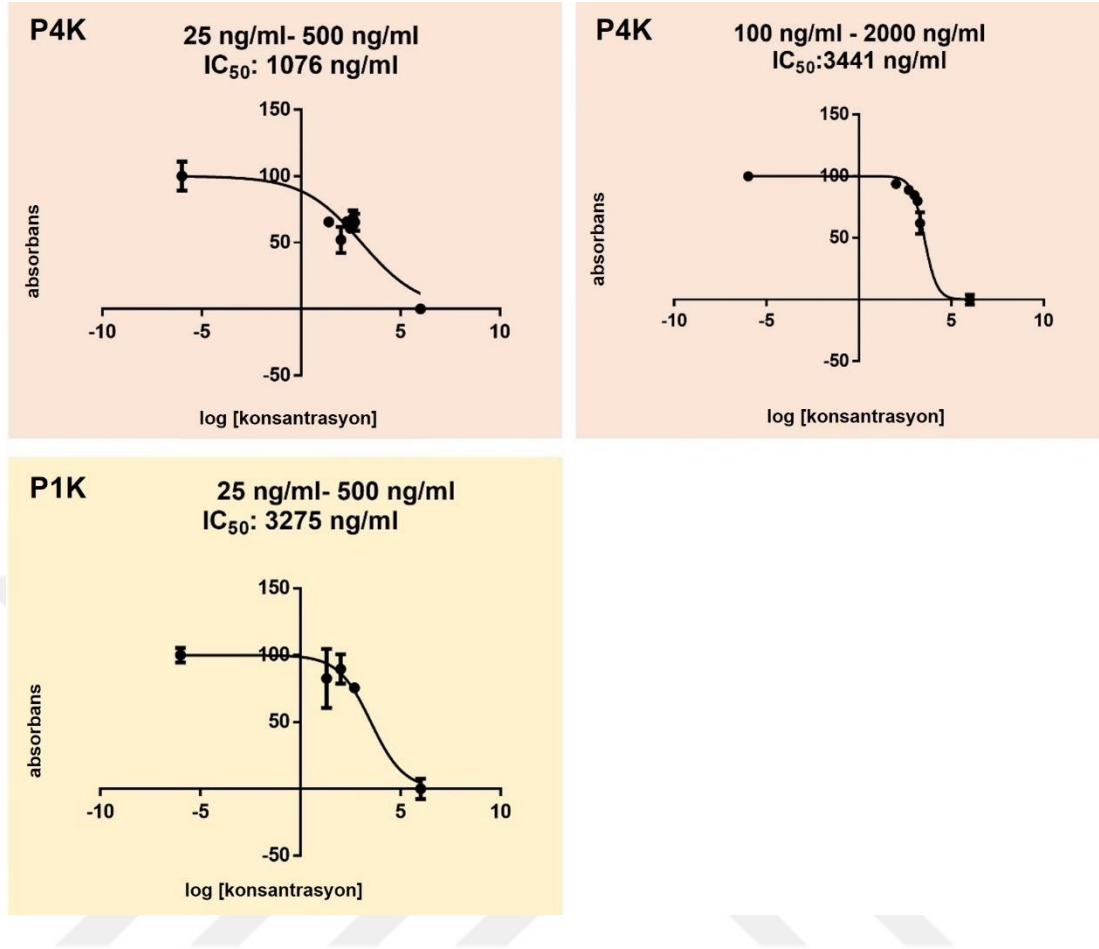
Şekil 6.4 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinin IC₅₀ grafikleri



Şekil 6.5 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinin IC_{50} grafikleri



Şekil 6.6 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinin IC_{50} grafikleri. IC_{50} değerlerinin üzerindeki konsantrasyonlar uygulanan doz aralığı değerleridir



Şekil 6.7 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinin IC₅₀ grafikleri. IC₅₀ değerlerinin üzerindeki konsantrasyonlar uygulanan doz aralığı değerleridir

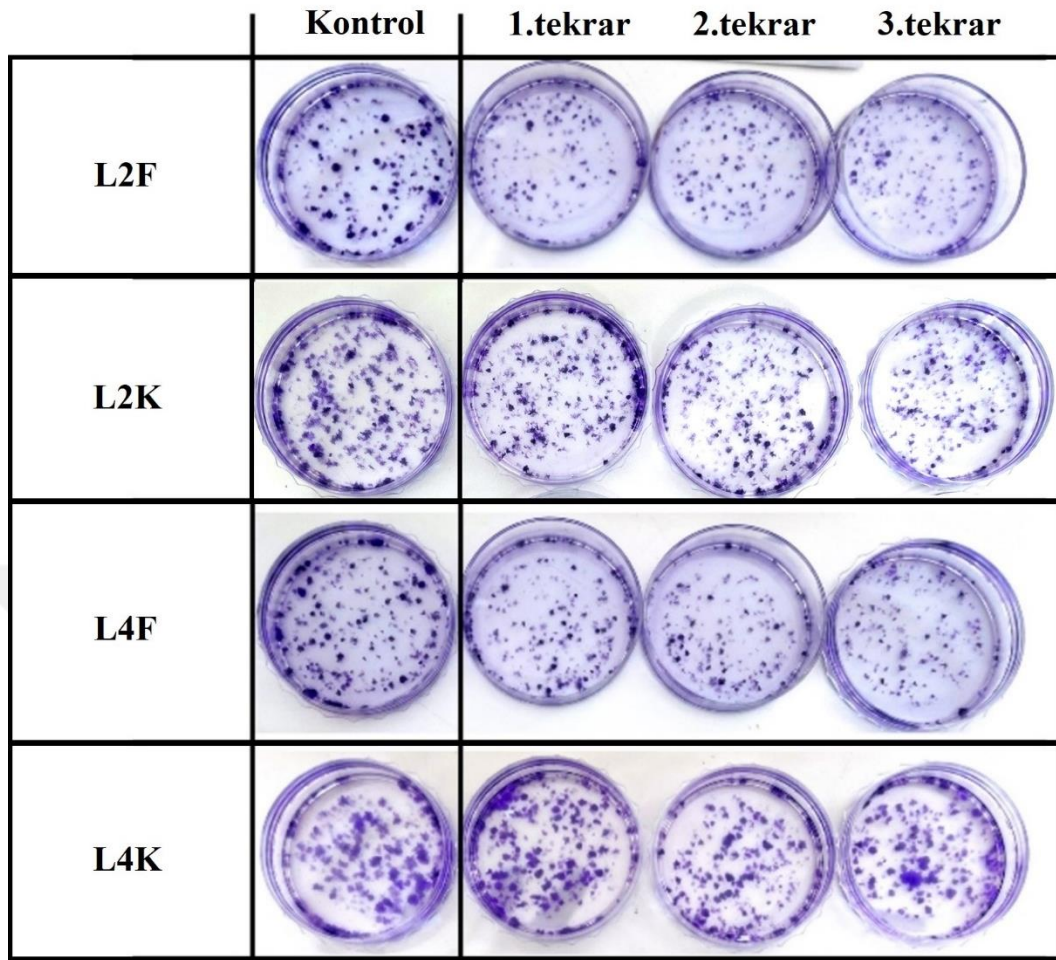
Tablo 6.2 3D kültür modelinde LNCaP ve PC3 hücrelerine uygulanan FBA ve Kolşisin IC₅₀ değerleri

	<i>FBA</i>		<i>Kolşisin</i>	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
<i>LNCaP</i>	15 mM	6,1 mM	1,1 µM	-
<i>PC3</i>	11,5 mM	4,5 mM	0,274 µM	-

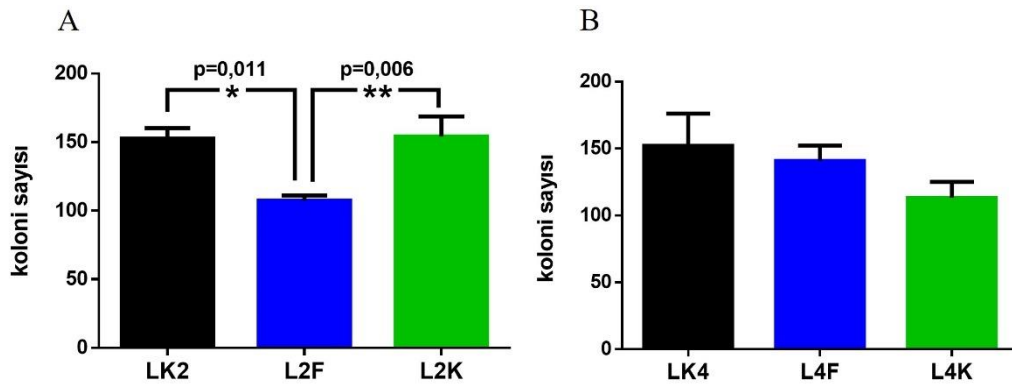
6.2. Koloni Formasyon Analizi

Kemoterapötiklerin uygulanma süreleri kemoterapötik uygulanmayan kontrol petripleri ile karşılaştırıldı. LNCaP hücrelerine ait koloni sayımı yapılan petriplerinin fotoğrafları Şekil 6.8'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu kemoterapötik uygulanmayan gruba kıyasla 24 saat FBA uygulanan LNCaP hücrelerinin koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,011$) düşüş gözlemlendi. 24 saat kemoterapötik uygulanan gruplar arasında ise FBA uygulanan hücrelerde Kolşisin uygulanan hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,006$) düşüş gözlemlendi. 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 6.9).

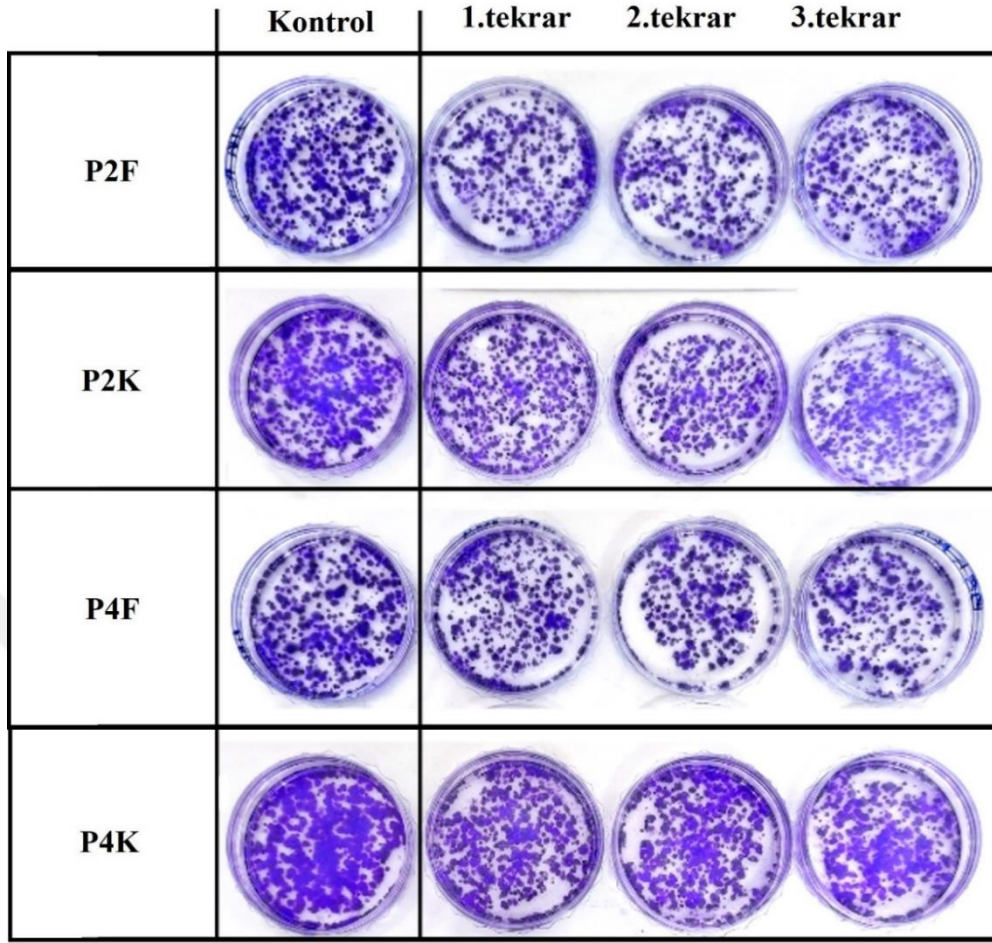
PC3 hücrelerine ait koloni sayımı yapılan petriplerinin fotoğrafları Şekil 6.10'da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu kemoterapötik uygulanmayan gruba kıyasla 24 saatlik FBA uygulanan PC3 hücrelerinin koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,038$) düşüş gözlemlendi. 24 saat kemoterapötik uygulanan gruplar arasında ise FBA uygulanan hücrelerde Kolşisin uygulanan hücrelere kıyasla koloni sayısında anlamlı ($p=0,042$) düşüş gözlemlendi. Kemoterapötik uygulanmayan gruba kıyasla 48 saat Kolşisin uygulanan PC3 hücrelerinin koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,022$) düşüş gözlemlendi. Kemoterapötik grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 6.11).



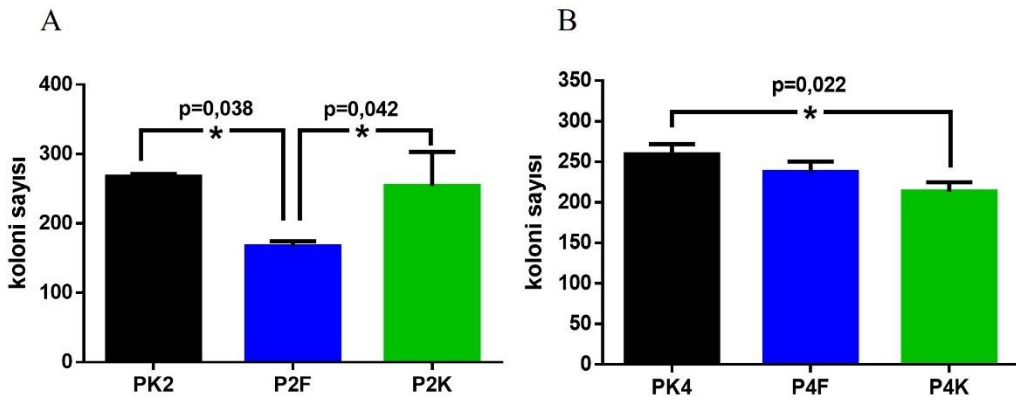
Şekil 6.8 2D kültür modelinde kemoterapötik uygulanan LNCaP hücre hattına ait tedavi gruplarının 3 tekrarlı ve Kontrol grubunun koloni formasyon petripleri



Şekil 6.9 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin koloni sayıları



Şekil 6.10 2D kültür modelinde kemoterapötik uygulanan PC3 hücre hattına ait tedavi gruplarının 3 tekrarlı ve Kontrol grubunun koloni formasyon petripleri

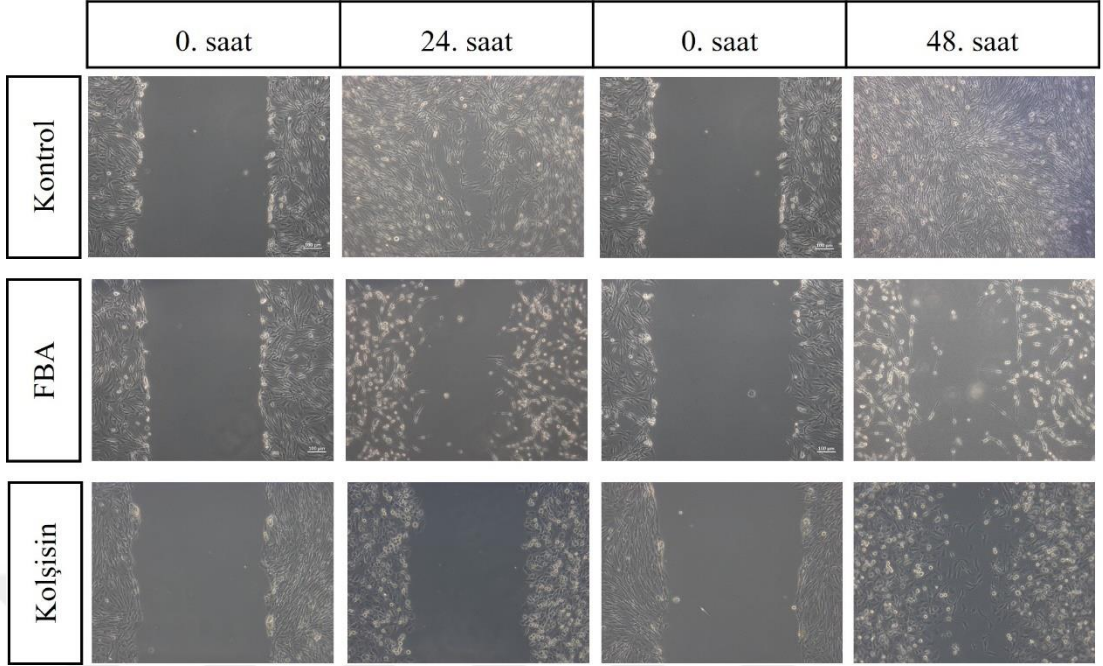


Şekil 6.11 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin koloni sayıları

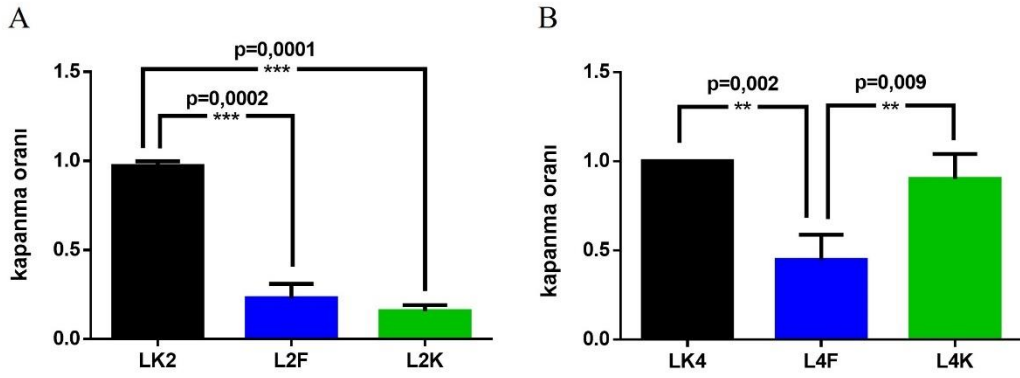
6.3. Migrasyon Analizi

FBA ve Kolşisin uygulamalarının LNCaP hücrelerinde migrasyon üzerine etkileri aynı alanda bağımlı ölçümler yapılarak çizik testi ile analiz edildi (Şekil 6.12). Yapılan istatistiksel analizler sonucu LNCaP hücrelerinde, kemoterapötik uygulanmayan gruba kıyasla, L2F ($p=0,0002$), L2K ($p=0,0001$) ve L4F ($p=0,002$) gruplarında migrasyon oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü. 48 saatlik kemoterapötik uygulama grupları karşılaştırıldığında ise L4F grubunun L4K grubuna kıyasla migrasyon oranında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaya sebep olduğu görüldü ($p=0,009$) (Şekil 6.13).

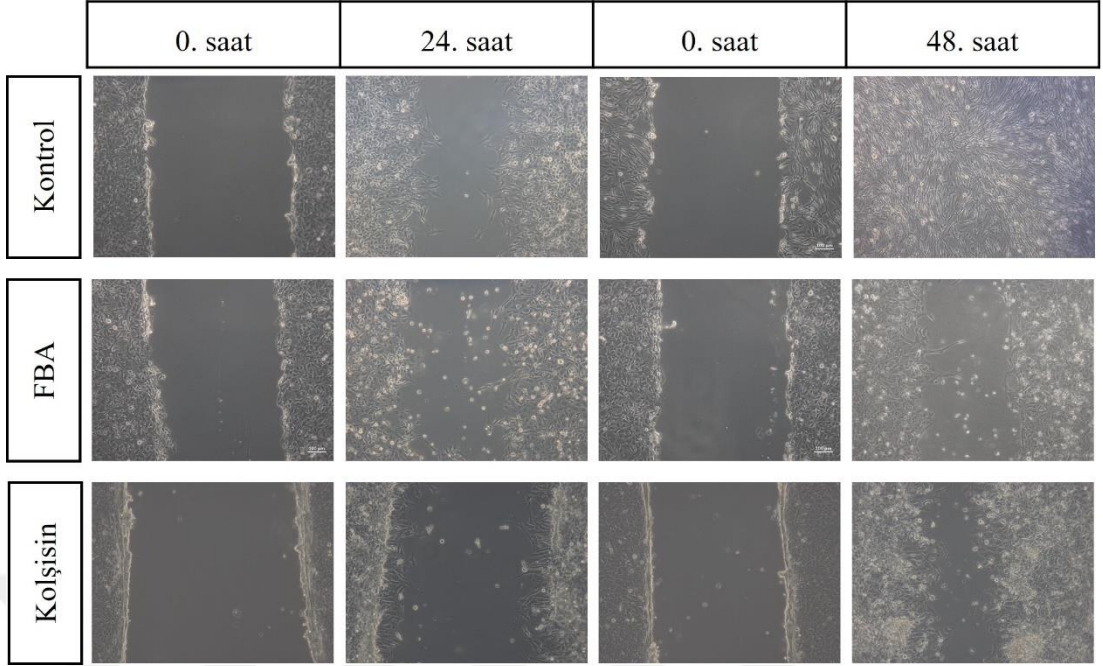
PC3 hücrelerinde FBA ve Kolşisin'in migrasyon üzerine etkileri aynı alanda bağımlı ölçümler yapılarak çizik testi ile analiz edildi (Şekil 6.14). Yapılan istatistiksel analizler sonucu kemoterapötik uygulanmayan gruba kıyasla, P2F ($p=0,013$) ve P2K ($p=0,015$) gruplarında migrasyon oranında istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğu görüldü. 24 saat uygulanan kemoterapötik grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. FBA ve Kolşisin'in 48 saat uygulandığı PC3 hücrelerinde P4F ($p=0,002$) ve P4K ($p=0,026$) gruplarında migrasyon oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede azladığı görüldü. 48 saat uygulanan kemoterapötik grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 6.15).



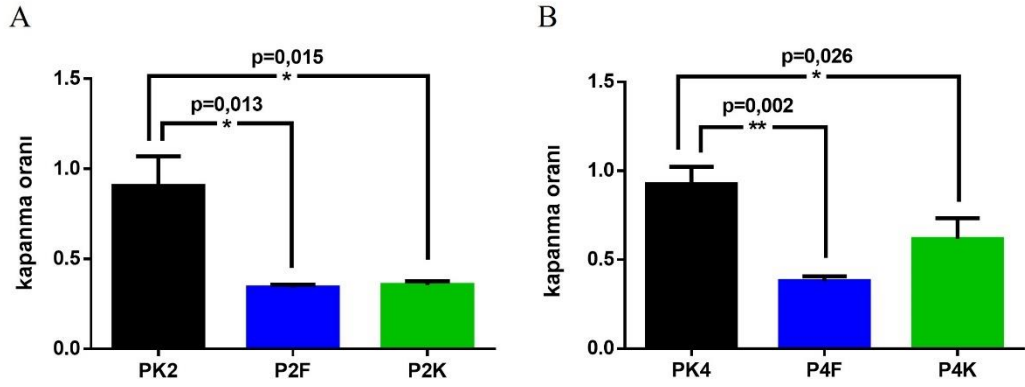
Şekil 6.12 FBA ve Kolşisin uygulanmış LNCaP hücrelerinde migrasyon alanları. Büyütme: 10X



Şekil 6.13 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin migrasyon alanı kapanma oranları



Şekil 6.14 FBA ve Kolşisin uygulanmış PC3 hücrelerinde migrasyon alanları. Büyütme: 10X



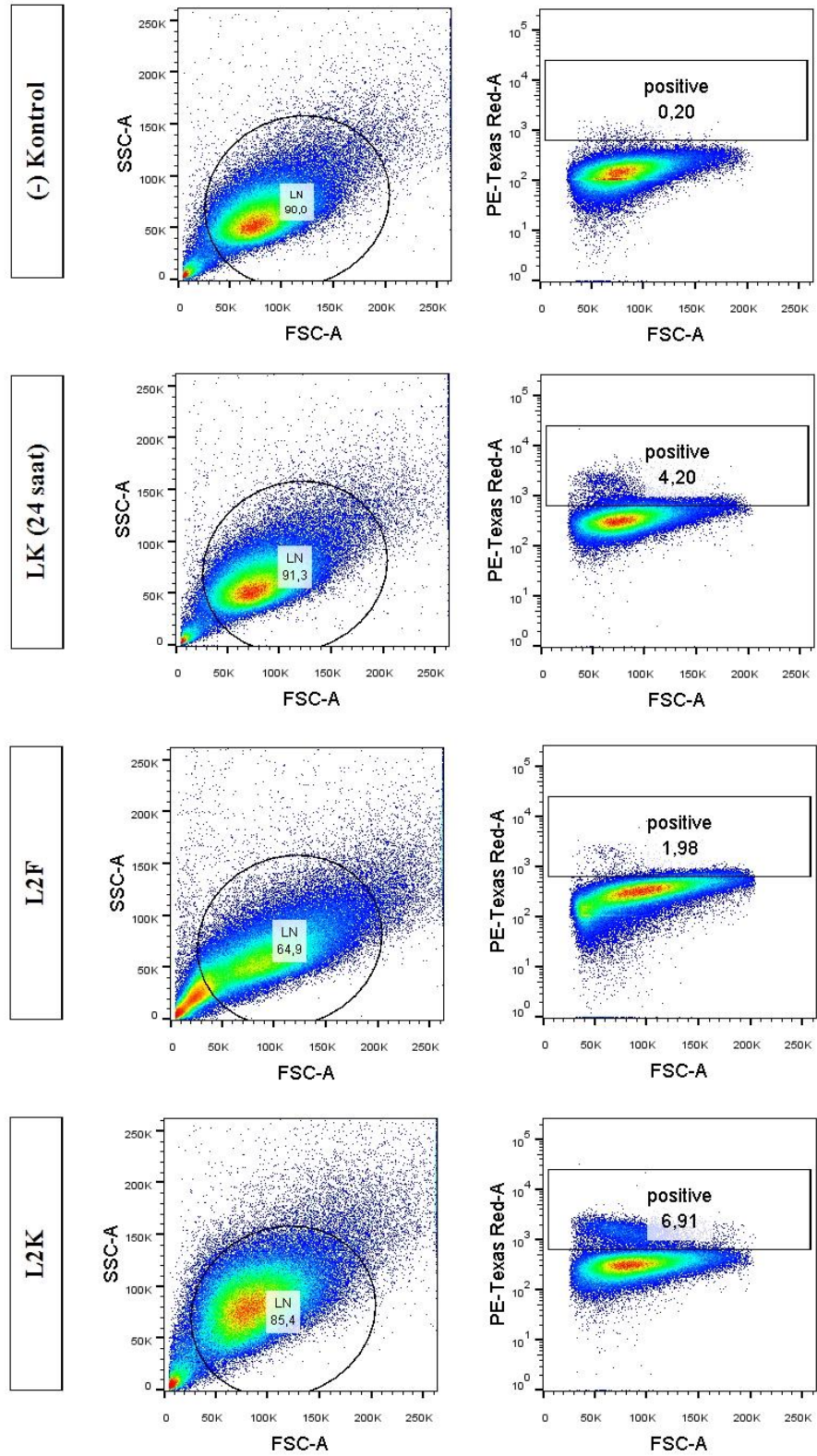
Şekil 6.15 (A) 24 saat ve (B) 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin migrasyon alanı kapanma oranları

6.4. Proliferasyon Analizi

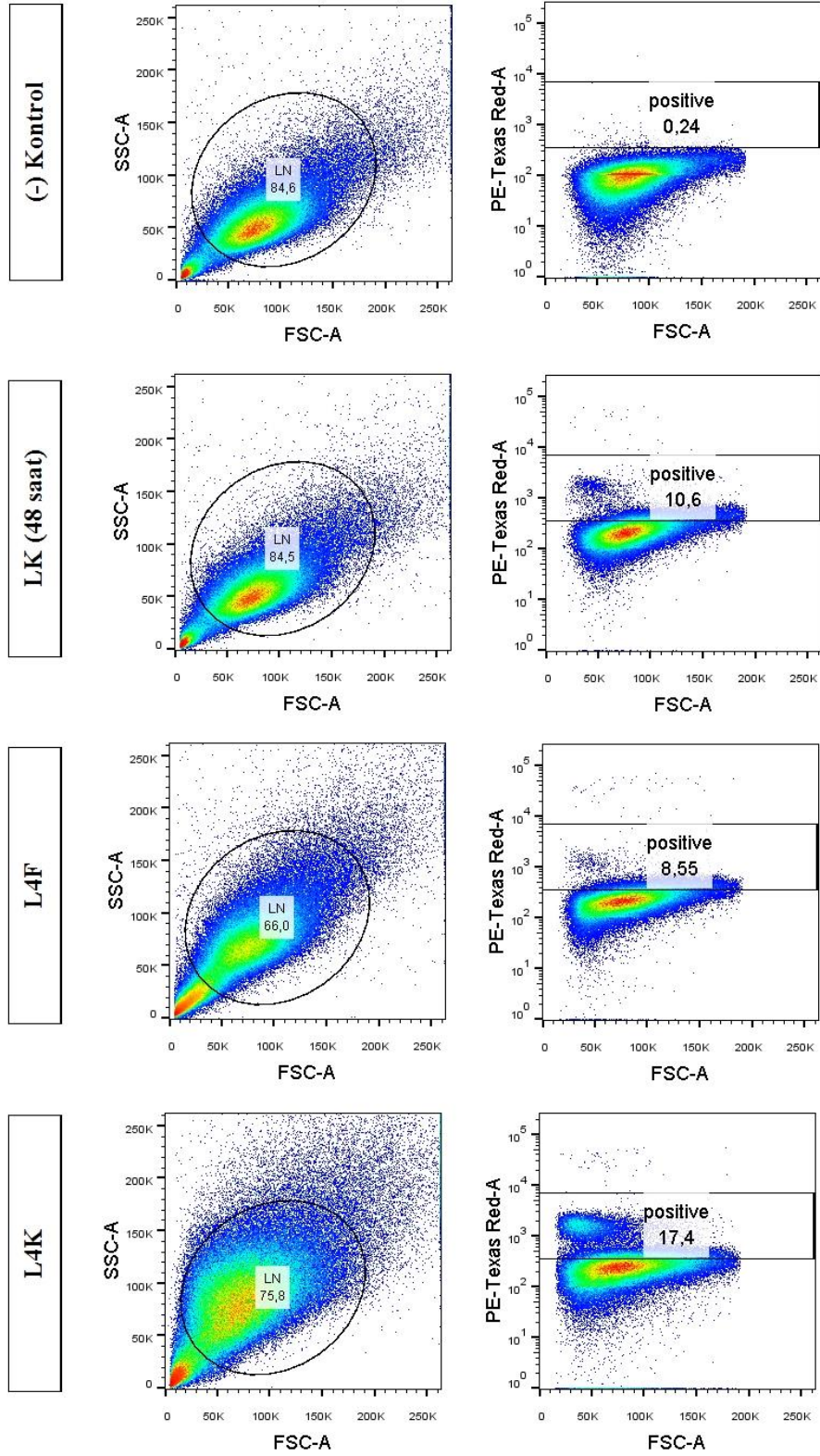
2D ve 3D kültür modelinde LNCaP ve PC3 hücrelerine 24 ve 48 saat kemoterapötik uygulamalarına ait akış sitometri grafikleri elde edildi (Şekil 6.16, Şekil 6.17, Şekil 6.18, Şekil 6.19, Şekil 6.20, Şekil 6.21, Şekil 6.22, Şekil 6.23).

PC3 ve LNCaP hücrelerine kemoterapötik uygulandığında proliferasyon yüzdesindeki değişimin anlaşılabilmesi için örnek grupları ile kontrol grupları arasındaki fark hesaplandı. Kemoterapötik uygulanmayan kontrol gruplarından kemoterapötik uygulanan gruplara ait proliferasyon yüzdesi çıkarılarak kontrol grubu değerlerine oranlandığında elde edilen değer, örnek gruplarında proliferasyonun azalma yüzdesi olarak belirlendi.

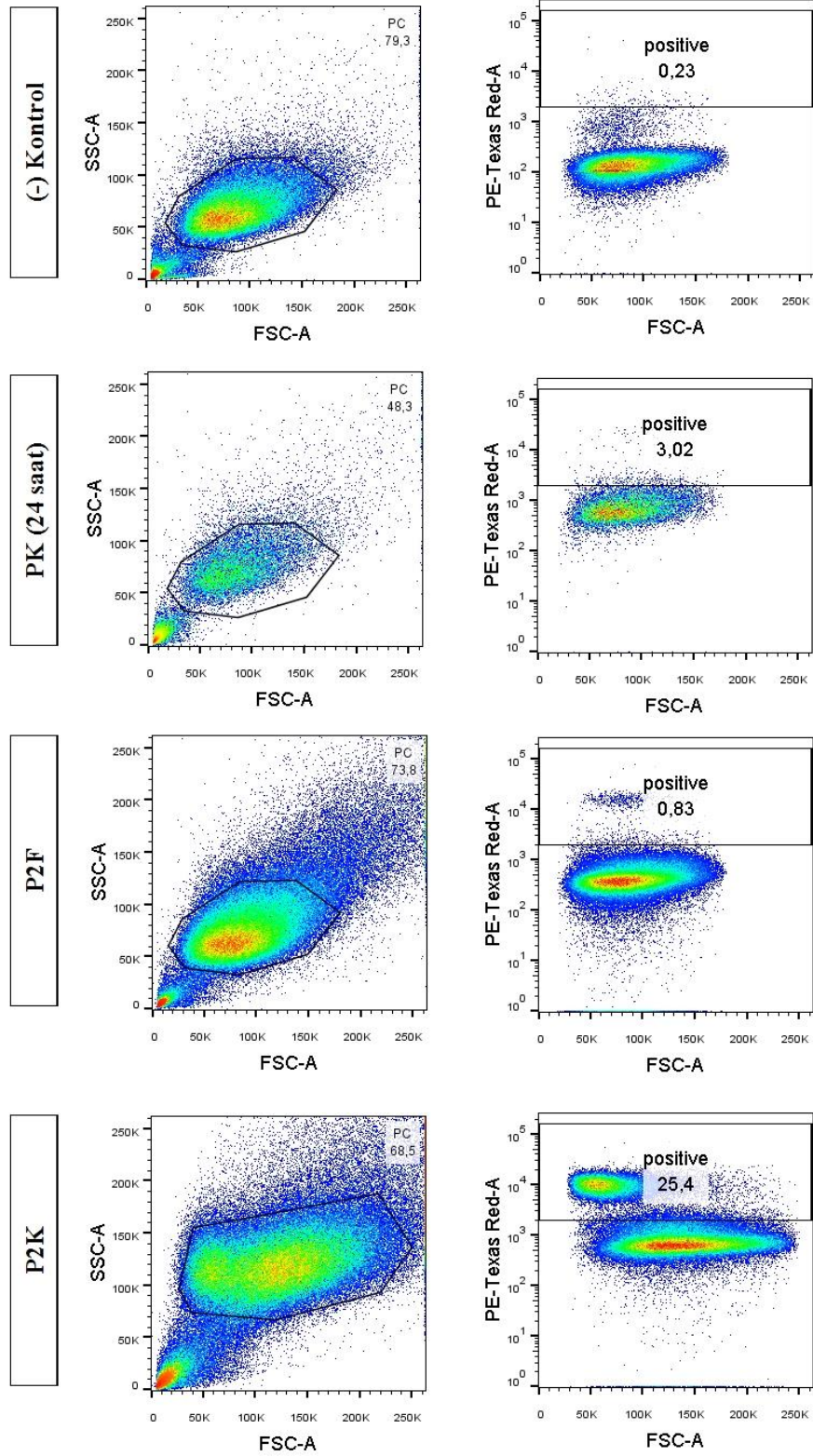
Proliferasyonun 2D kültür modelinde L2F grubunda %52,9, L4F grubunda %19,3, P2F grubunda %72,5 ve P4F grubunda %56,9 azaldığı görüldü. 3D kültür modelinde ise, örnekler kemoterapötik uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında proliferasyonun L2F grubunda %98, L4F grubunda %84,8, P2F grubunda %80 ve P4F grubunda %47,9 oranında azaldığı görüldü (Tablo 6.3). Uygulanan FBA'nın 3D modelde %80'in üzerinde proliferasyon inhibisyonuna sebep olduğu dikkat çekmektedir. 2D modelde ise oran %72'yi geçmemektedir. Kolşisin uygulanan 2D ve 3D örneklerin analizlerinde proliferasyon artışı olduğu yönünde değerler görülmektedir. Bu durumun kolşisinin hücrelerde oluşturduğu kompensatuar etkiden dolayı olabileceği düşünülmektedir (149).



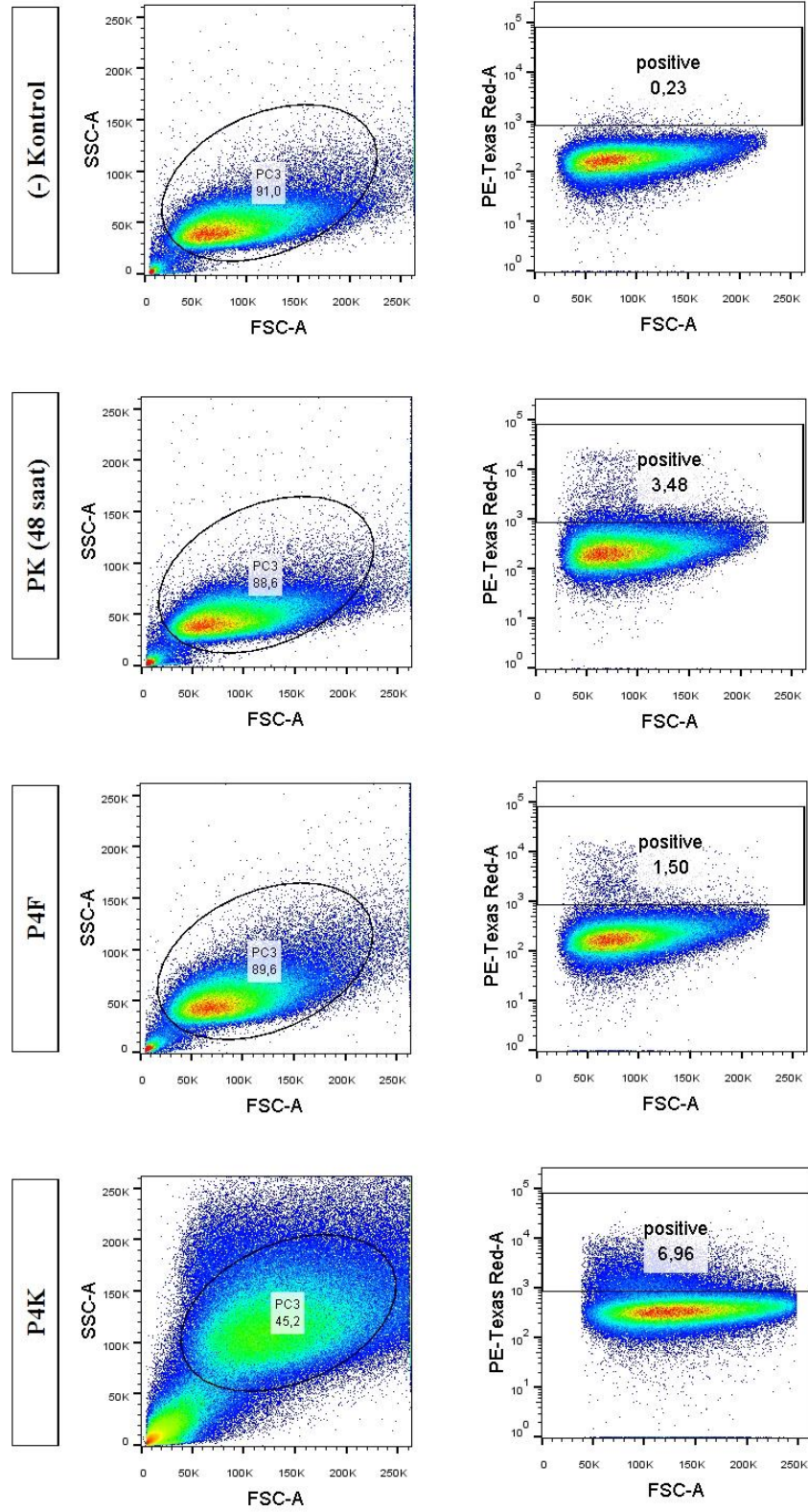
Şekil 6.16 2D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri



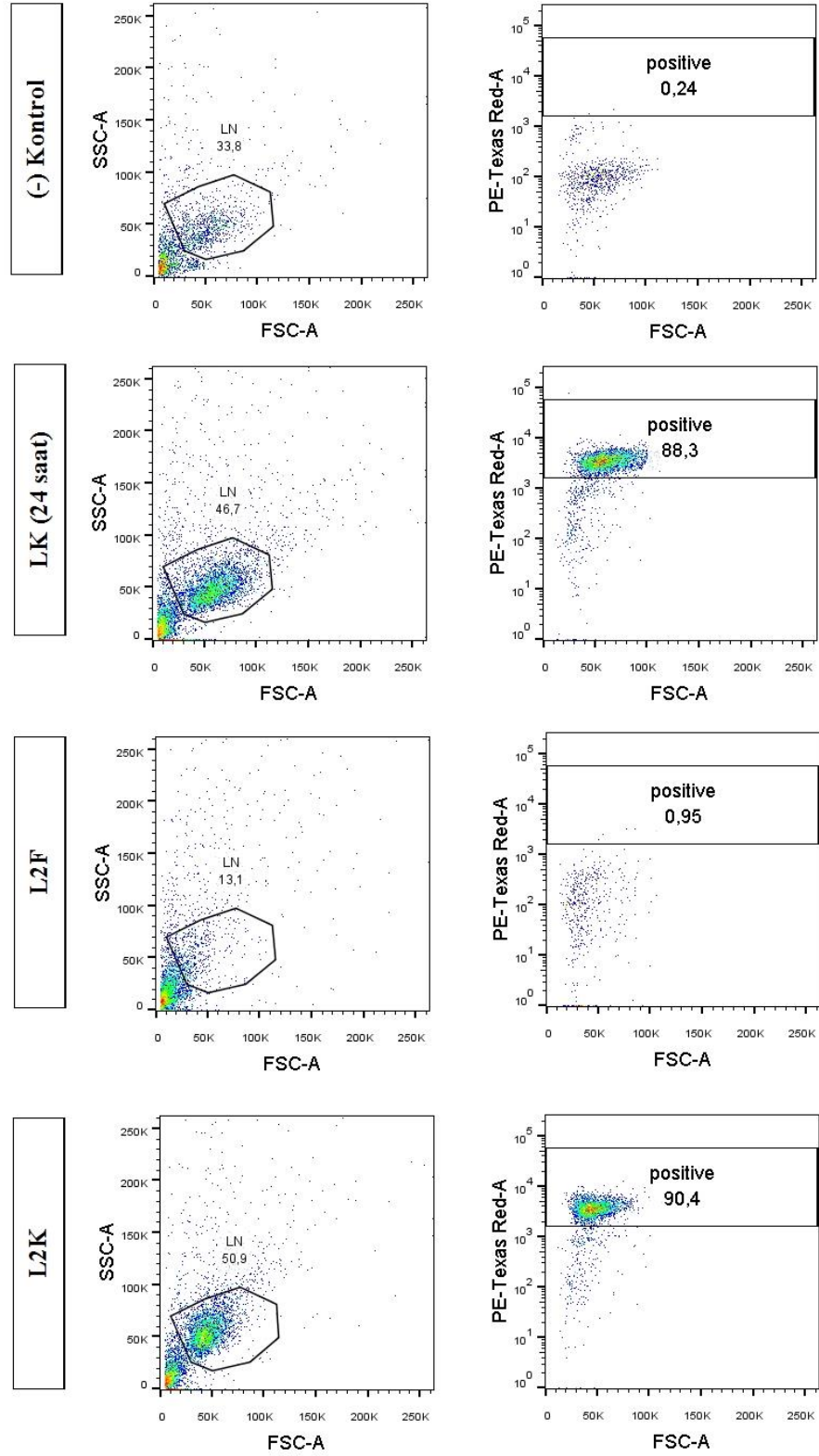
Şekil 6.17 2D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri



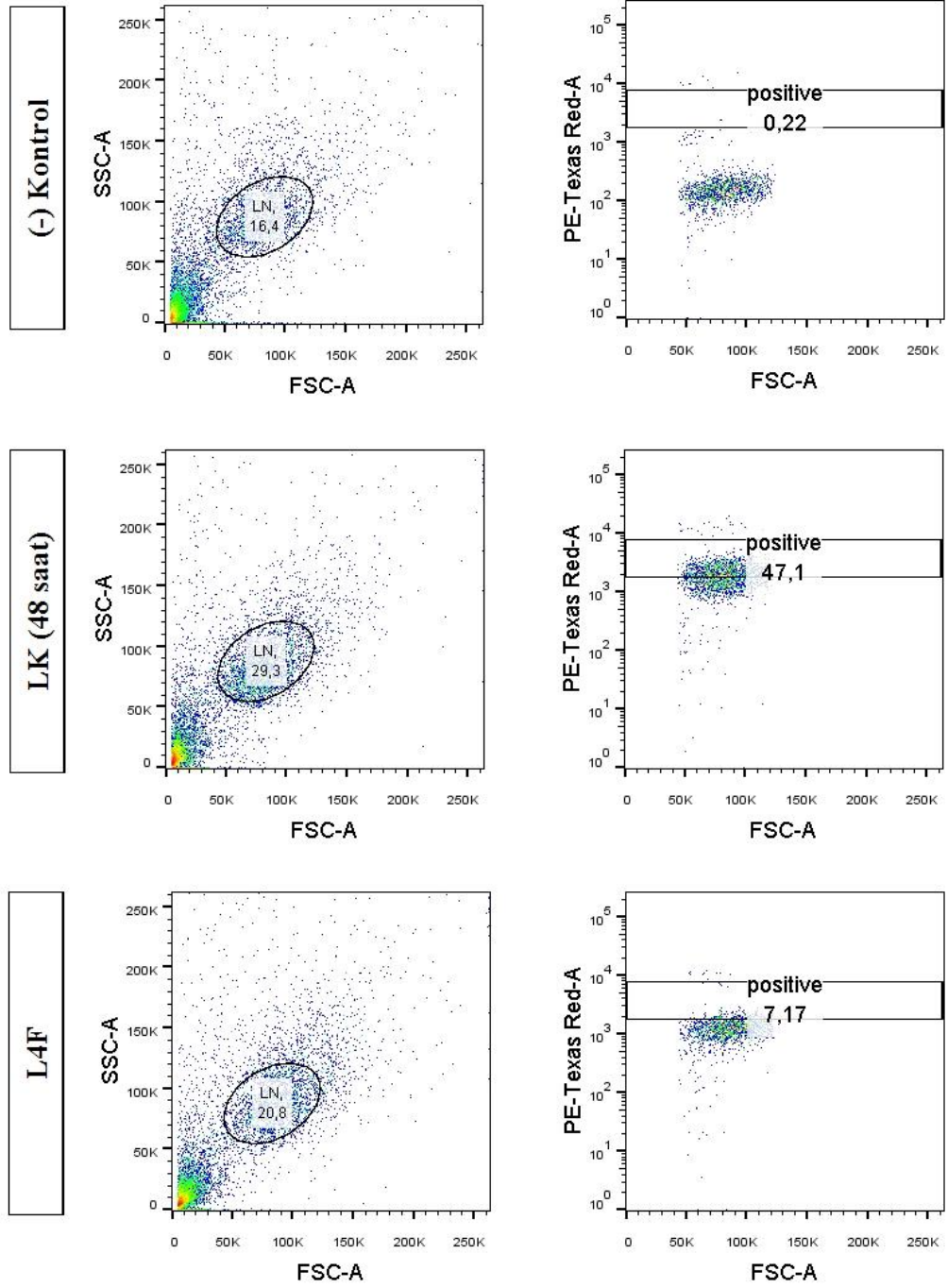
Şekil 6.18 2D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri



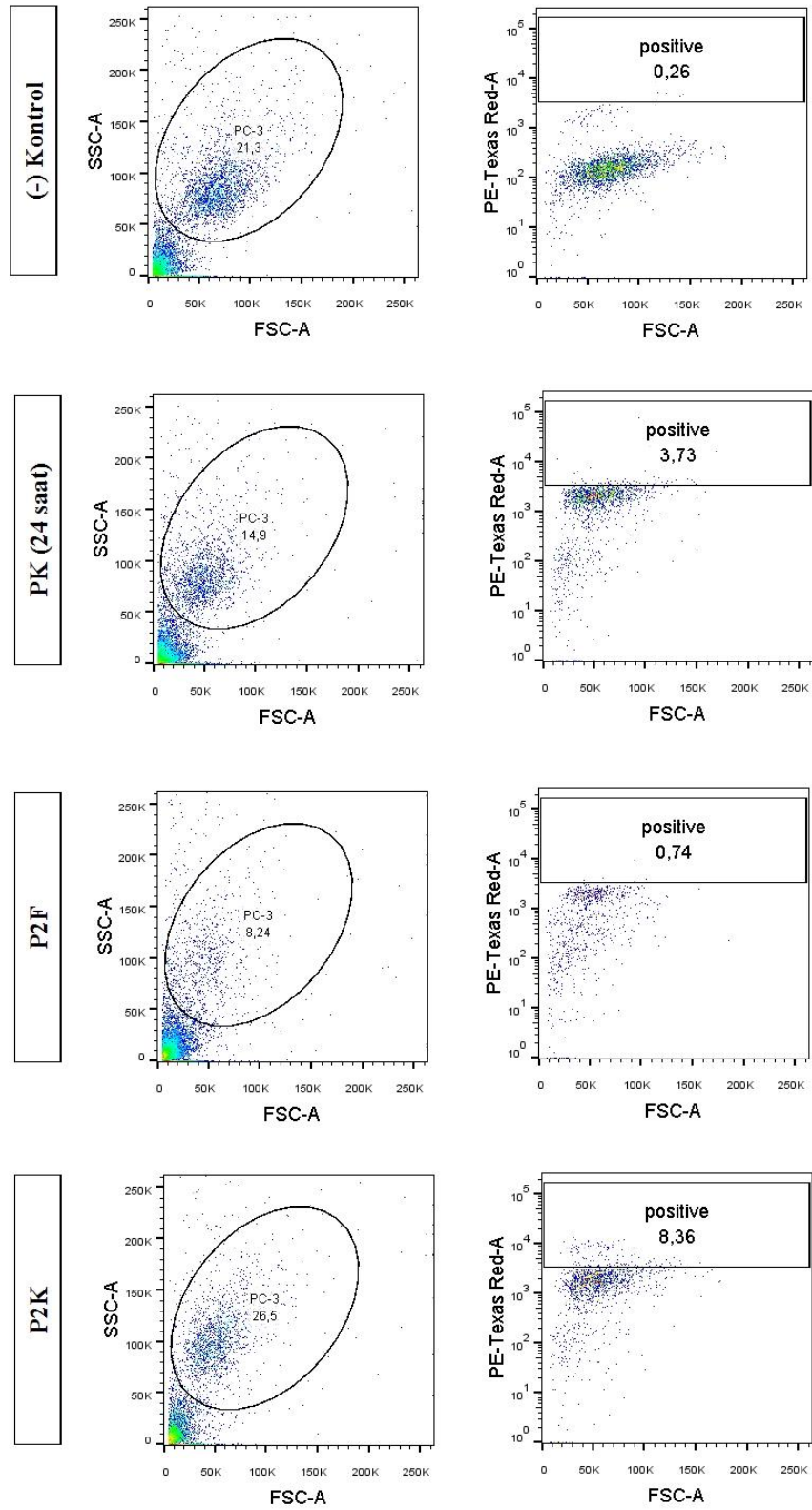
Şekil 6.19 2D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri



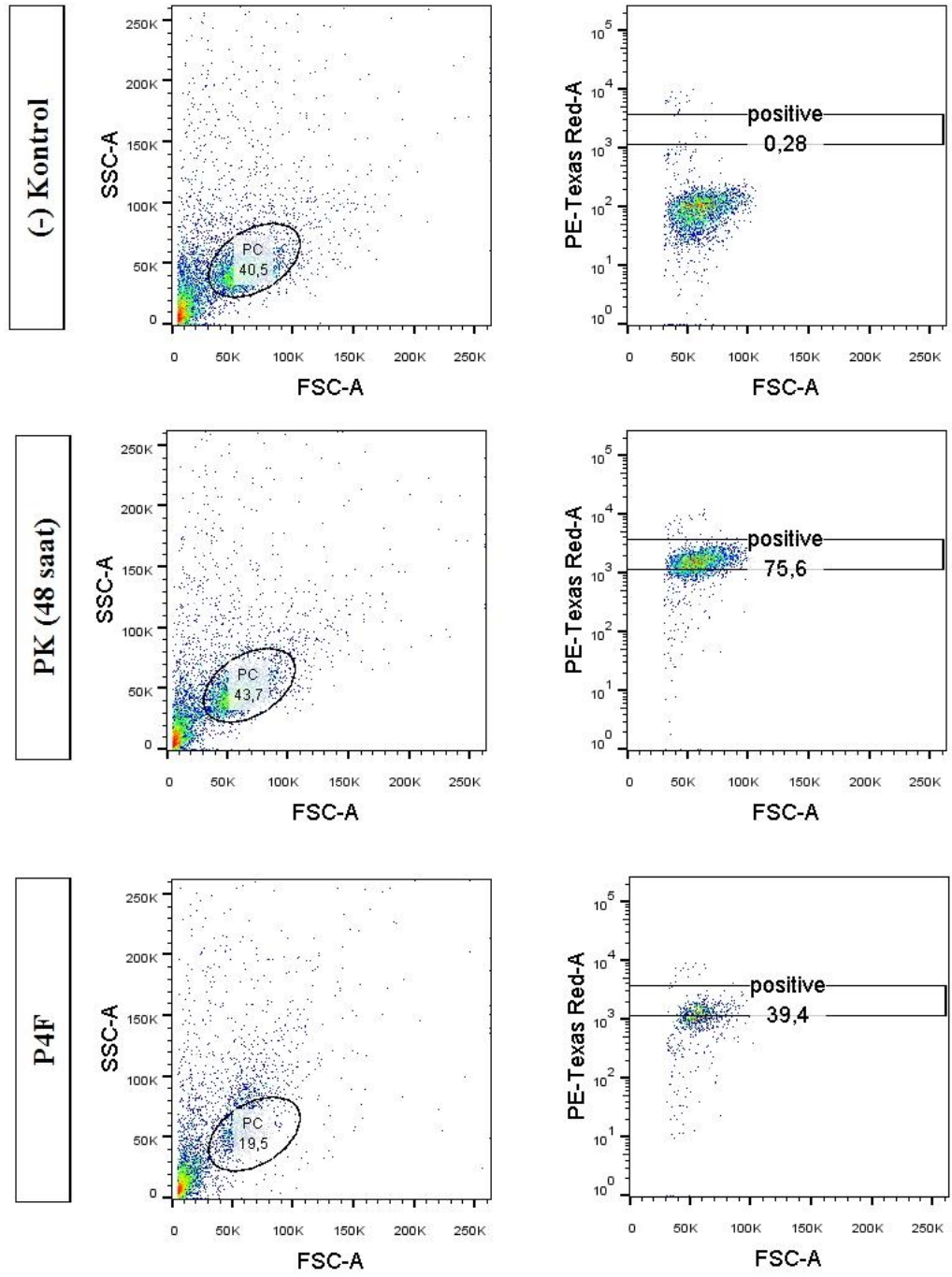
Şekil 6.20 3D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri



Şekil 6.21 3D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP hücrelerinin akış sitometri analizleri



Şekil 6.22 3D kültür modelinde 24 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri



Şekil 6.23 3D kültür modelinde 48 saat kemoterapötik uygulanan PC3 hücrelerinin akış sitometri analizleri

Tablo 6.3 Kontrole kıyasla gruplardaki proliferasyon yüzdelerinde azalma (%)

	L2F	L2K	L4F	L4K	P2F	P2K	P4F	P4K
2D	52,9	-64,5	19,3	-64,2	72,5	-2960,2	56,9	-100,0
3D	98,9	-2,4	84,8	-	80,2	-124,1	47,9	-

6.5. İmmünofloresan Analiz

2D kültür modelinde LNCaP ve PC3 hücrelerine 24 ve 48 saat kemoterapötik uygulamalarında ERK, JNK ve p38 immün işaretlemelerine ait floresan görüntüler elde edildi (Şekil 6.24, Şekil 6.25, Şekil 6.26, Şekil 6.27, Şekil 6.28, Şekil 6.29, Şekil 6.30, Şekil 6.31, Şekil 6.32, Şekil 6.33, Şekil 6.34, Şekil 6.35, Şekil 6.36, Şekil 6.37, Şekil 6.38, Şekil 6.39, Şekil 6.40, Şekil 6.41).

3D kültür modelinde 24 ve 48 saat kemoterapötik uygulanan LNCaP ve PC3 hücrelerinde ERK, JNK ve p38 immün işaretlemelerine ait floresan görüntüler elde edildi (Şekil 6.42, Şekil 6.43, Şekil 6.44, Şekil 6.45, Şekil 6.46, Şekil 6.47, Şekil 6.48, Şekil 6.49, Şekil 6.50, Şekil 6.51, Şekil 6.52, Şekil 6.53).

Yapılan immünofloresan intensite ölçümleri, sadece sekonder antikor uygulanan “negatif kontrol” örneklerine göre normalize edilerek istatistiksel olarak analiz edildi. 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde ERK ekspresyon oranında LK grubuna kıyasla L4F (p=0,021) ve L4K (p=0,013) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmektedir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; L4F’de (p=0,006) L2F’ye göre, L4K’da (p=0,004) L2F’ye göre, L4K’da (p=0,033) L2K’ya göre istatistiksel olarak ERK ekspresyon oranında azalma olduğu tespit edildi. 3D kültür modelinde ise ERK ekspresyon oranında LK grubuna kıyasla L2F (p=0,048) grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görülürken, L2K (p<0,0001) grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; L2F (p<0,0001) ve L4F’de (p<0,0001) L2K’ya göre ERK ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptandı (Şekil 6.54).

2D kültür modelinde PC3 hücrelerinde ERK ekspresyon oranında PK grubuna kıyasla P4K ($p=0,001$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; P4K'ya göre P2F ($p=0,04$), P2K ($p=0,021$) ve P4F ($p=0,004$) gruplarında ERK ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü. 3D kültür modelinde ise PC3 hücrelerinde ERK ekspresyon oranında PK grubuna kıyasla P2K ($p=0,009$) ve P4F ($p=0,0007$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; P2F'ye göre P2K ($p=0,01$) ve P4F ($p=0,007$) gruplarında, P2K'ya göre P4F'de ($p=0,01$) ERK ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu tespit edildi (Şekil 6.55).

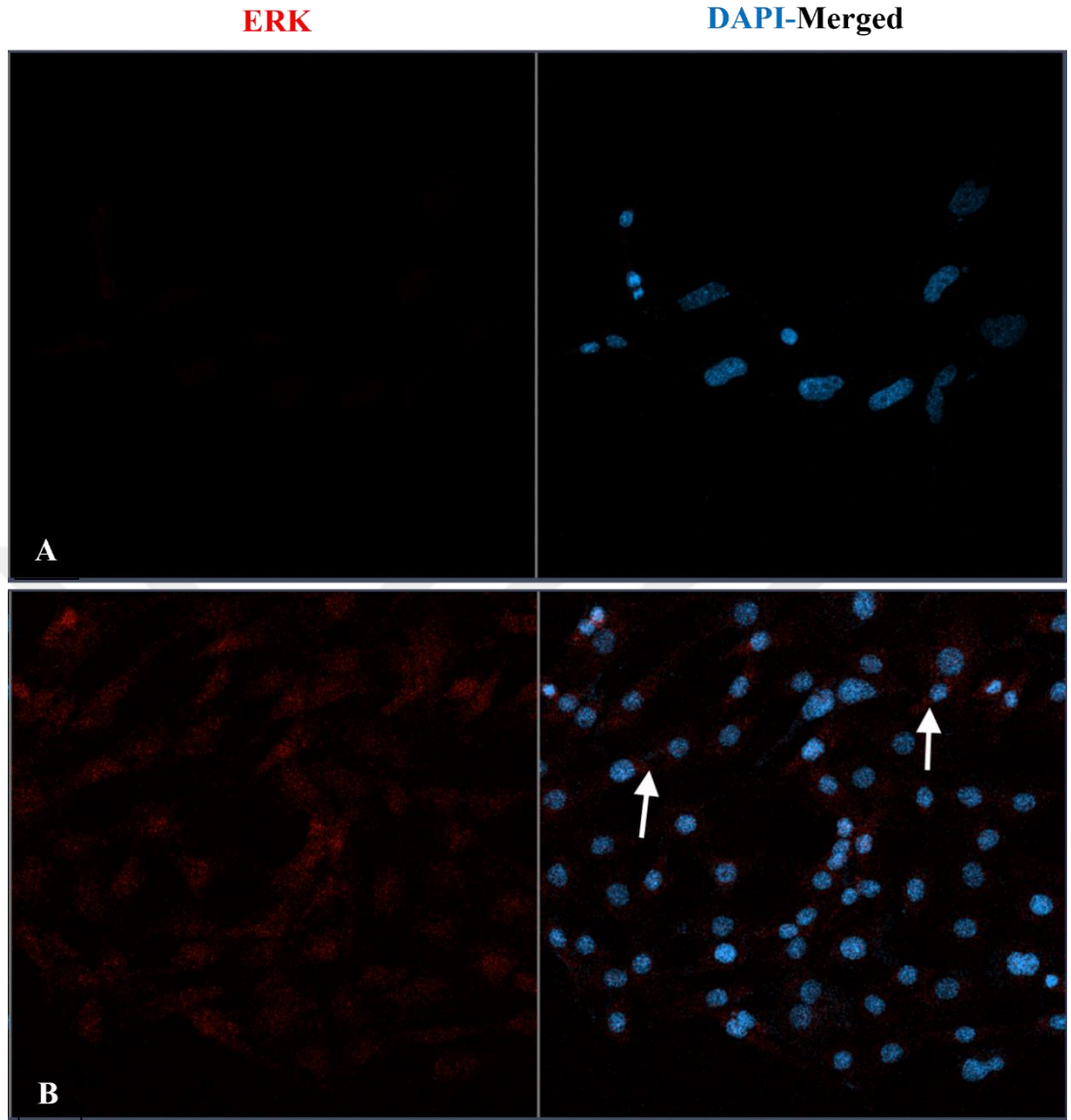
2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde JNK ekspresyon oranında LK grubuna kıyasla L2F ($p=0,018$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; L2F'ye göre L2K ($p=0,034$), L4F ($p=0,015$) ve L4K ($p=0,05$) gruplarında JNK ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edildi. 3D kültür modelinde ise JNK ekspresyon oranında LK grubuna kıyasla L2F ($p=0,005$) ve L2K ($p=0,03$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; L4F'ye göre L2F ($p=0,005$) ve L2K ($p=0,022$) gruplarında JNK ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü (Şekil 6.56).

2D kültür modelinde PC3 hücrelerinde JNK ekspresyon oranında PK grubuna kıyasla P2F ($p=0,015$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; P2F'ye göre P2K ($p=0,006$), P4F ($p=0,037$) ve P4K ($p=0,013$) gruplarında JNK ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. 3D kültür modelinde ise JNK ekspresyon oranında PK grubuna kıyasla P2K ($p=0,012$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; P2K'ya göre P2F ($p=0,021$) ve P4F'de ($p=0,004$) JNK ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı (Şekil 6.57).

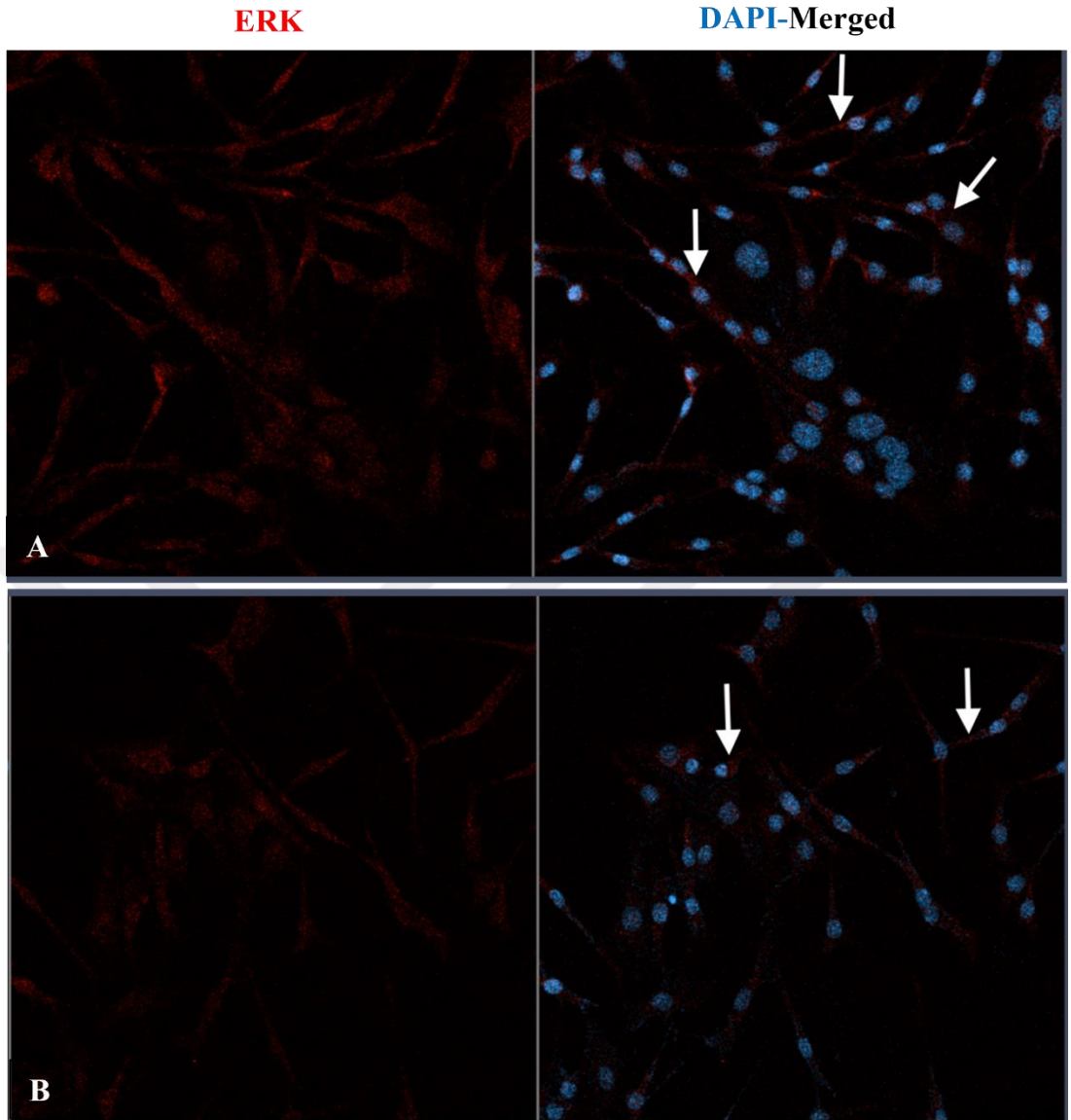
2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde p38 ekspresyon oranında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; L2F'ye ($p=0,021$) ve L2K'ya ($p=0,022$) göre

L4K'da p38 ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı. 3D kültür modelinde ise p38 ekspresyon oranında LK grubuna kıyasla L2F ($p=0,002$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; L2F'ye göre L2K'da ($p=0,001$) ve L4F'de ($p=0,002$) p38 ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (Şekil 6.58).

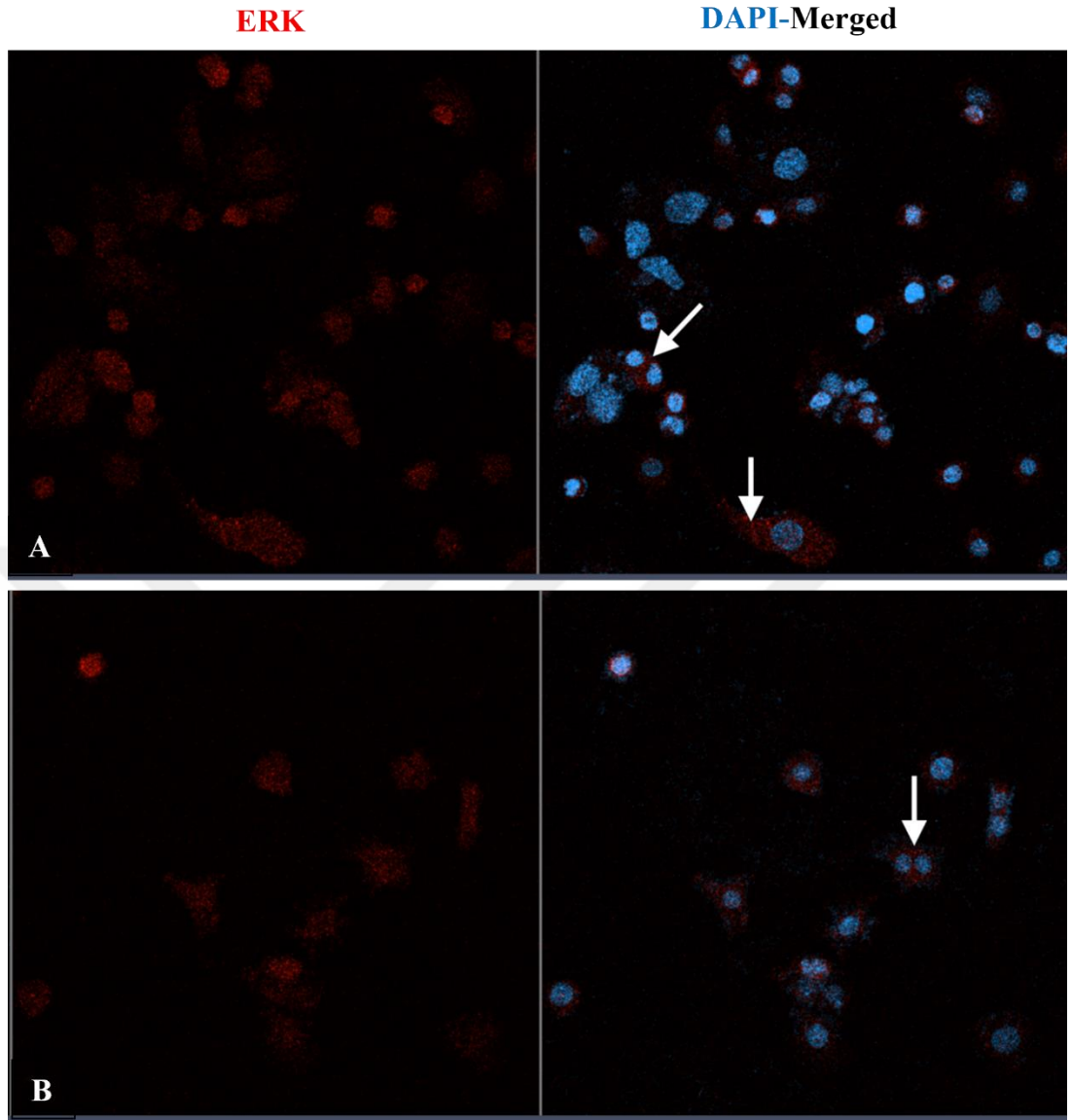
2D kültür modelinde PC3 hücrelerinde p38 ekspresyon oranında PK grubuna kıyasla P4F ($p=0,027$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; P2F'ye göre P2K ($p=0,017$), P4F ($p=0,006$) ve P4K ($p=0,023$) gruplarında p38 ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edildi. 3D kültür modelinde ise p38 ekspresyon oranında PK grubuna kıyasla P2F ($p=0,0009$), P2K ($p=0,0002$) ve P4F ($p=0,0002$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada; P2F'ye göre P2K ($p=0,008$) ve P4F ($p=0,0002$) gruplarında p38 ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü (Şekil 6.59).



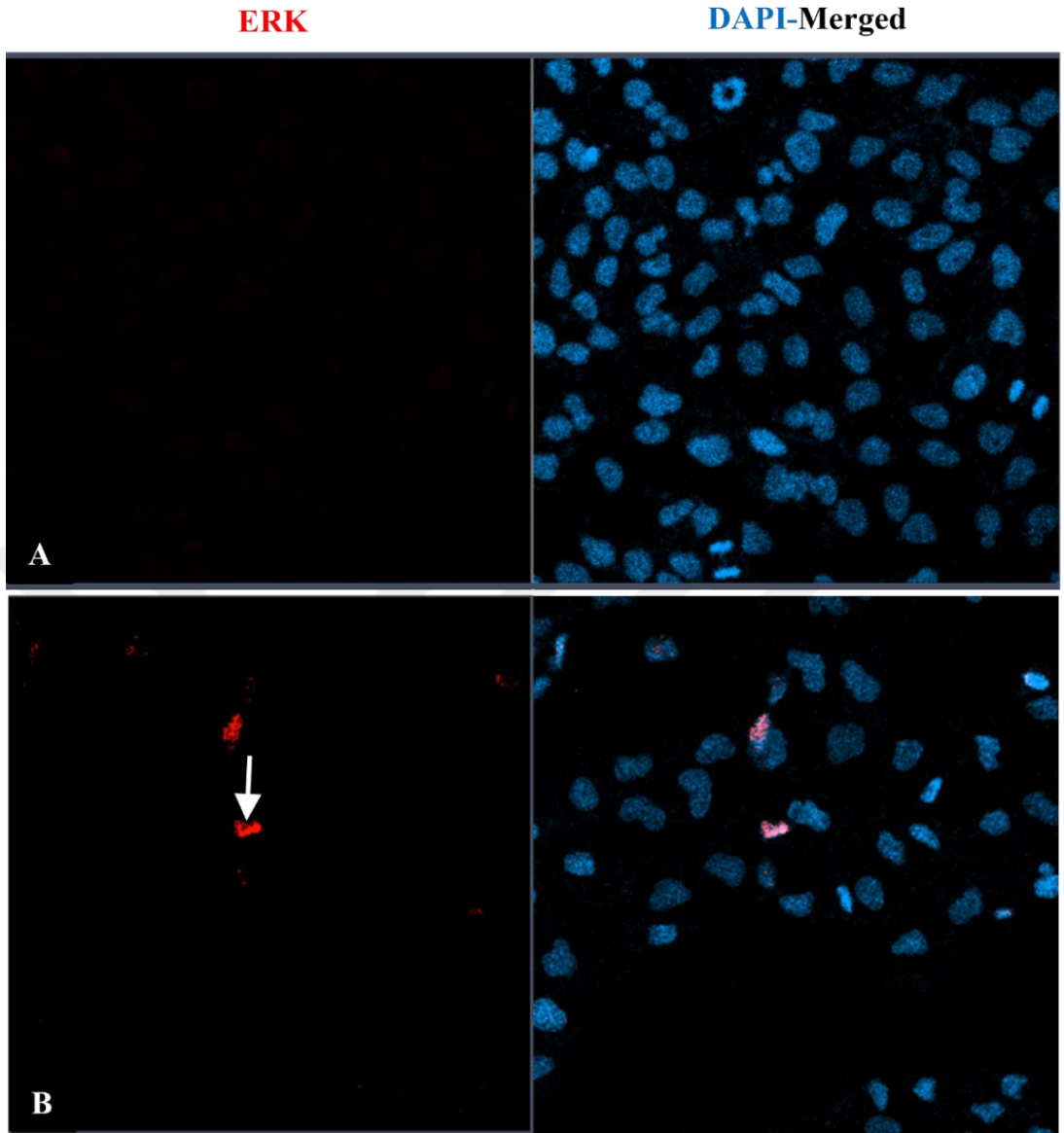
Şekil 6.24 ERK immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) LK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



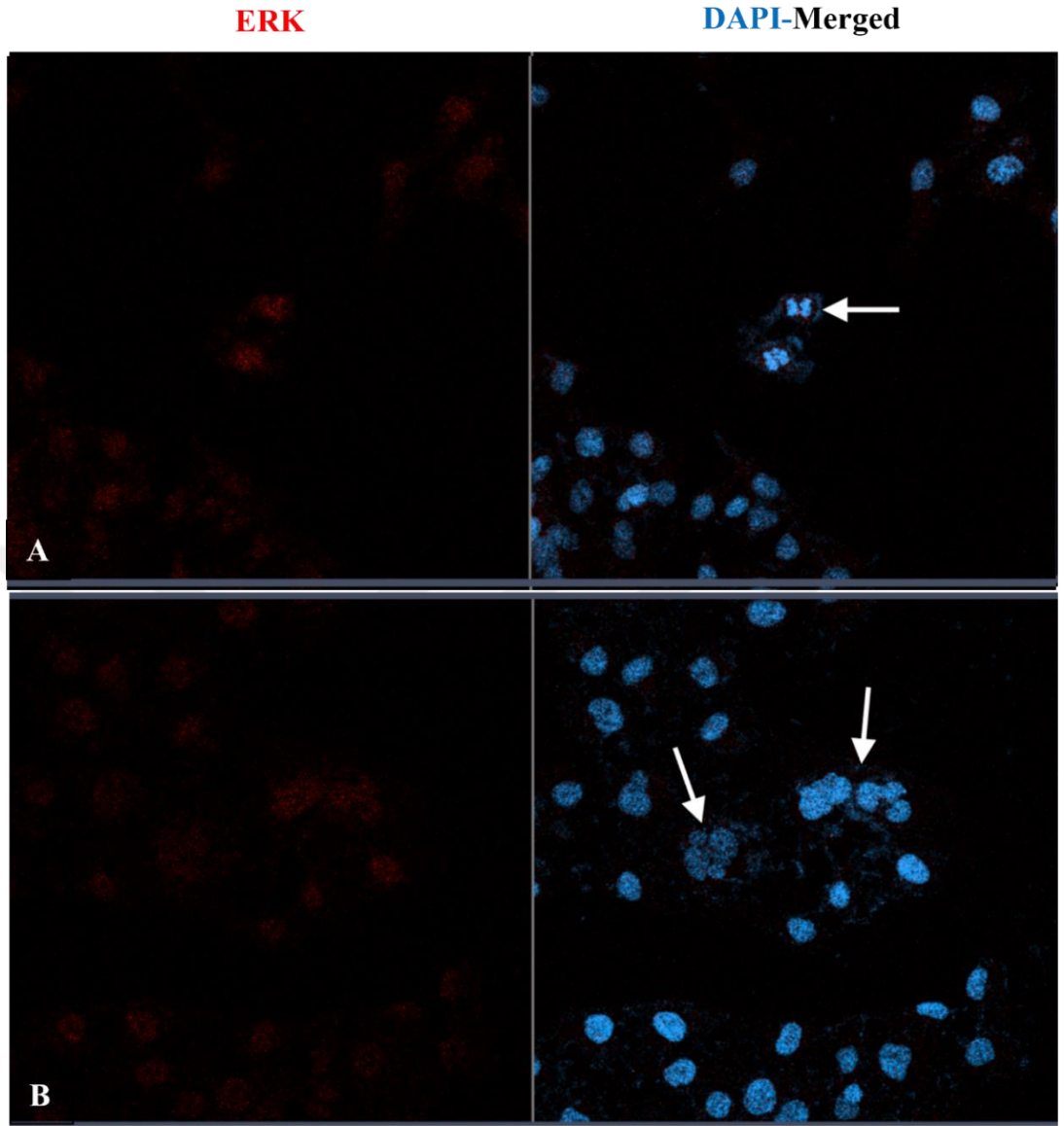
Şekil 6.25 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



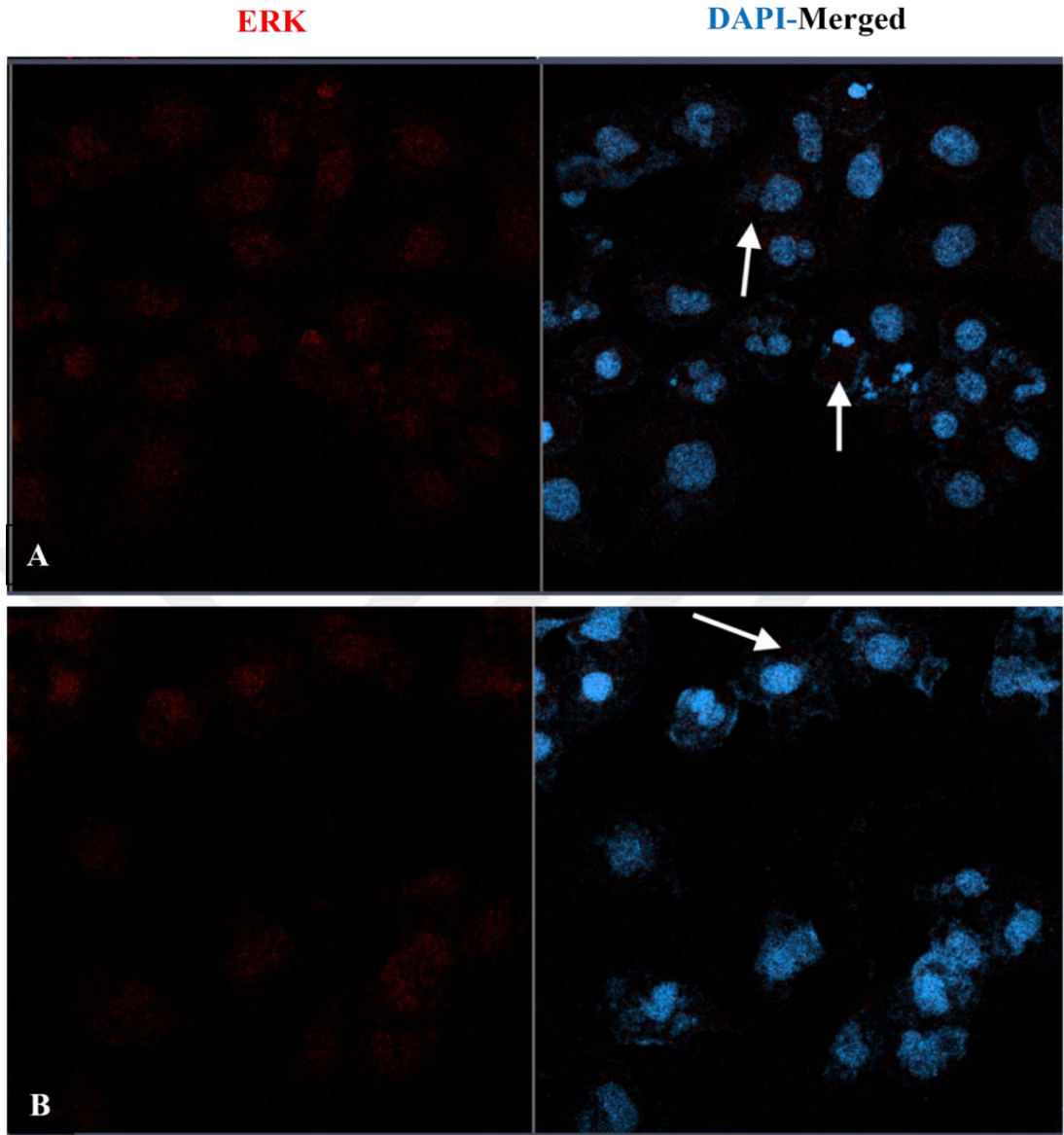
Şekil 6.26 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2K ve (B) L4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



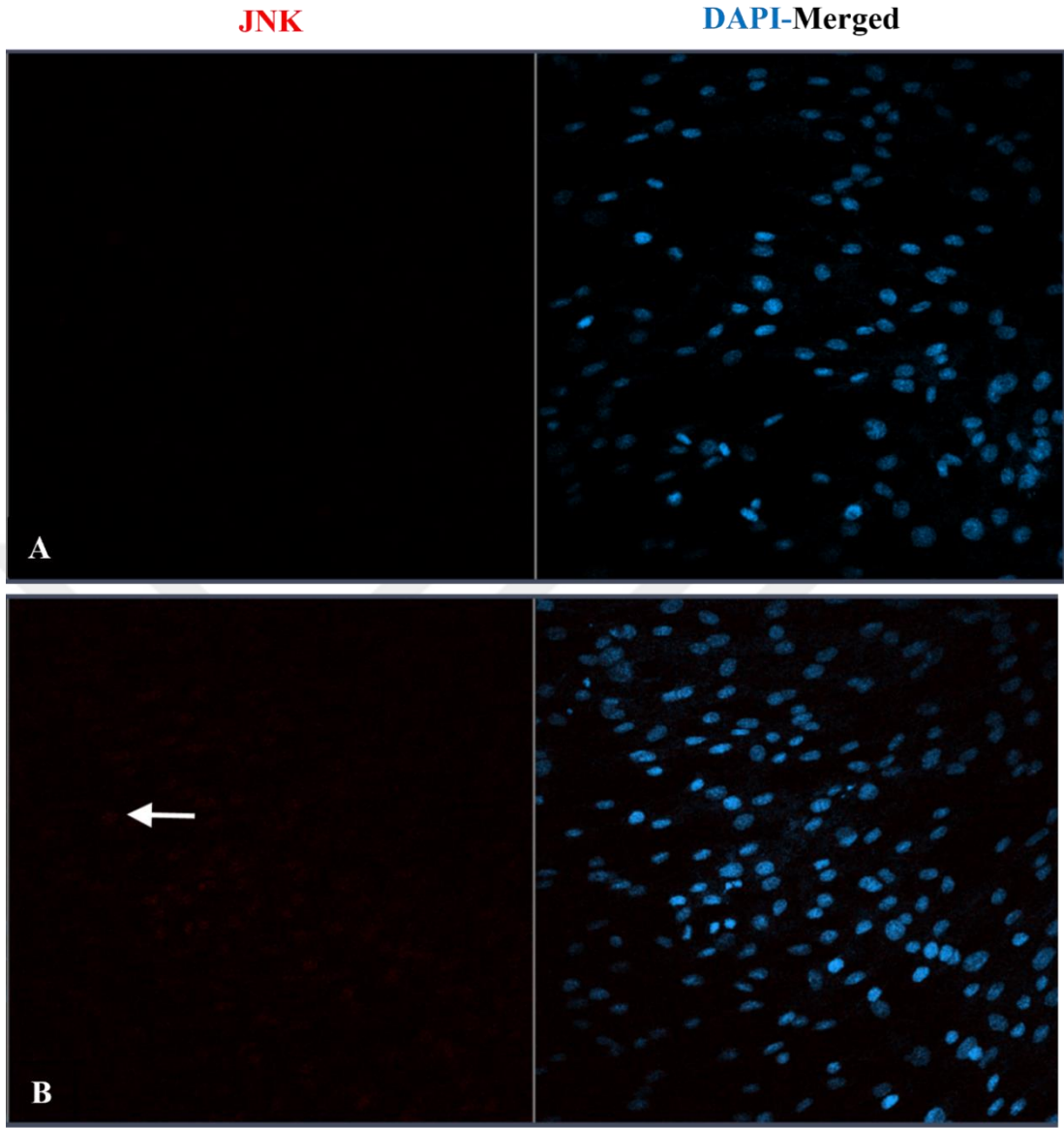
Şekil 6.27 ERK immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) PK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



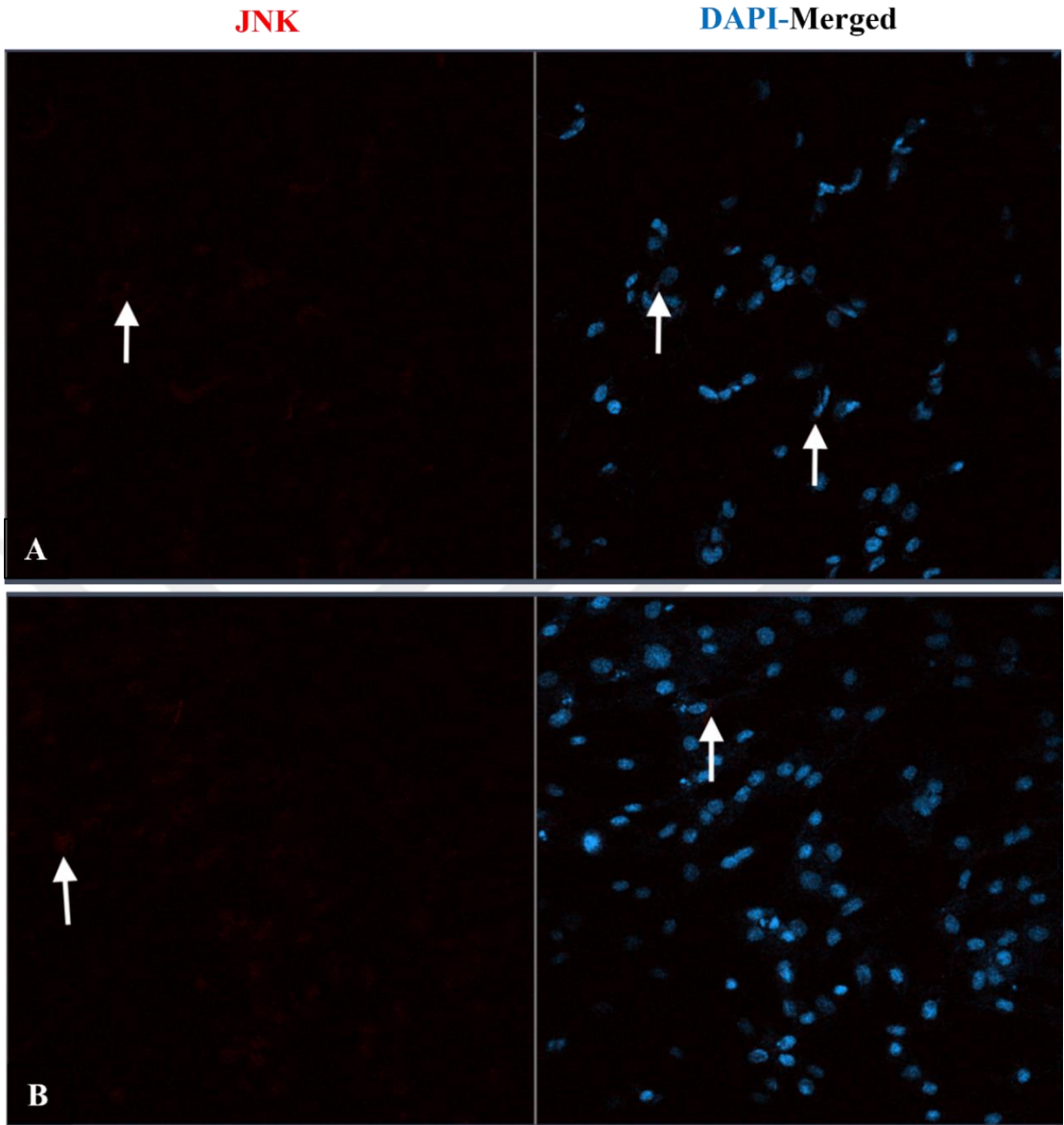
Şekil 6.28 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



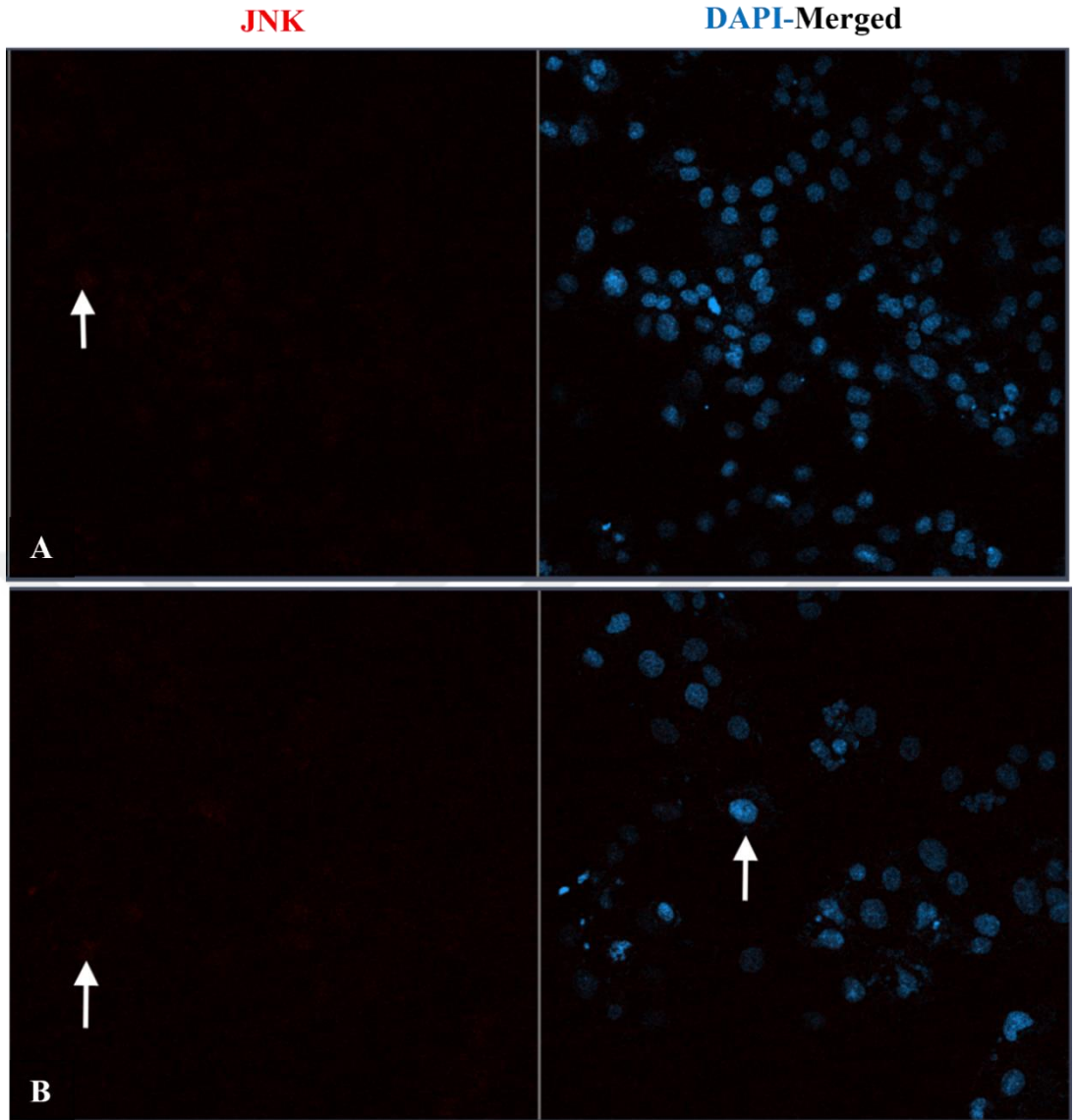
Şekil 6.29 ERK immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2K ve (B) P4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



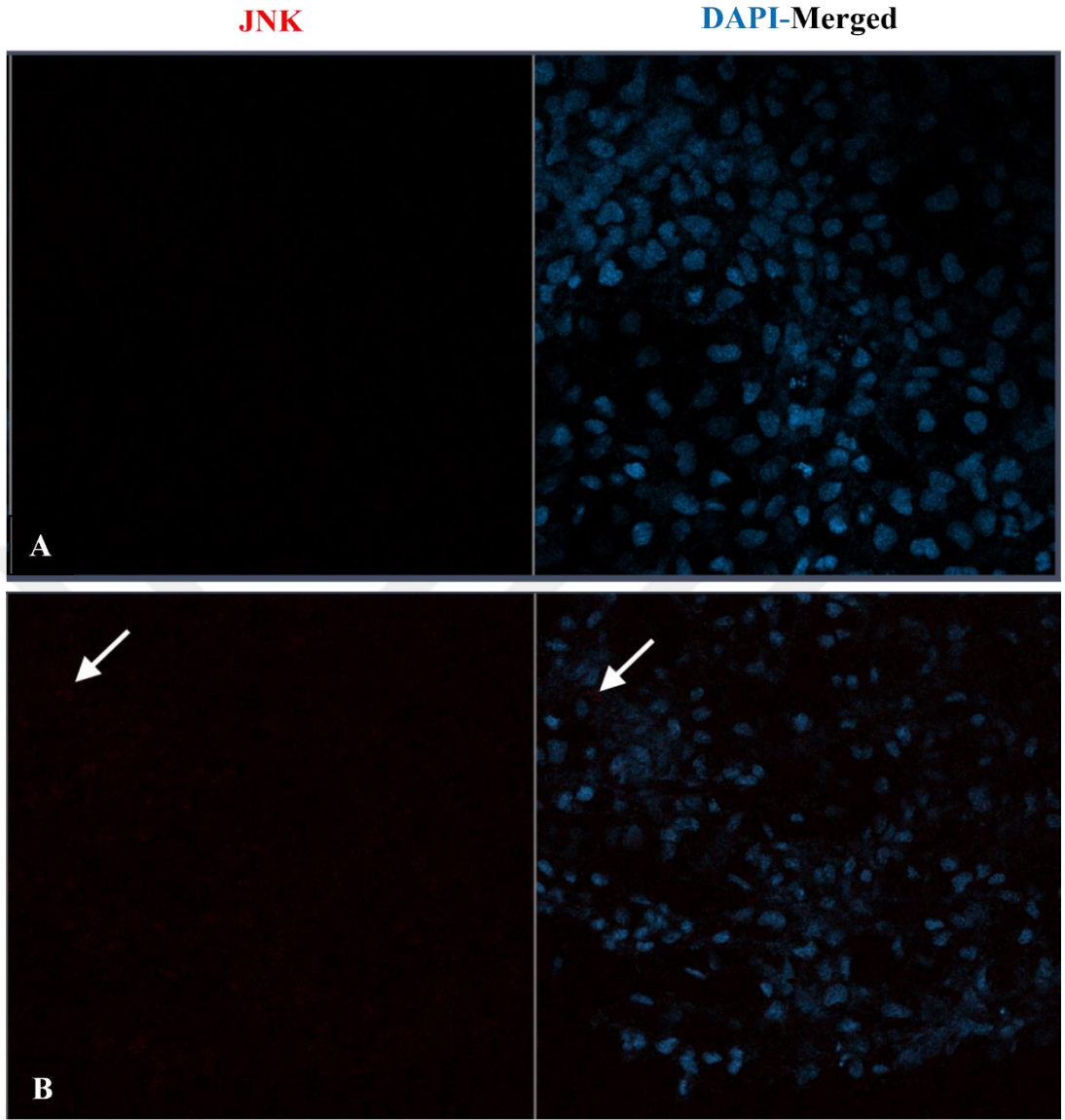
Şekil 6.30 JNK immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) LK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



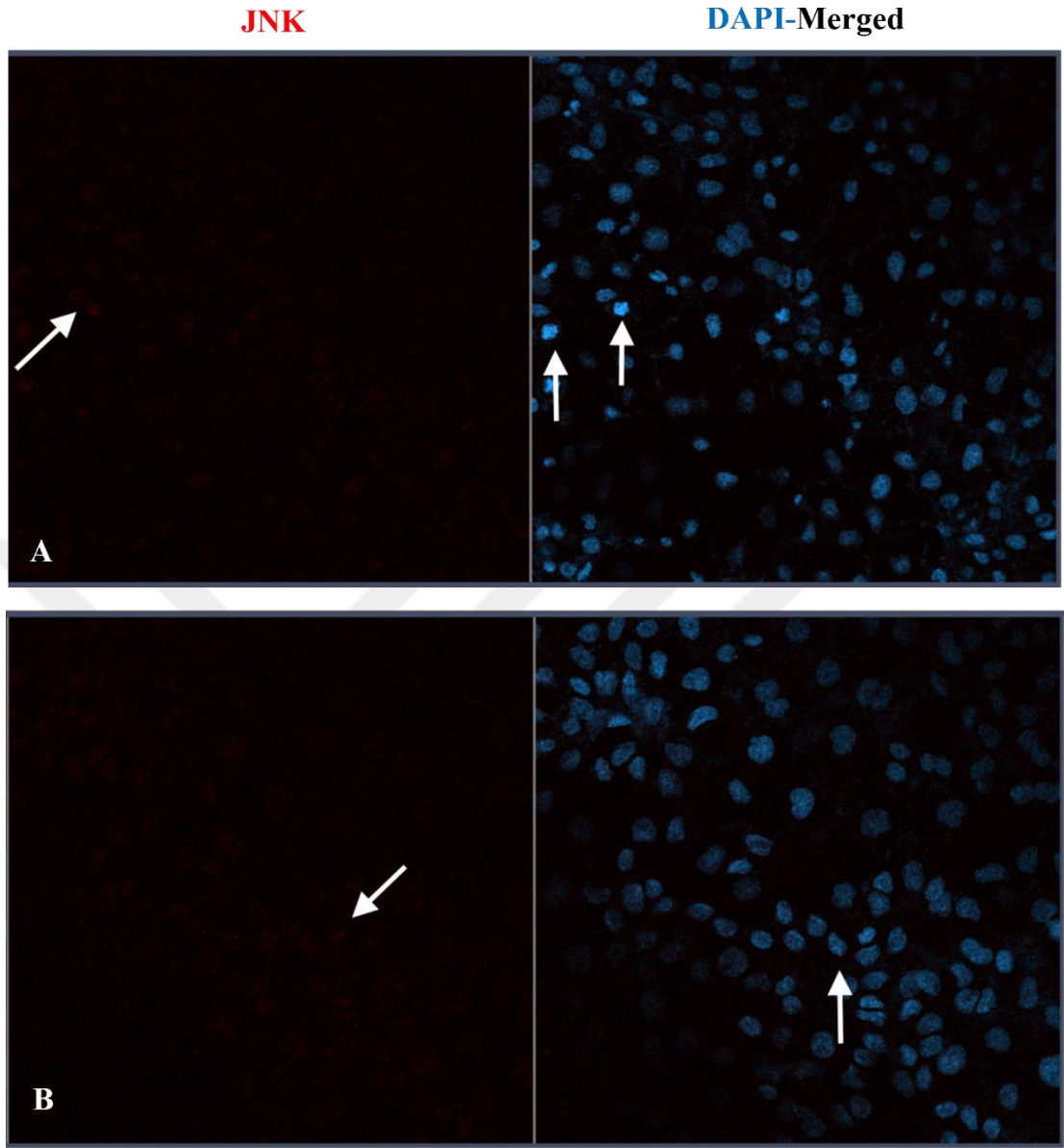
Şekil 6.31 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



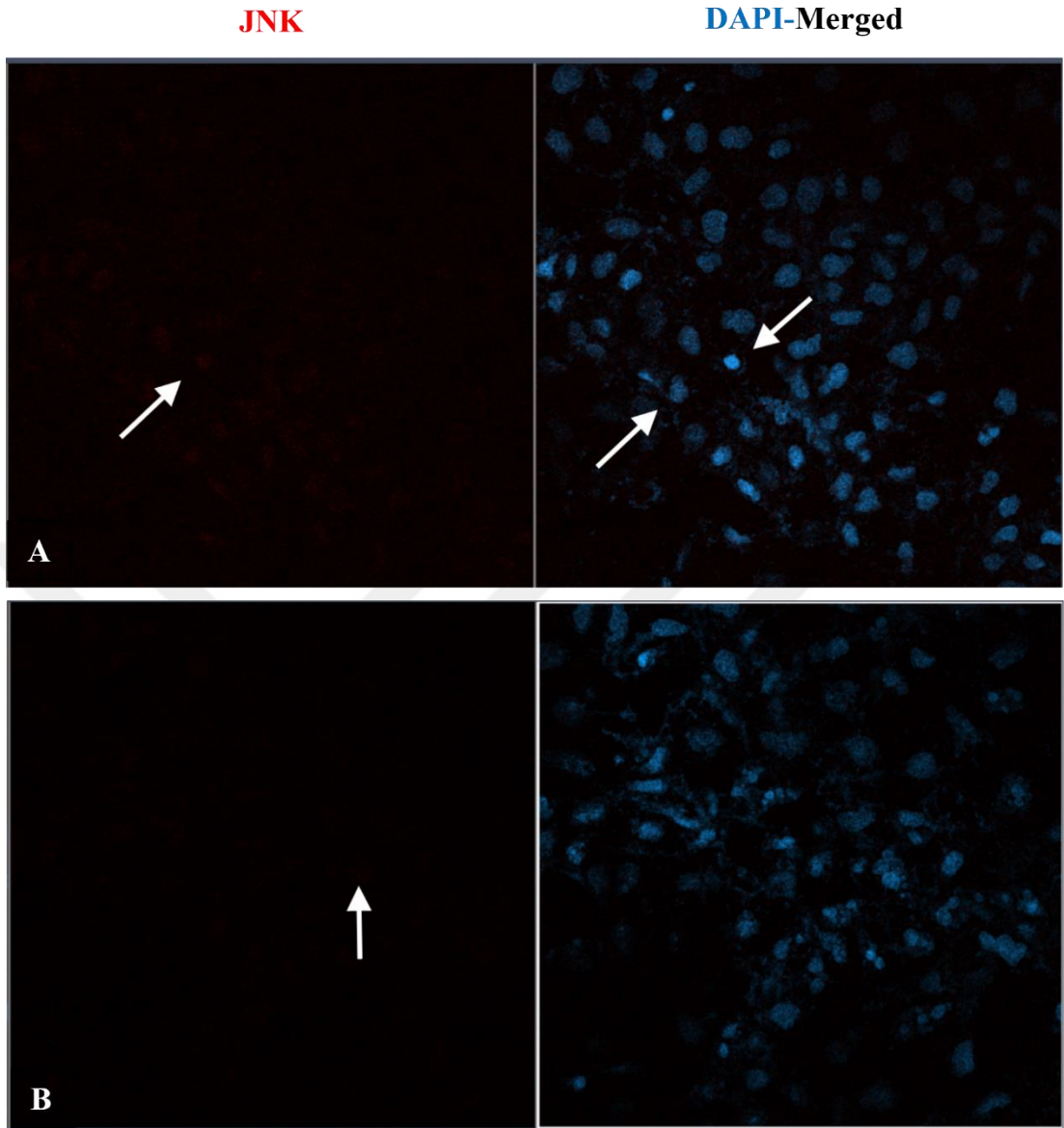
Şekil 6.32 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2K ve (B) L4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



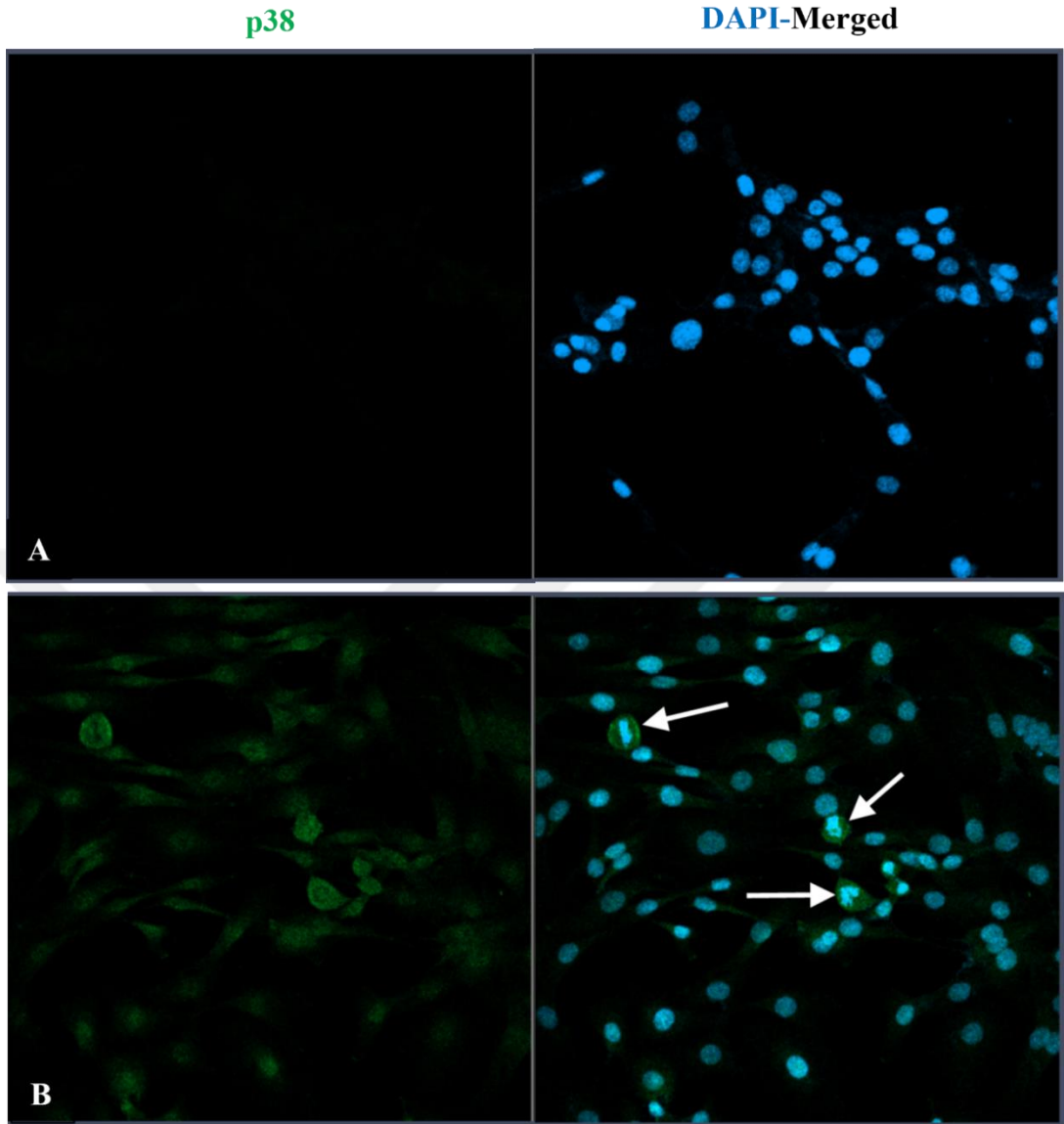
Şekil 6.33 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) PK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



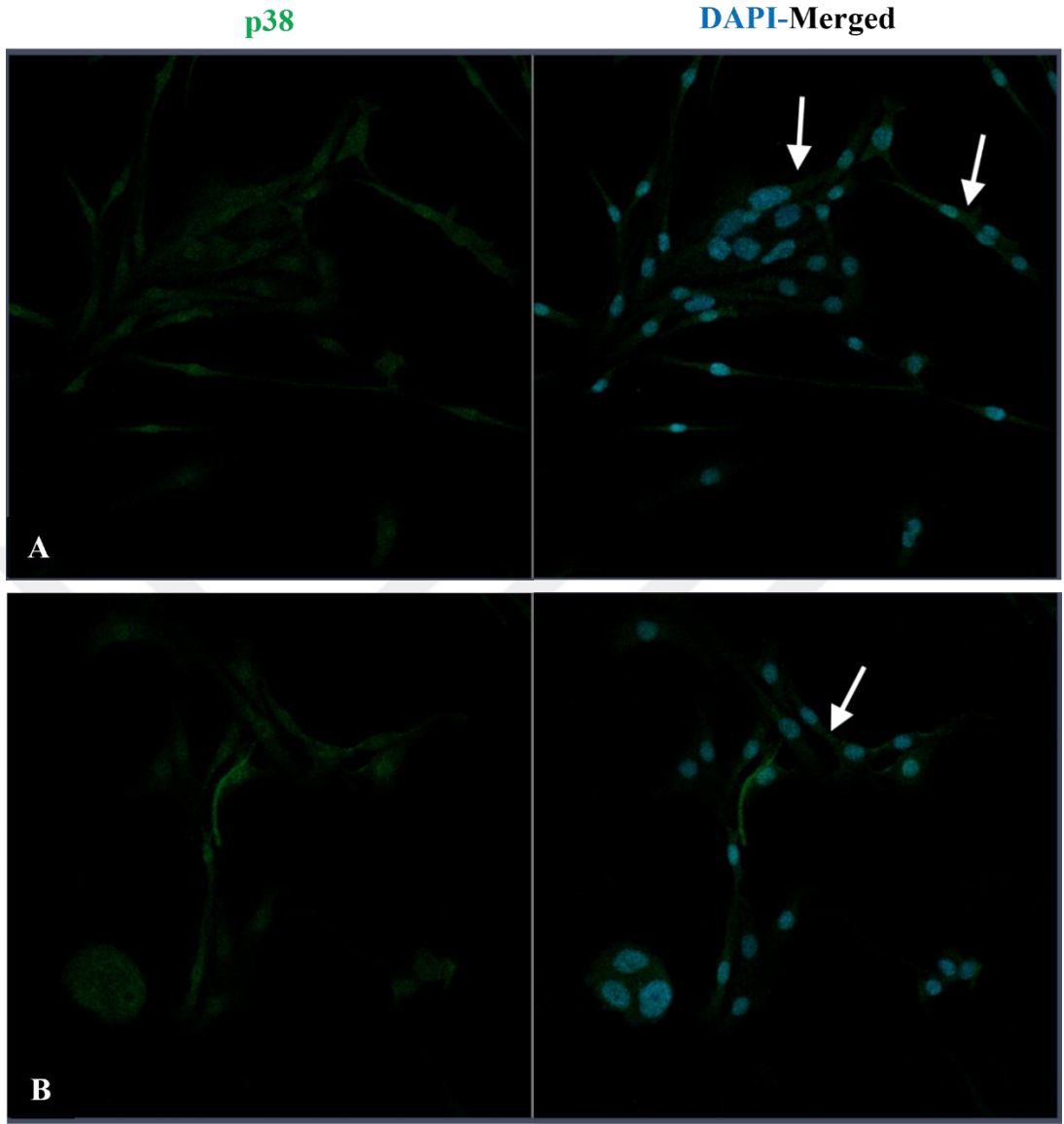
Şekil 6.34 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



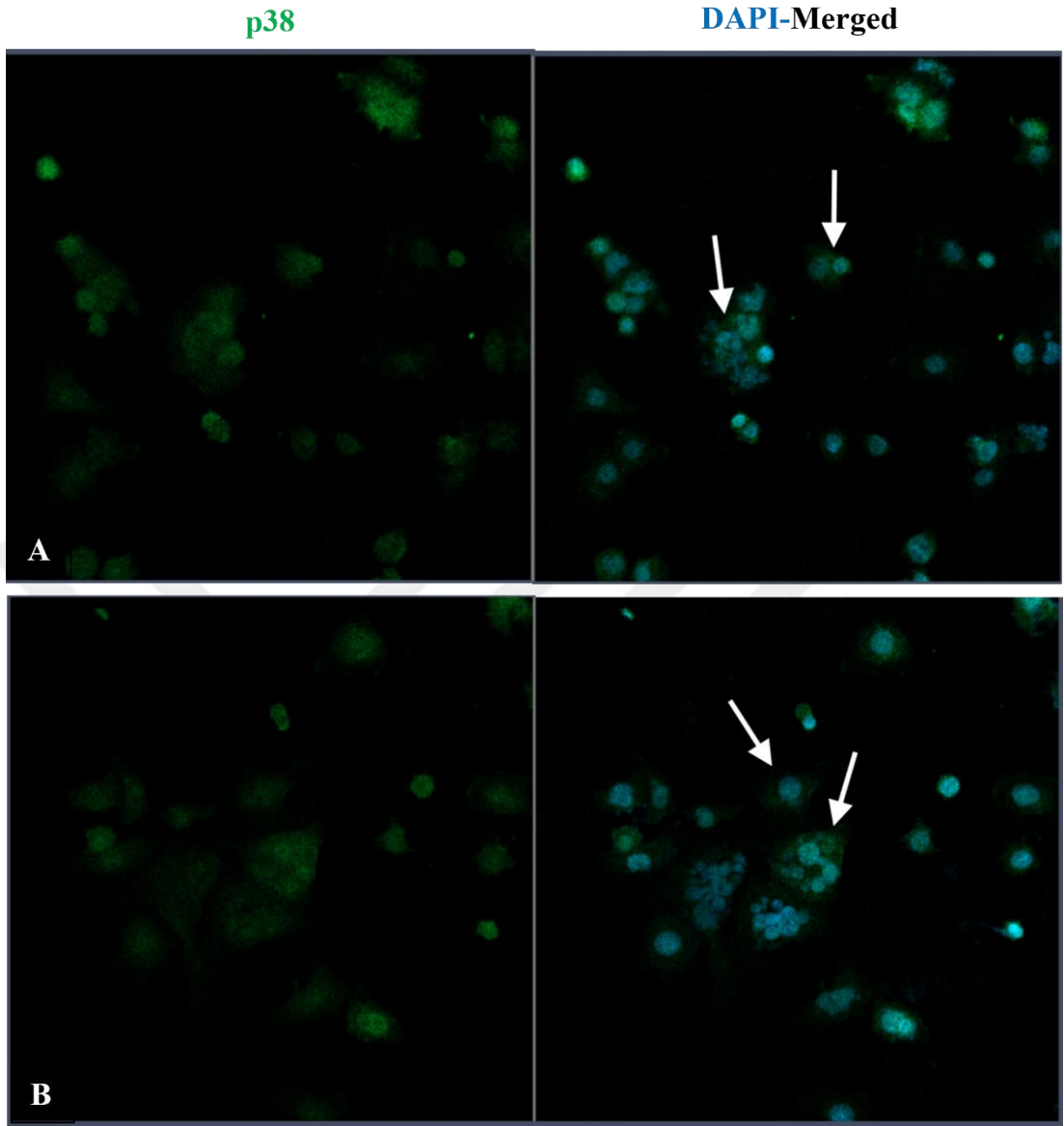
Şekil 6.35 JNK immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2K ve (B) P4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



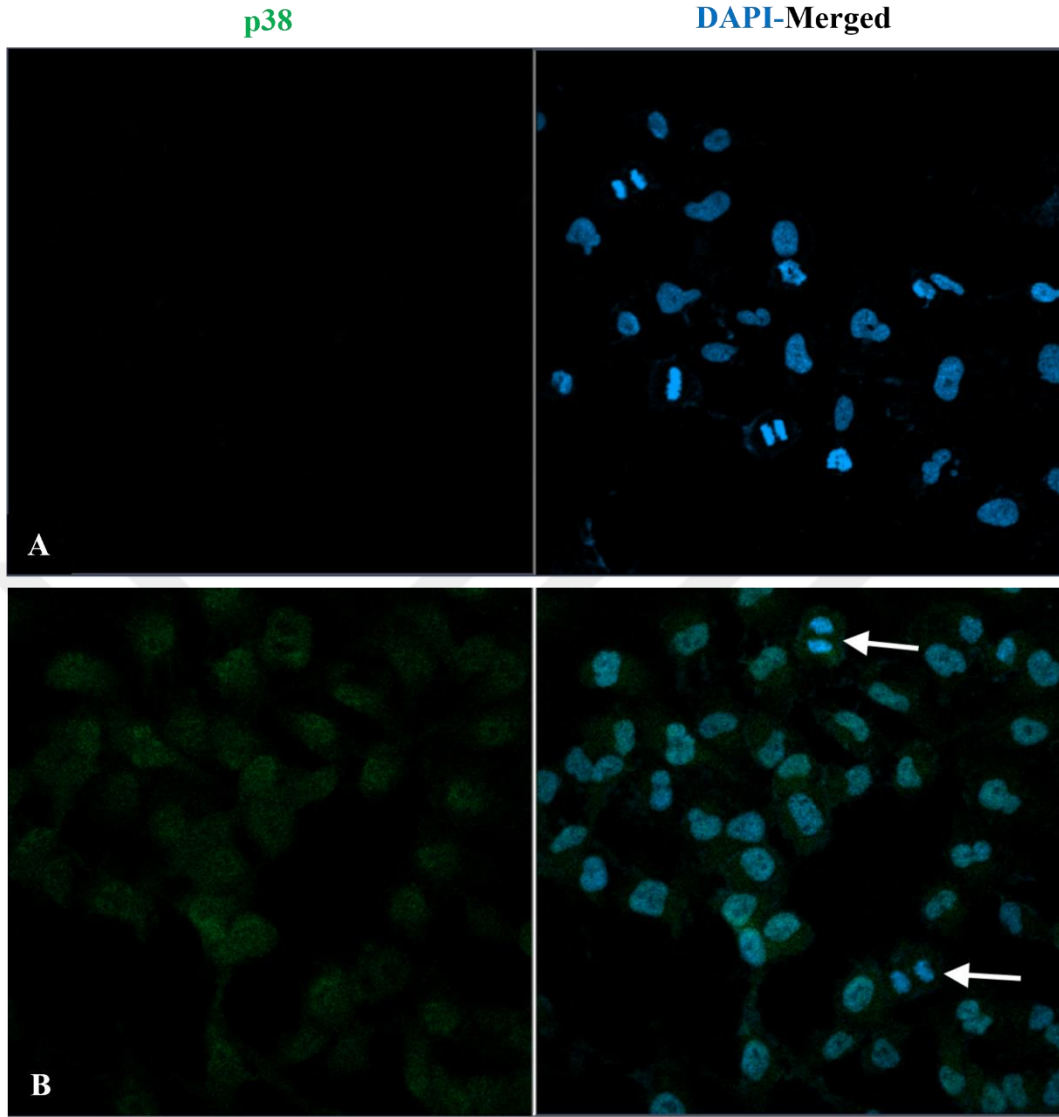
Şekil 6.36 P38 immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) LK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



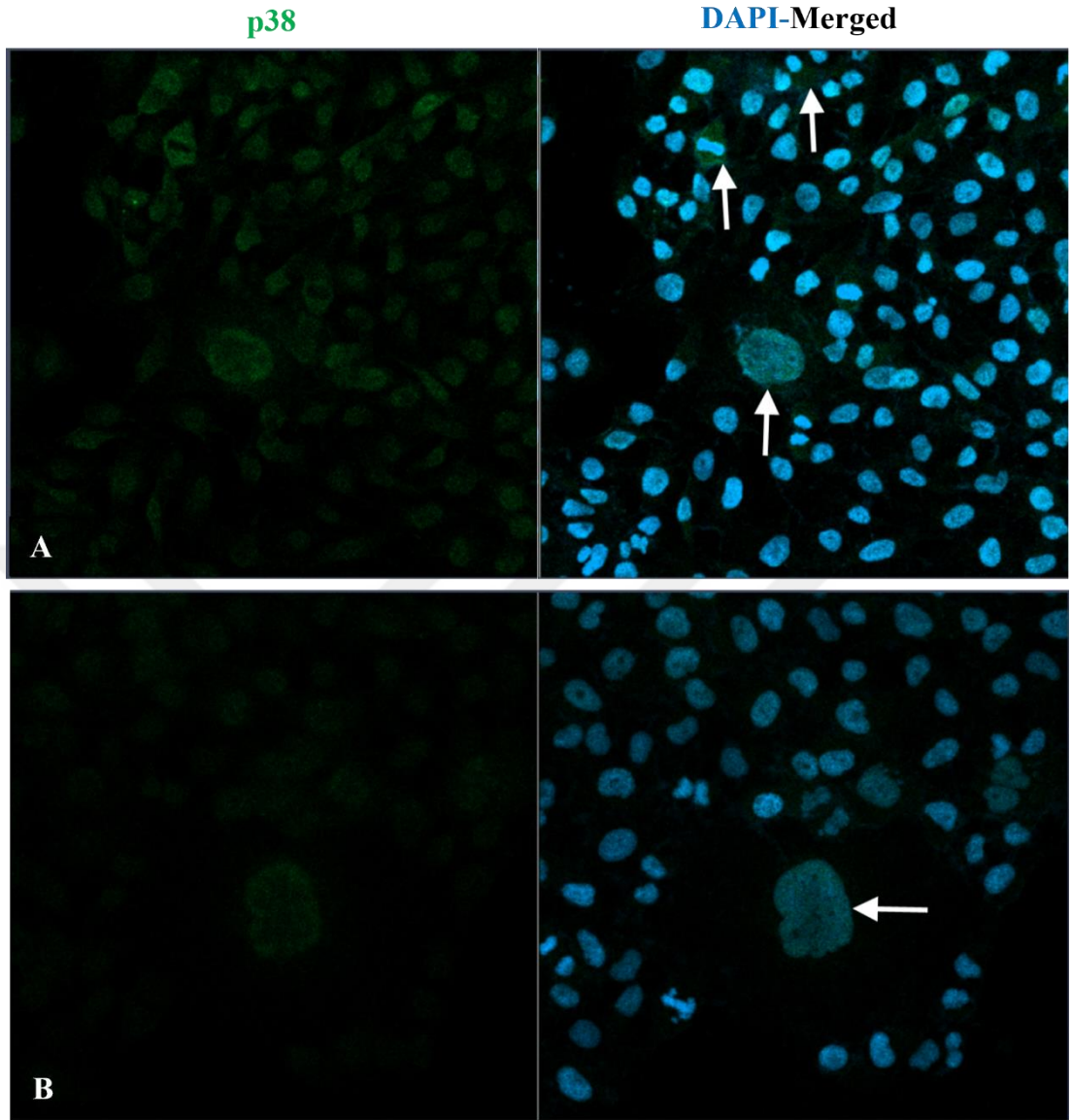
Şekil 6.37 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



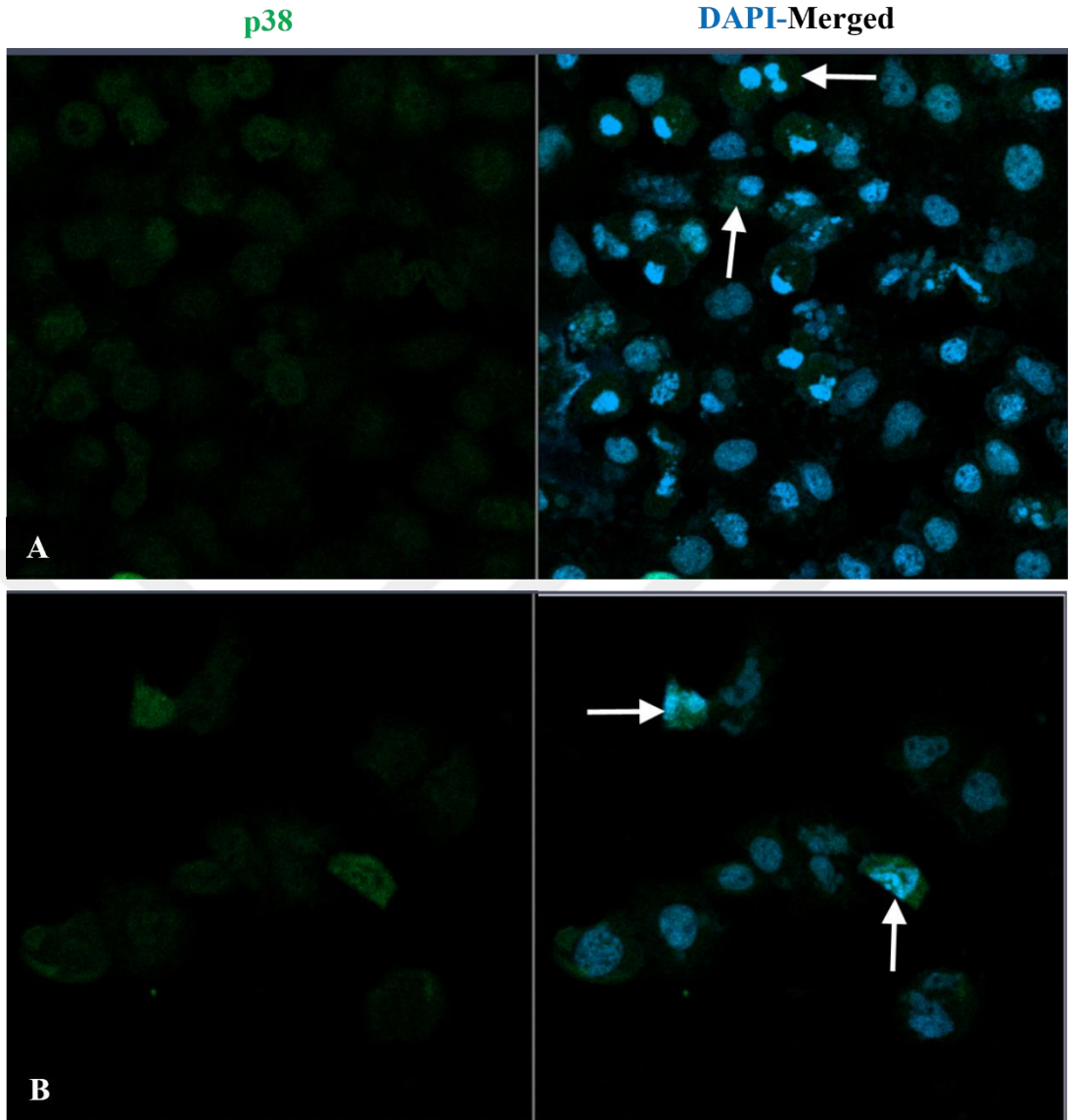
Şekil 6.38 P38 immüno Floresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2K ve (B) L4K grupları. Beyaz ok immüno Floresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



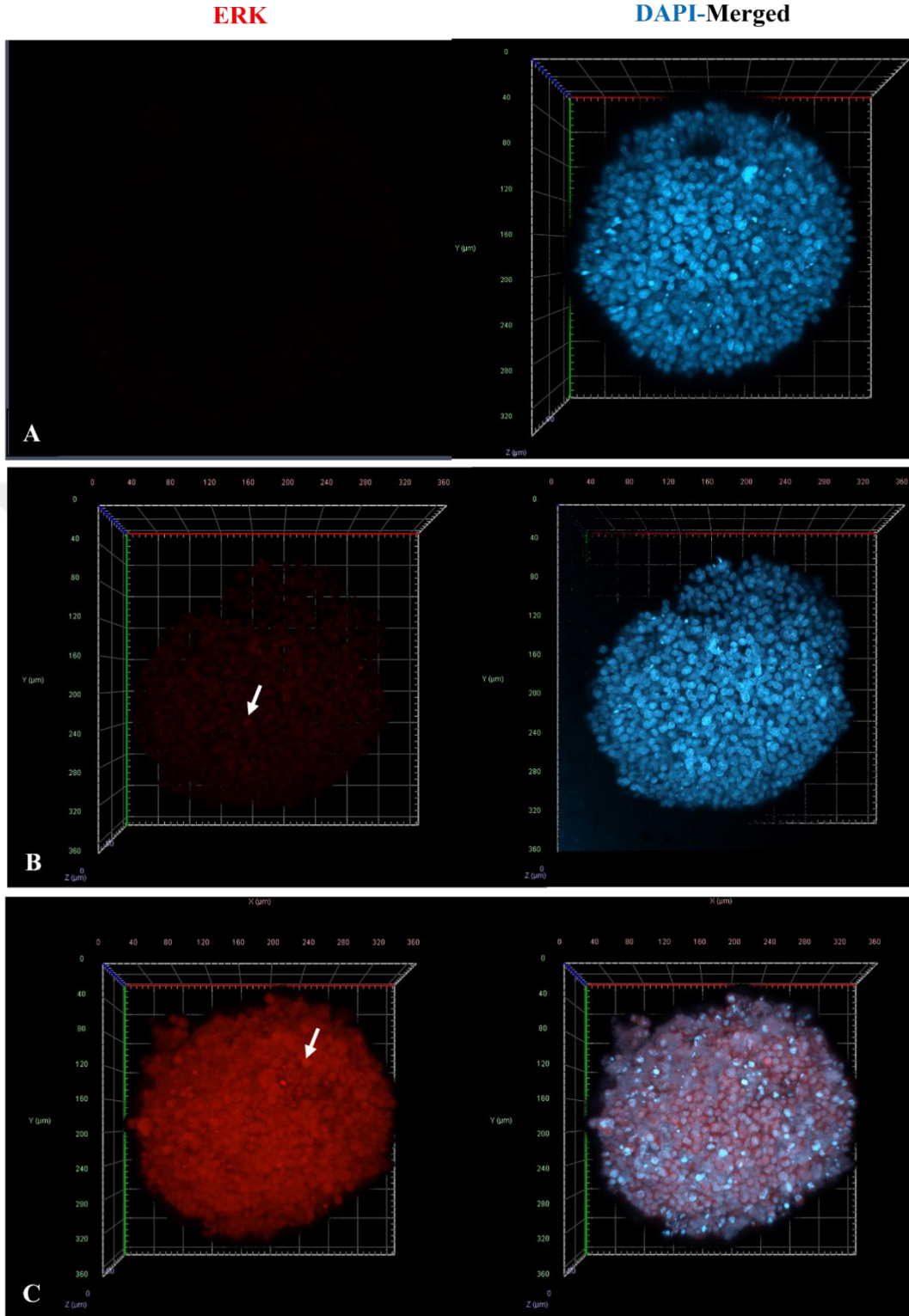
Şekil 6.39 P38 immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol ve (B) PK grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



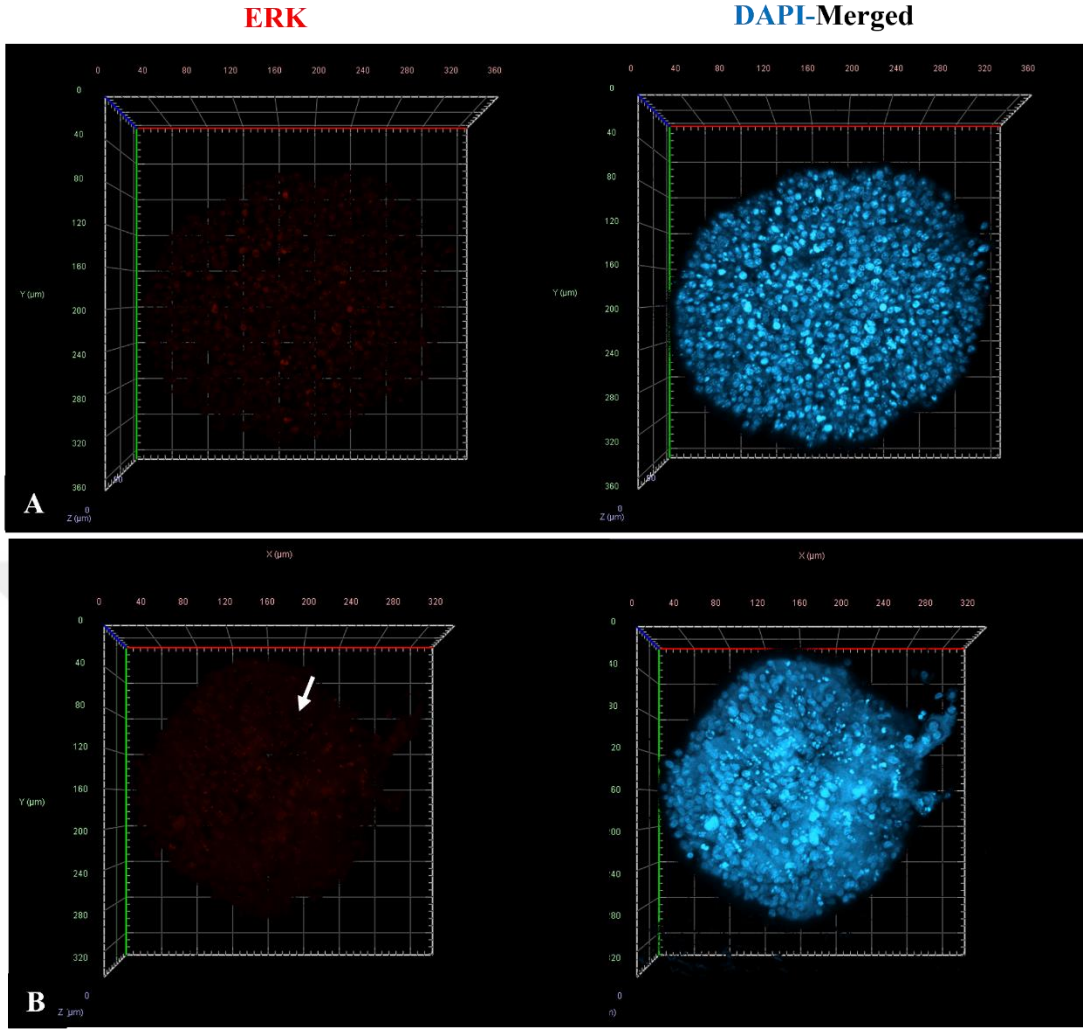
Şekil 6.40 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.



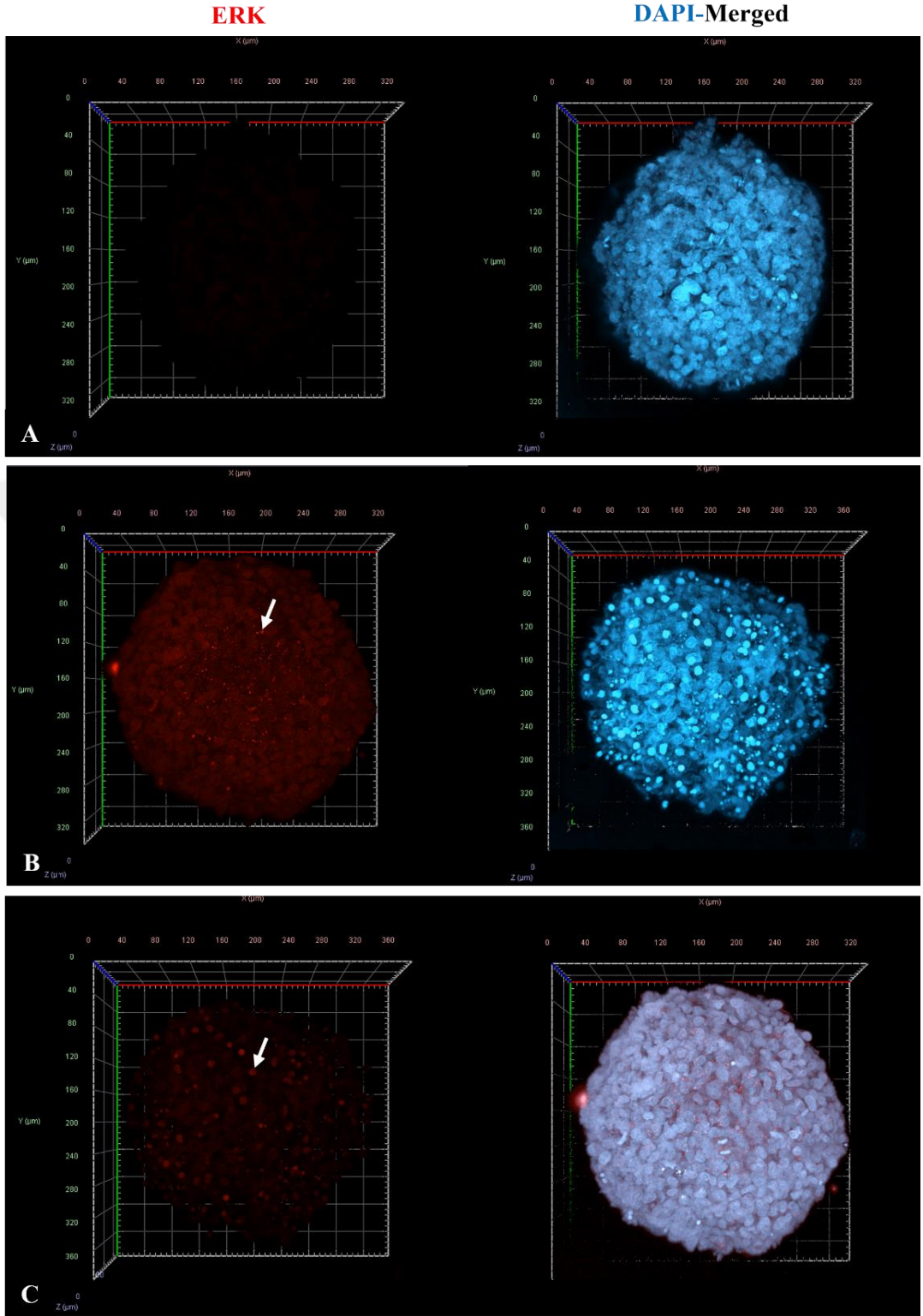
Şekil 6.41 P38 immünofloresan işaretleme yapılan 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2K ve (B) P4K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X.



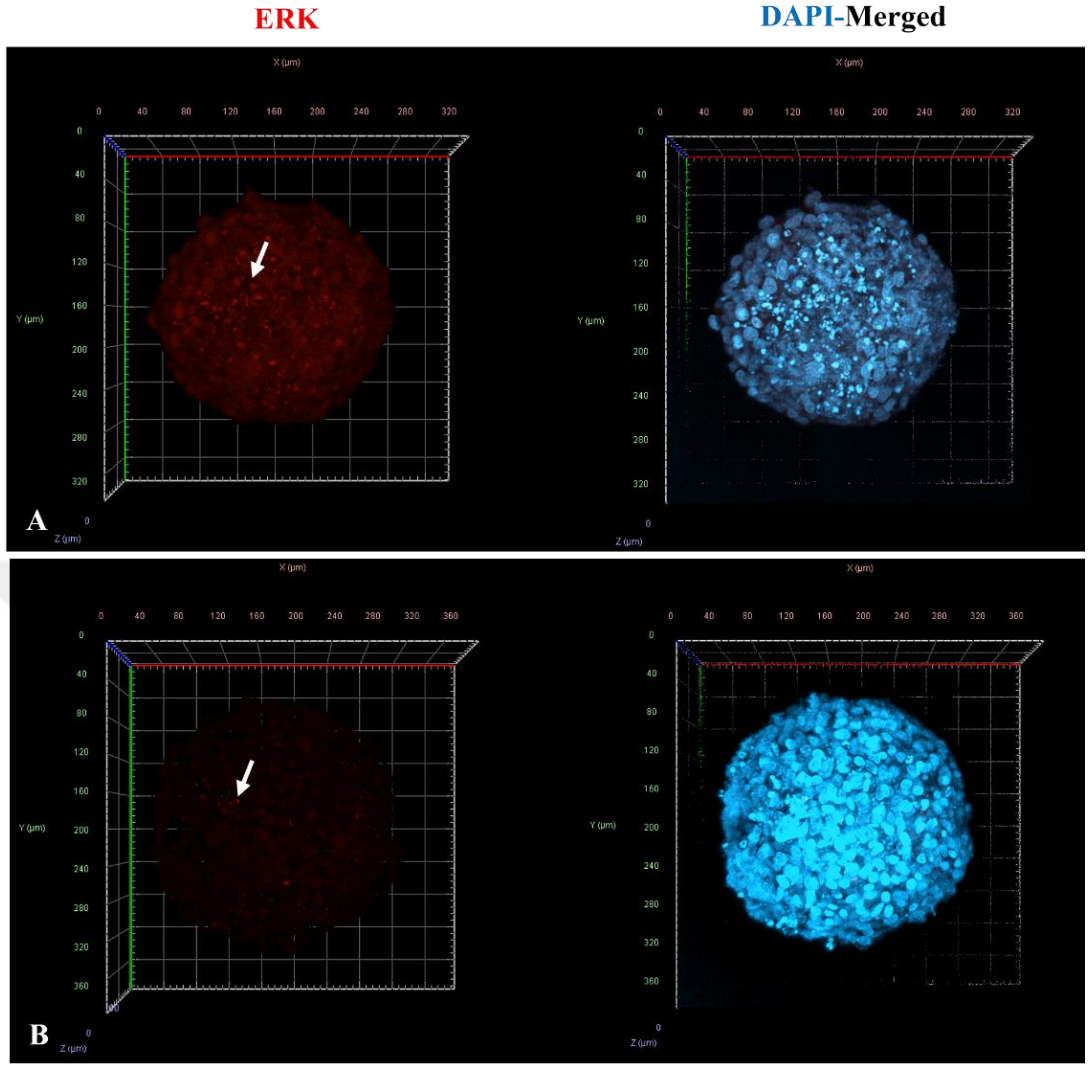
Şekil 6.42 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) LK ve (C) L2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



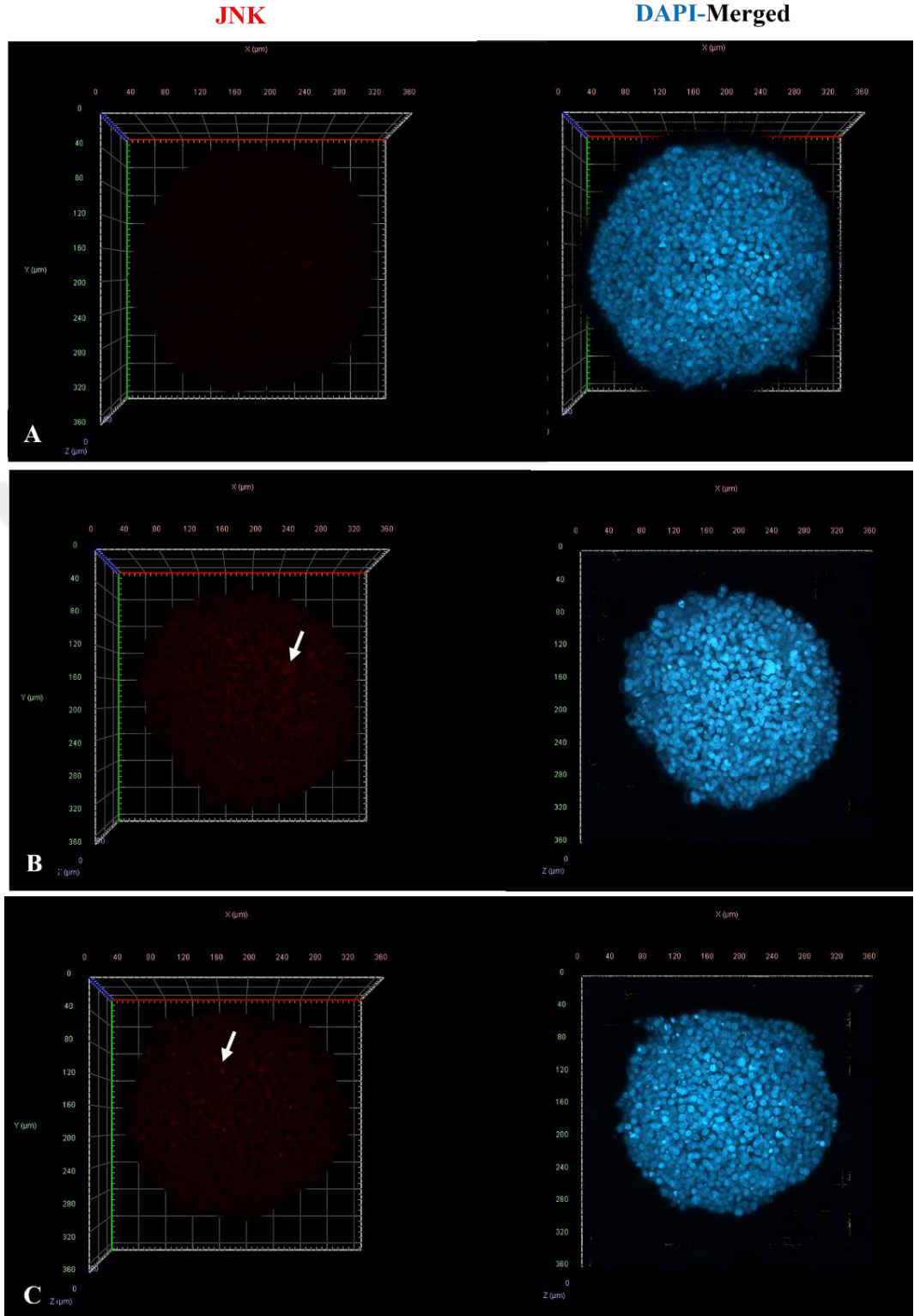
Şekil 6.43 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



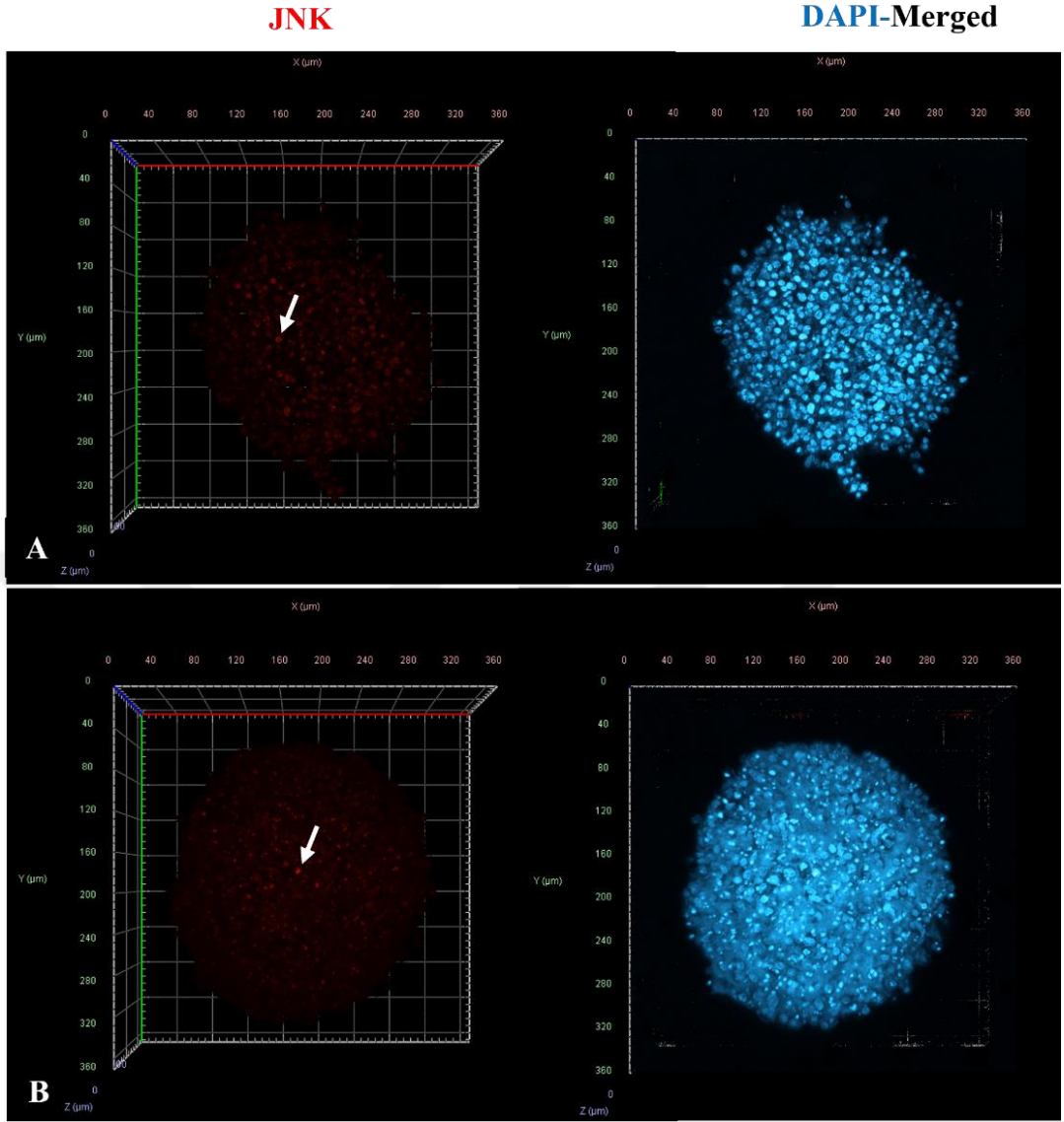
Şekil 6.44 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) PK ve (C) P2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



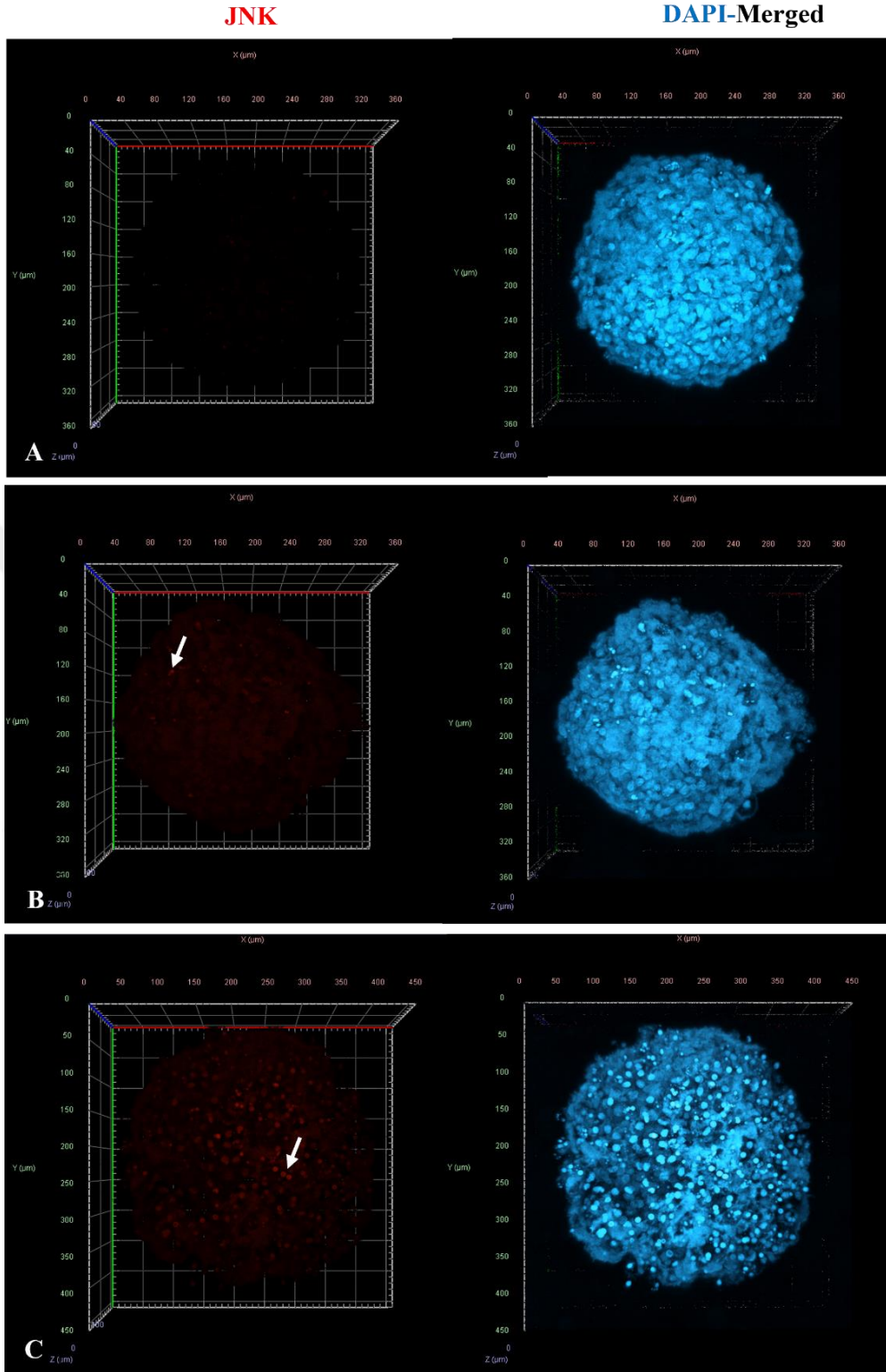
Şekil 6.45 ERK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: ERK. Büyütme: 20X



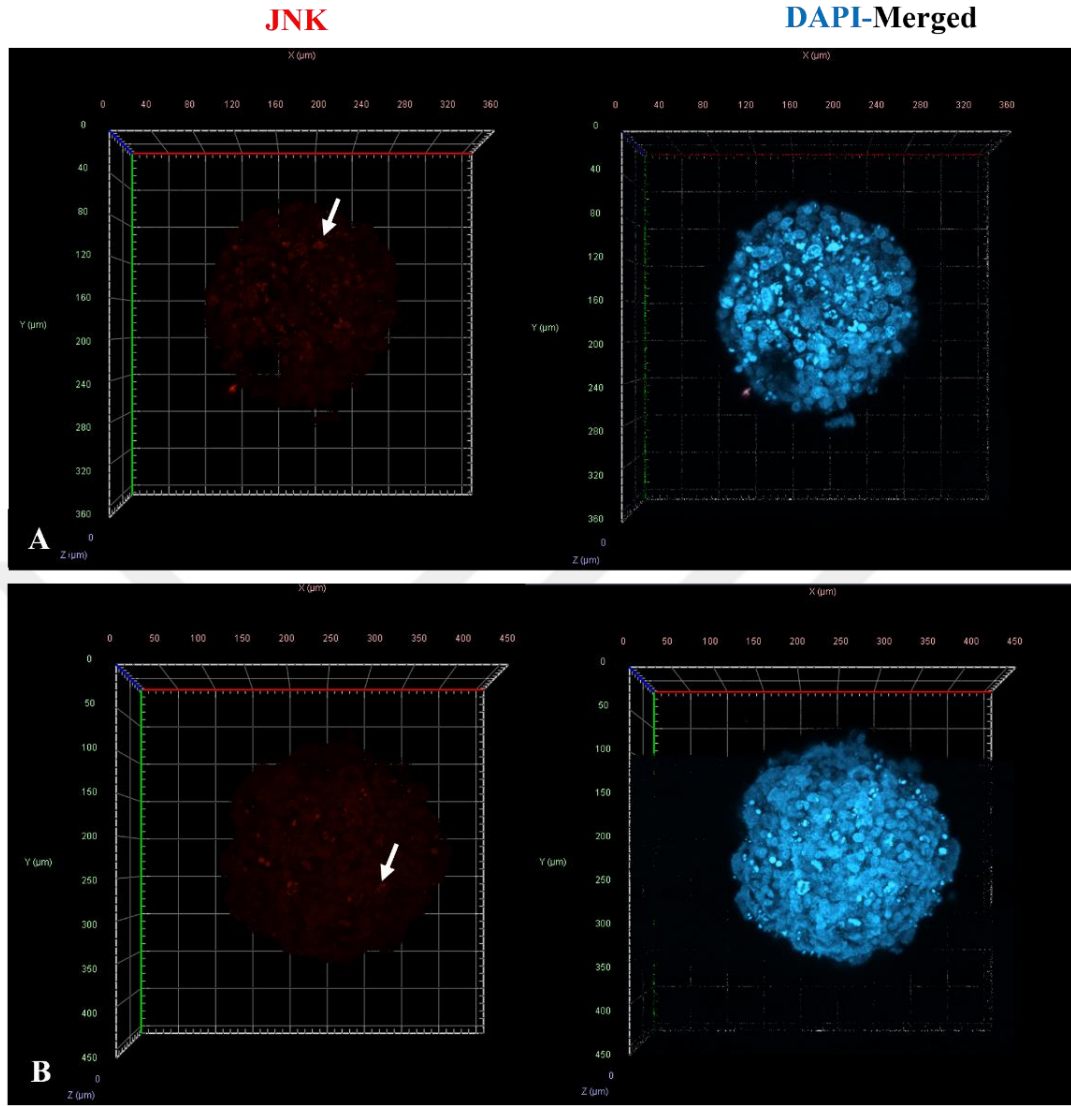
Şekil 6.46 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) LK ve (C) L2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



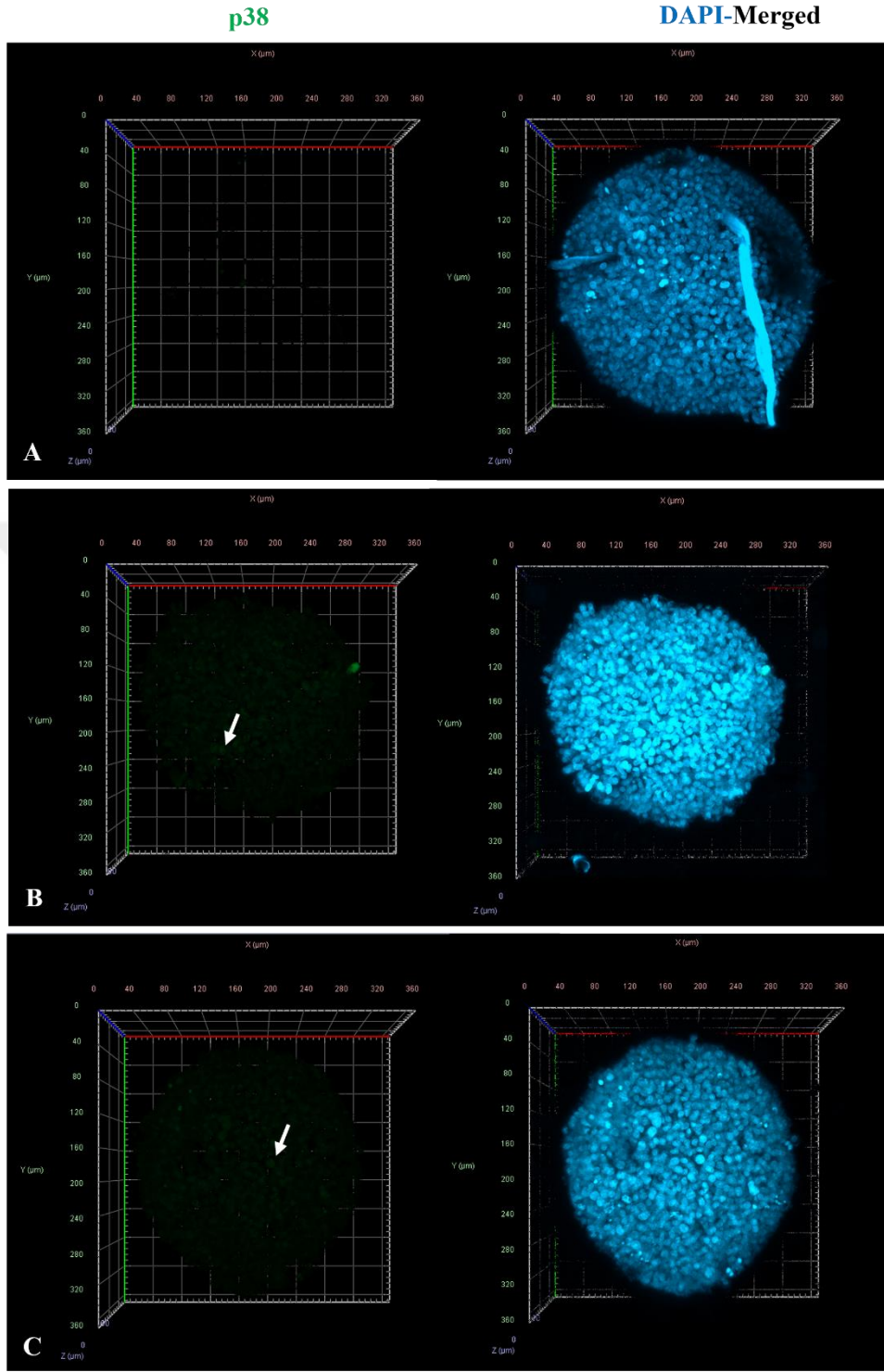
Şekil 6.47 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



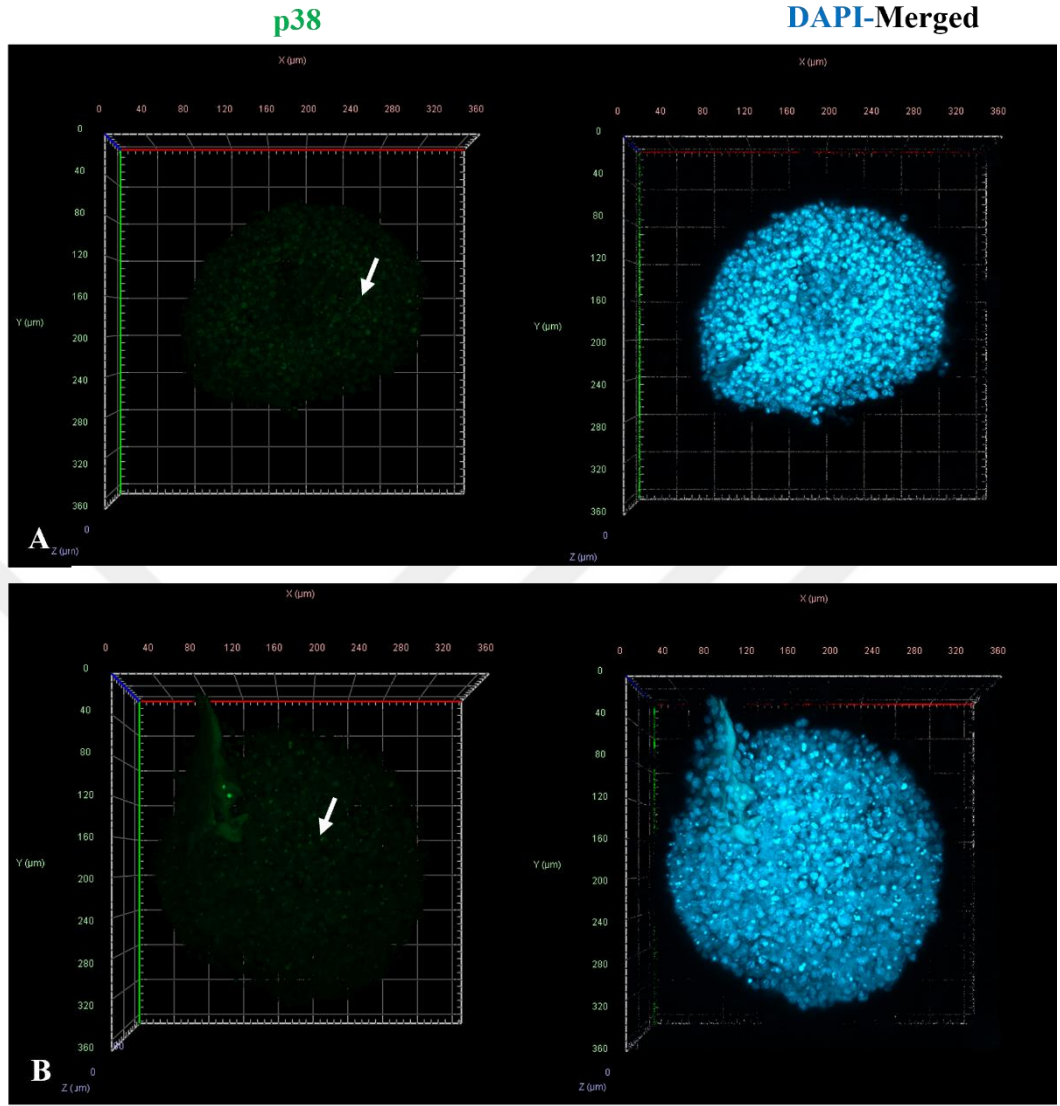
Şekil 6.48 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) PK grup ve (C) P2K grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



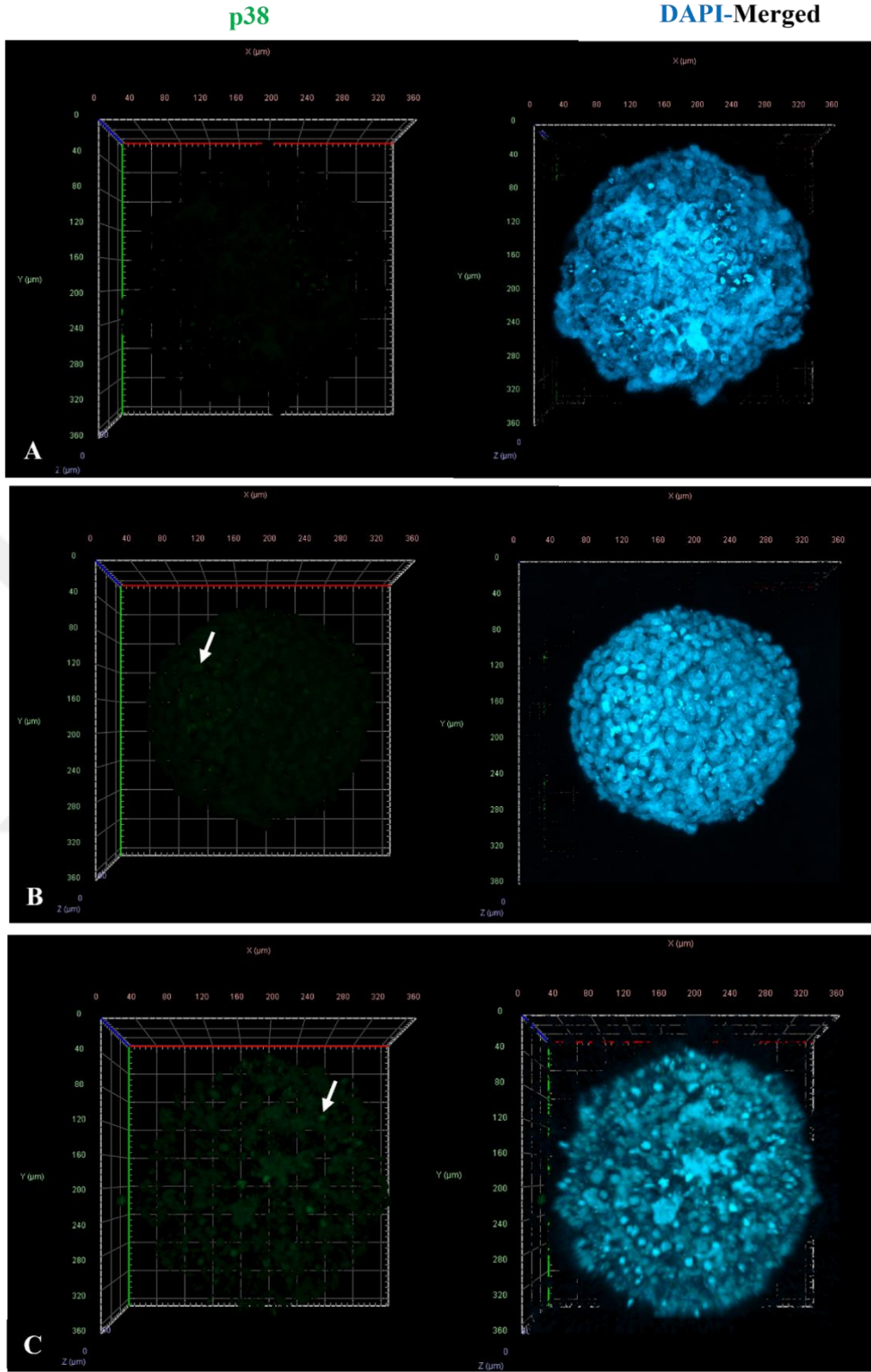
Şekil 6.49 JNK immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Kırmızı: JNK. Büyütme: 20X



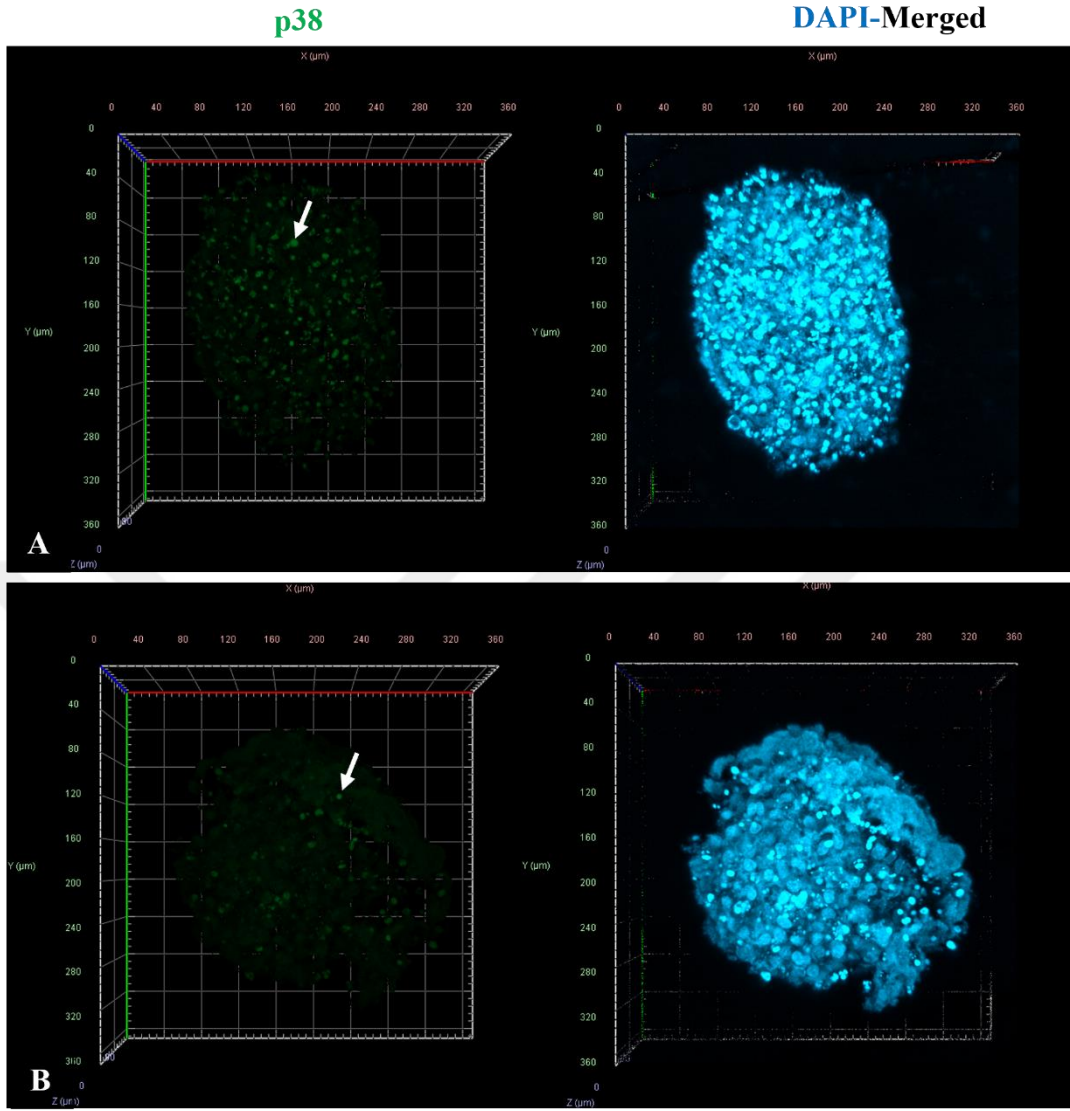
Şekil 6.50 P38 immüno Floresan işaretlemesi yapılan 3D kültür LNCaP hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) LK grup ve (C) L2K grupları. Beyaz ok immüno Floresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



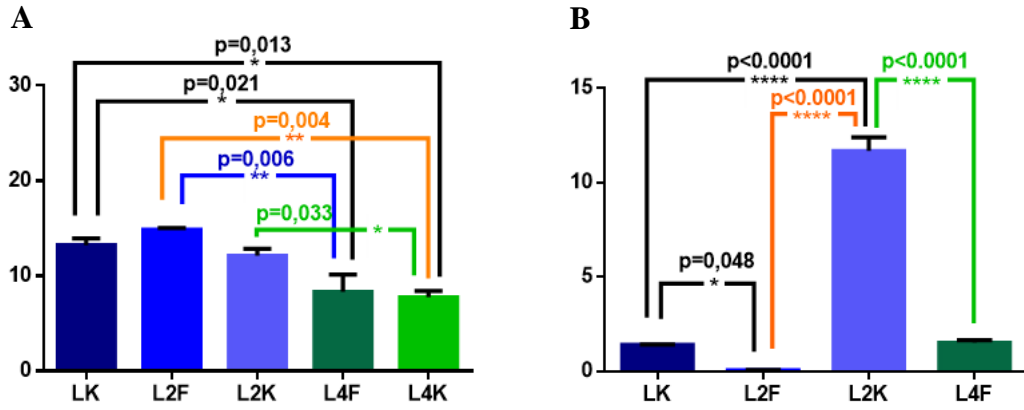
Şekil 6.51 P38 immüno Floresan işaretlemesi yapılan 3D kültür LNCaP hücrelerinden (A) L2F ve (B) L4F grupları. Beyaz ok immüno Floresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



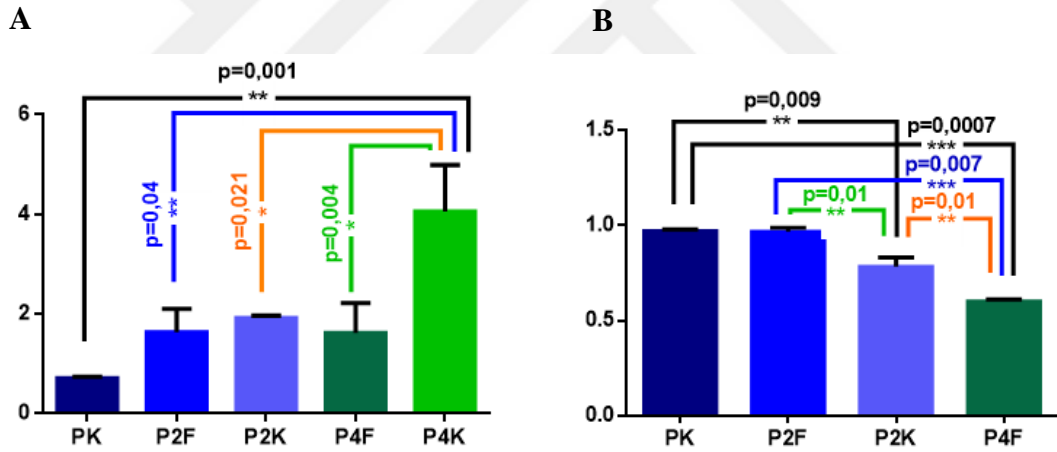
Şekil 6.52 P38 immüno Floresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) Negatif kontrol, (B) PK grup ve (C) P2K grupları. Beyaz ok immüno Floresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



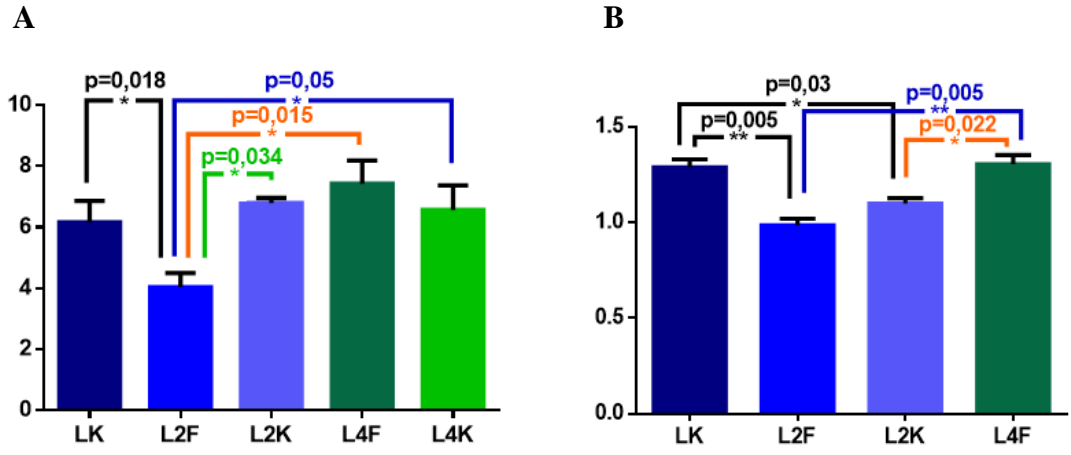
Şekil 6.53 P38 immünofloresan işaretlemesi yapılan 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden (A) P2F ve (B) P4F grupları. Beyaz ok immünofloresan alanları ifade etmektedir. Mavi: DAPI, Yeşil: p38. Büyütme: 20X



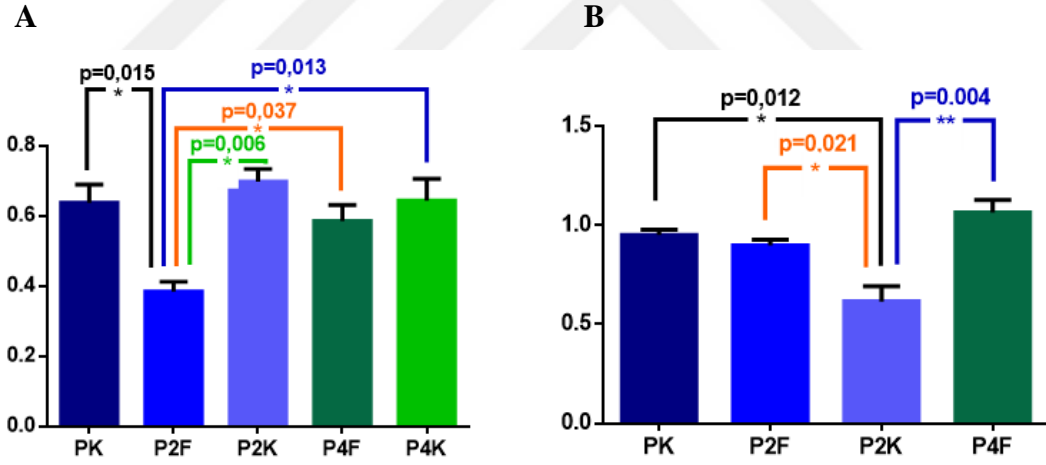
Şekil 6.54 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde ERK immüno Floresan intensite oranları.



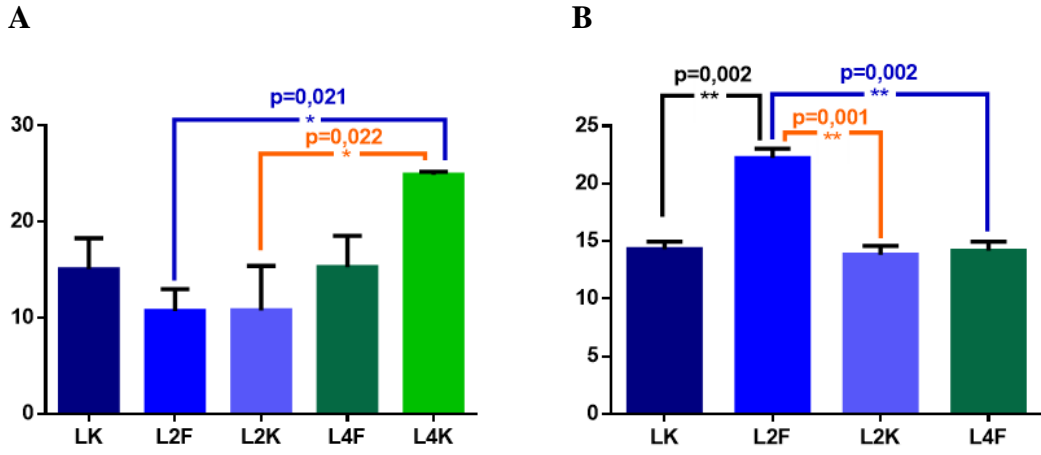
Şekil 6.55 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinde ERK immüno Floresan intensite oranları



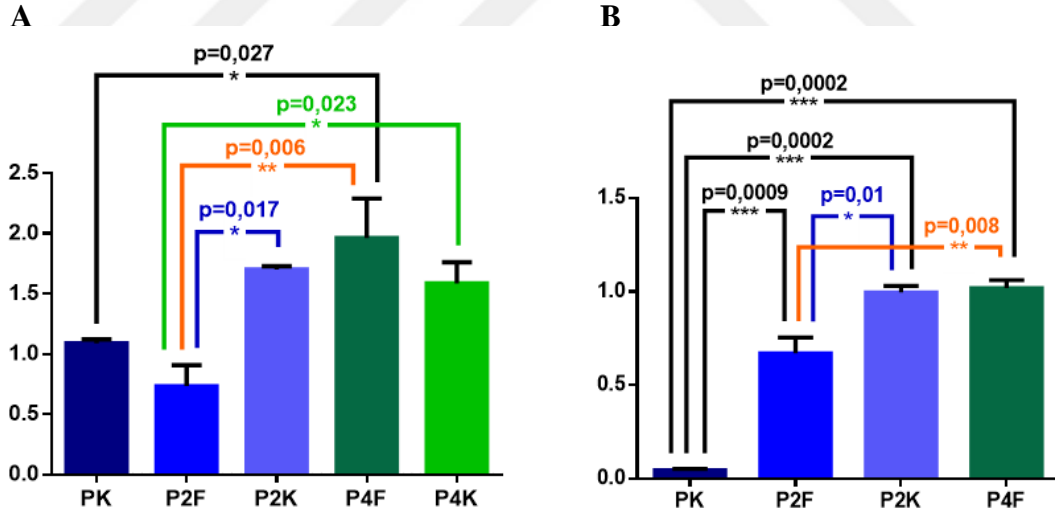
Şekil 6.56 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde JNK immüno Floresan intensite oranları



Şekil 6.57 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinde JNK immüno Floresan intensite oranları



Şekil 6.58 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinde p38 immüno Floresan intensite oranları



Şekil 6.59 (A) 2D ve (B) 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinde p38 immüno Floresan intensite oranları

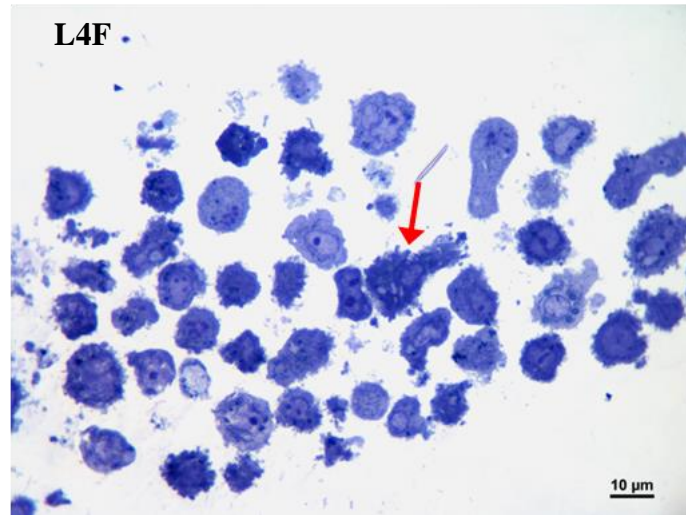
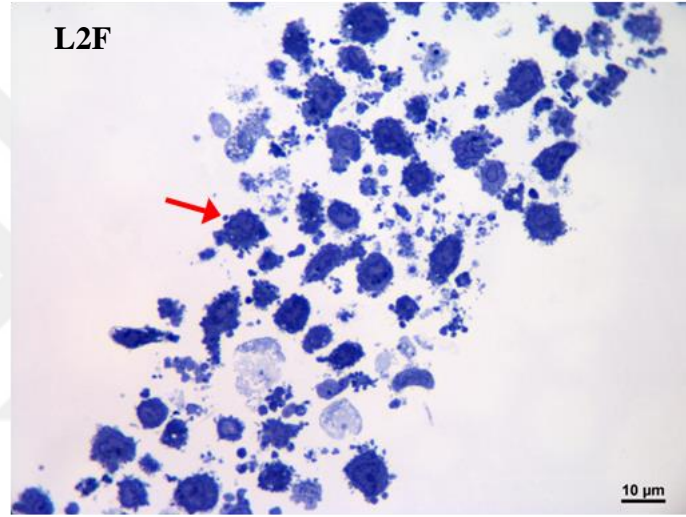
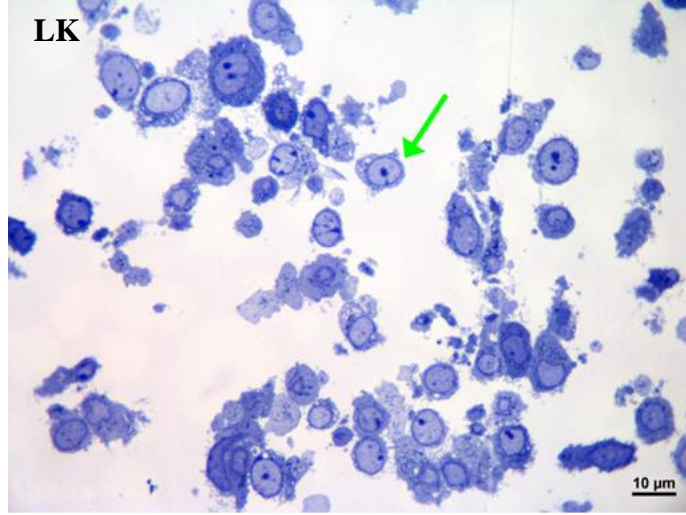
6.6. Transmisyon Elektron Mikroskopi

Epon bloklardan alınan 1µm kalınlığındaki kesitler, toluidin mavisi ile boyanarak 60 nm kesit alınacak alanlar belirlendi ve fotoğraflandı. Kemoterapötik uygulanmayan PC3 ve LNCaP hücrelerinin 2D kültür modelinde örnekler hücrelerin tripsinize edilerek pellet oluşturulmasıyla elde edildiğinden hücrelerin birbirleri ve tutundukları yüzey ile bağlantıları kopmuş, dağınık ve özgün morfolojilerini kaybetmiş olarak görülmektedir. 2D örneklerde hücreler tek tek görünebildiğinden görüntüde yer alan hücrelerin normal veya apoptotik görünüme sahip olup olmadıkları rahatlıkla ayırt edildi. Kemoterapötik uygulanan hücrelerin kontrol grubundakilere kıyasla hacimce büyüdüğü veya apoptotik süreç dolayısıyla çok küçüldüğü ve apoptotik hücrelerin kontrole kıyasla yoğun oranda olduğu gözlemlendi (Şekil 6.60, Şekil 6.61, Şekil 6.62, Şekil 6.63). 3D kültür modelinde ise tüm sferoid örnek olarak alındığından hücrelerin birbirleri ile bağlantıları kopmamış ve karakteristik morfolojilerini korudukları görüldü. Kemoterapötik uygulanan gruplara bakıldığında sferoid bütünlüğü içinde hücrelerin birbirleri ile bağlantılarının koparak oluşturdukları lakunar alanlar gözlemlendi. Sferoid büyüklüklerinin kontrol gruplarına kıyasla küçüldüğü görüldü (Şekil 6.64, Şekil 6.65, Şekil 6.66,

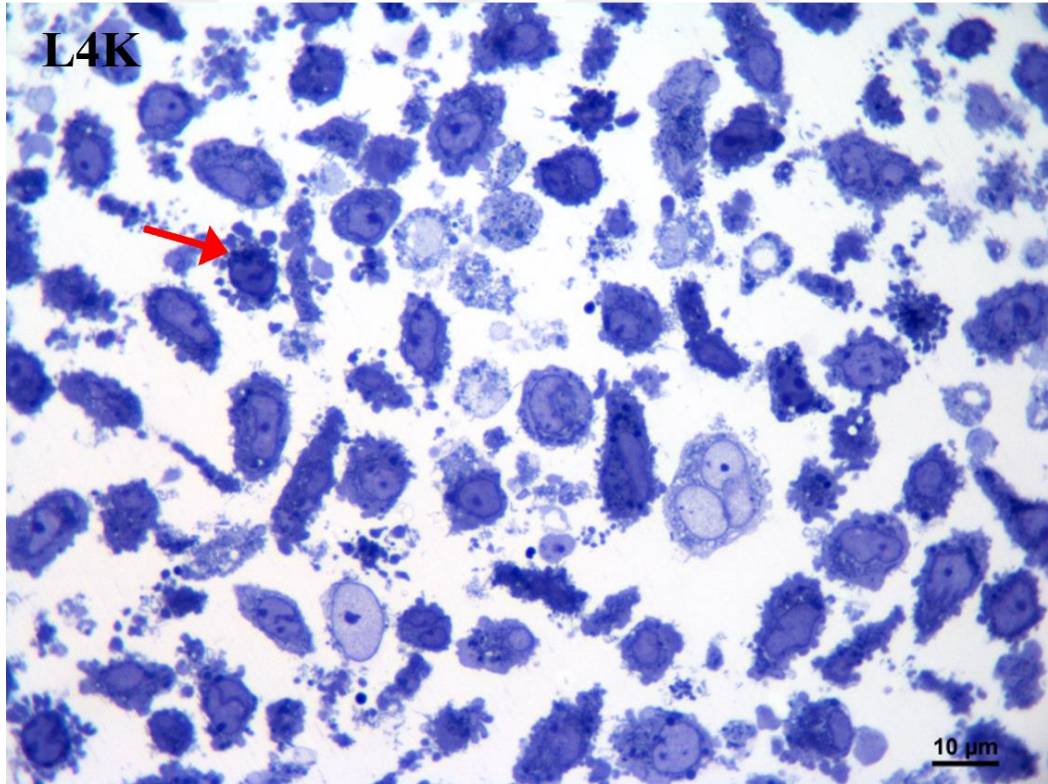
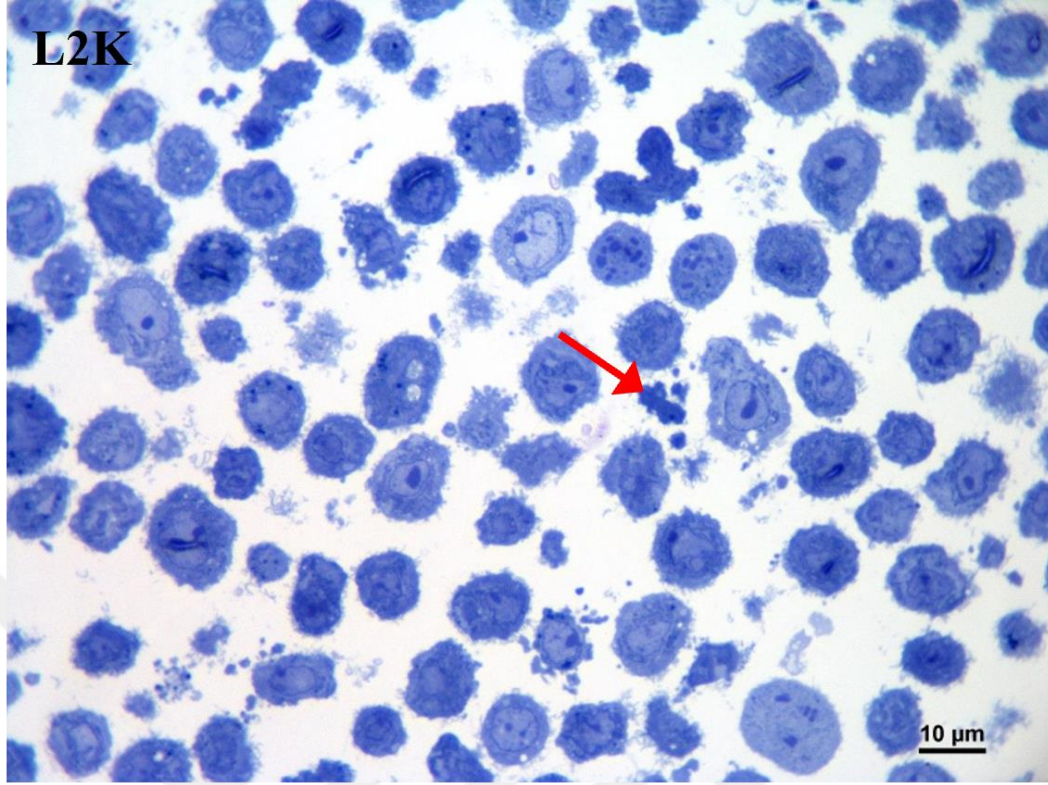
Şekil 6.67, Şekil 6.68, Şekil 6.69, Şekil 6.70, Şekil 6.71).

Epon bloklardan alınan 60 nm kesitler ultrastrüktürel olarak değerlendirildi. 2D ve 3D kültür modelinde LNCaP ve PC3 hücrelerine kemoterapötik uygulamalarının apoptotik lamellar vakuol, vakuol, hücre membranında apoptotik parçalanmayı ifade eden apoptotik tomurcuklanma ve çift nukelolus gibi apoptotik belirteçlere neden olduğu görüldü (Şekil 6.72,

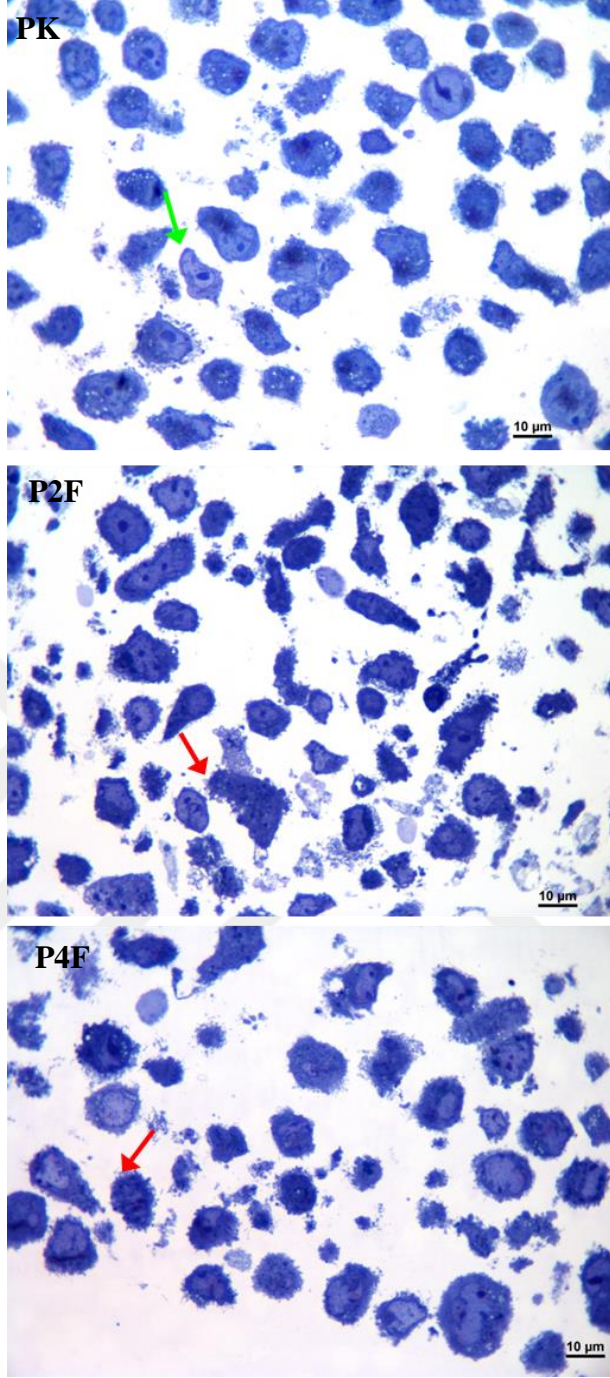
Şekil 6.73, Şekil 6.74, Şekil 6.75, Şekil 6.76, Şekil 6.77, Şekil 6.78, Şekil 6.79). 3D örneklerde hücrelerin birbirlerine halen bağlı olmasından dolayı hücreler arası iletişimde kullanılan sitoiskelet içerikli hücreler arası yapıların defromasyona uğradığı ve membranda gerileme gösterdiği gözlemlendi.



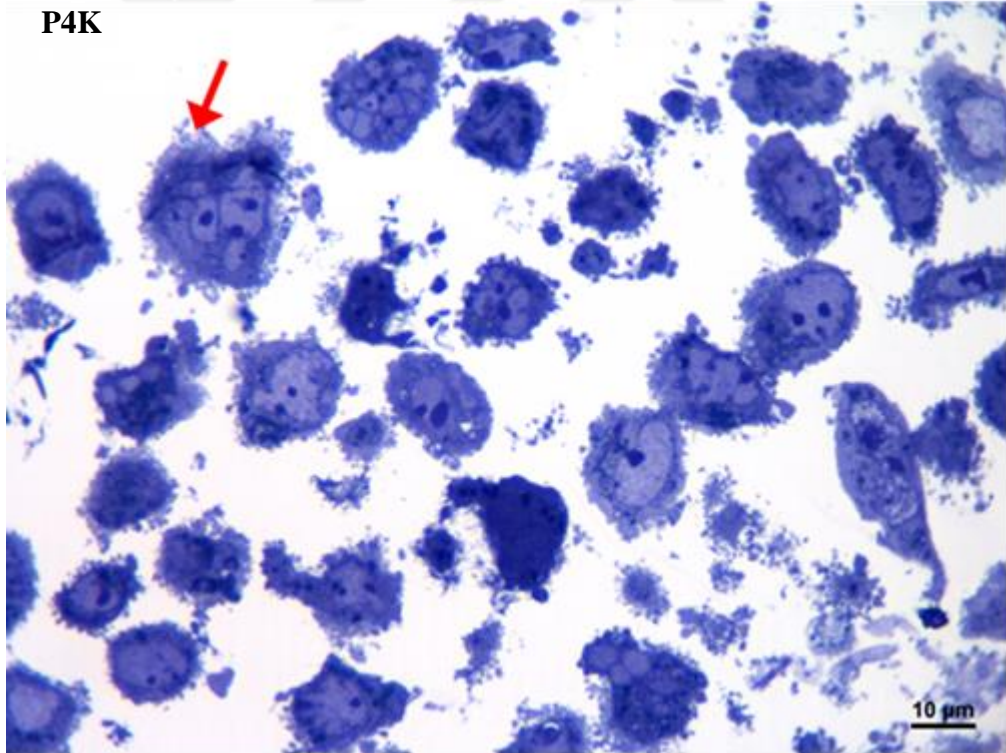
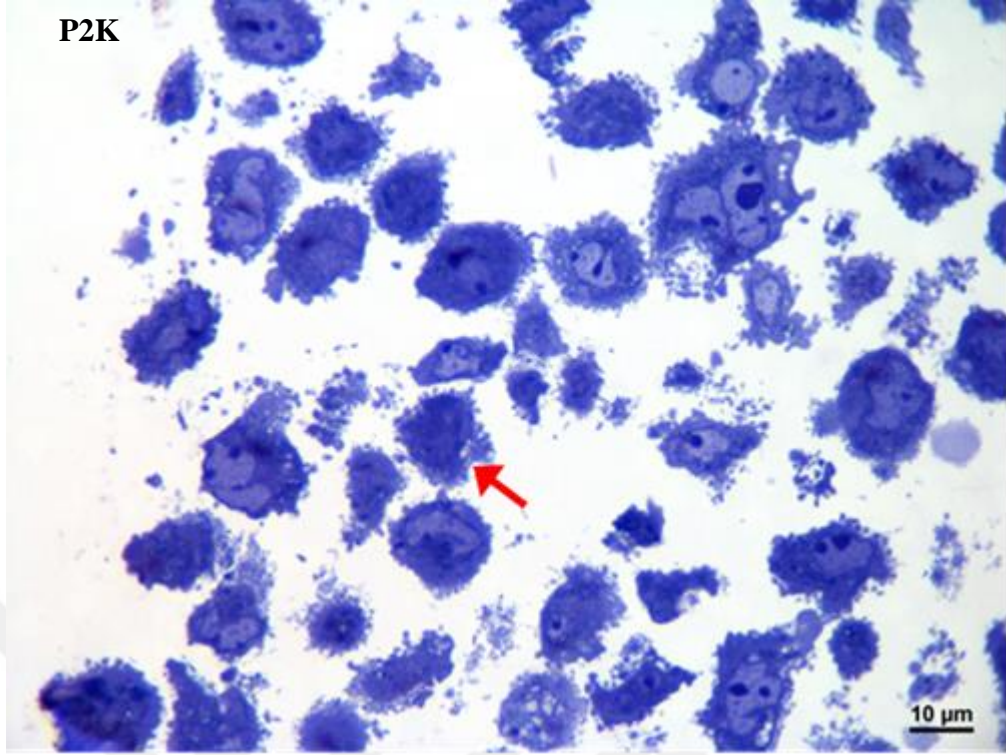
Şekil 6.60 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden gruplarından yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip LNCaP hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X



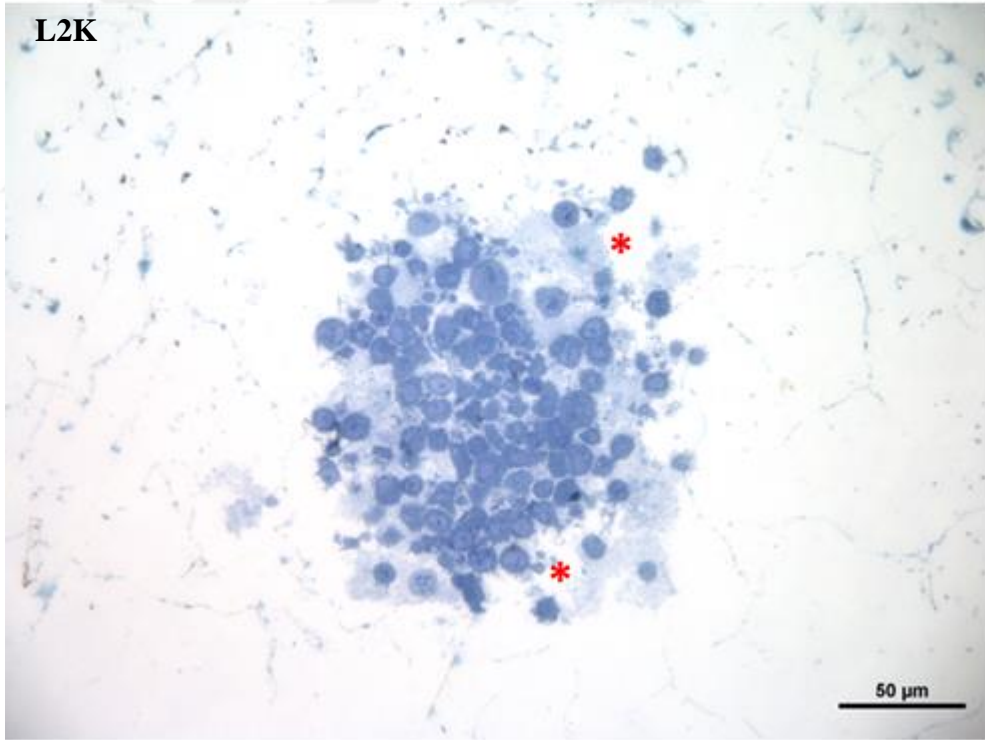
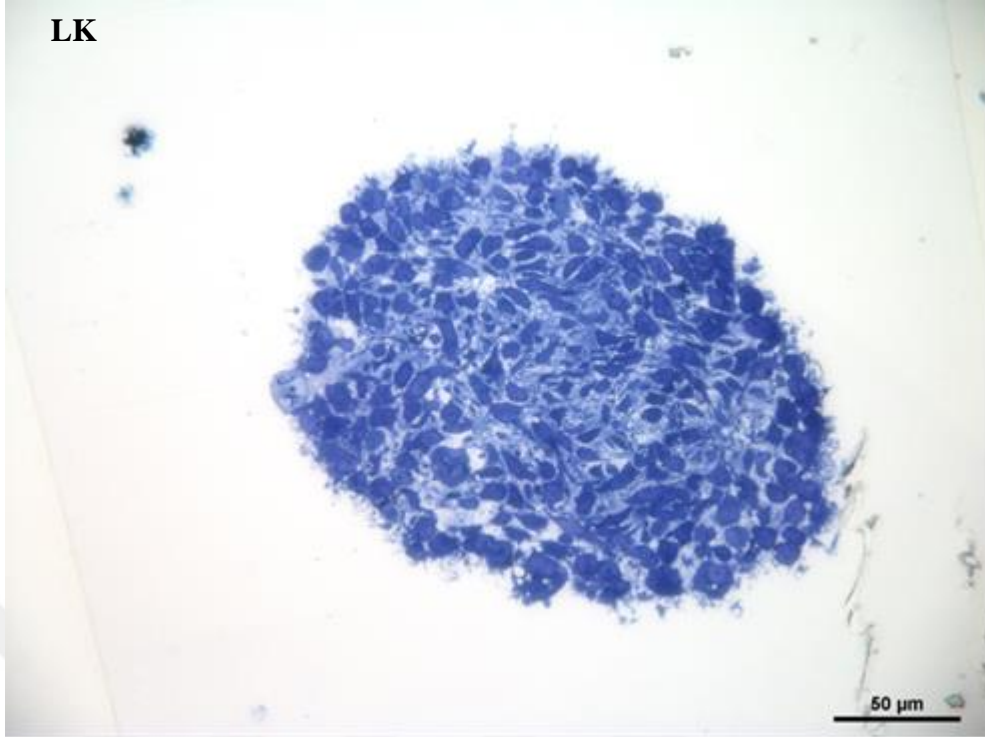
Şekil 6.61 2D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden. Apoptotik hücre (kırmızı ok).
Büyütme: 100X



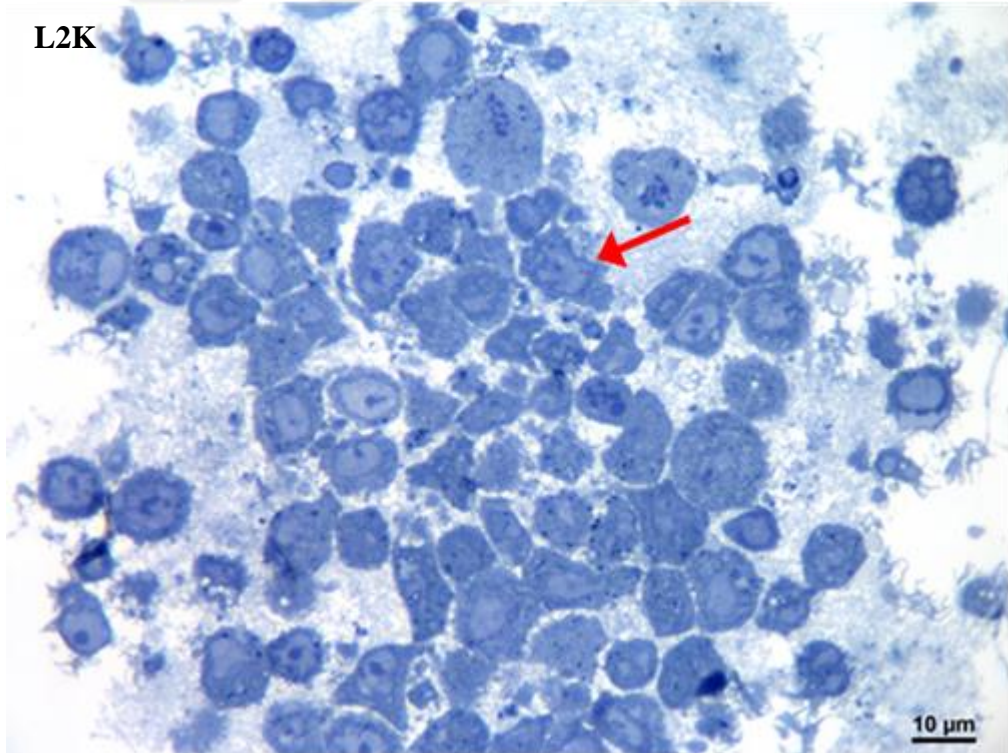
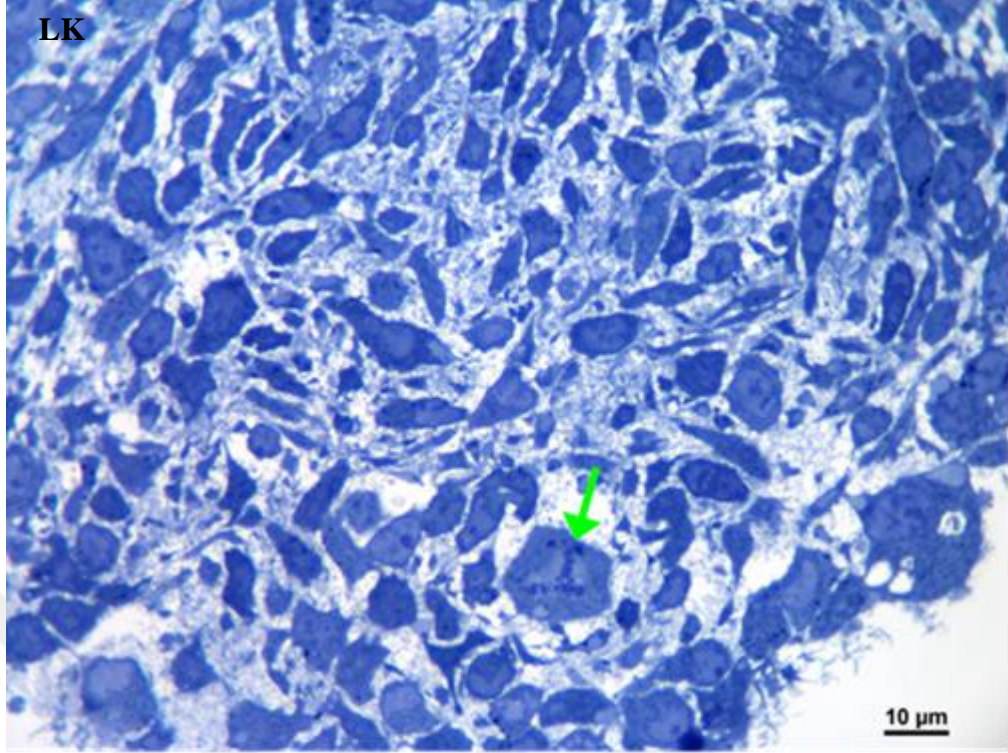
Şekil 6.62 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip PC3 hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X



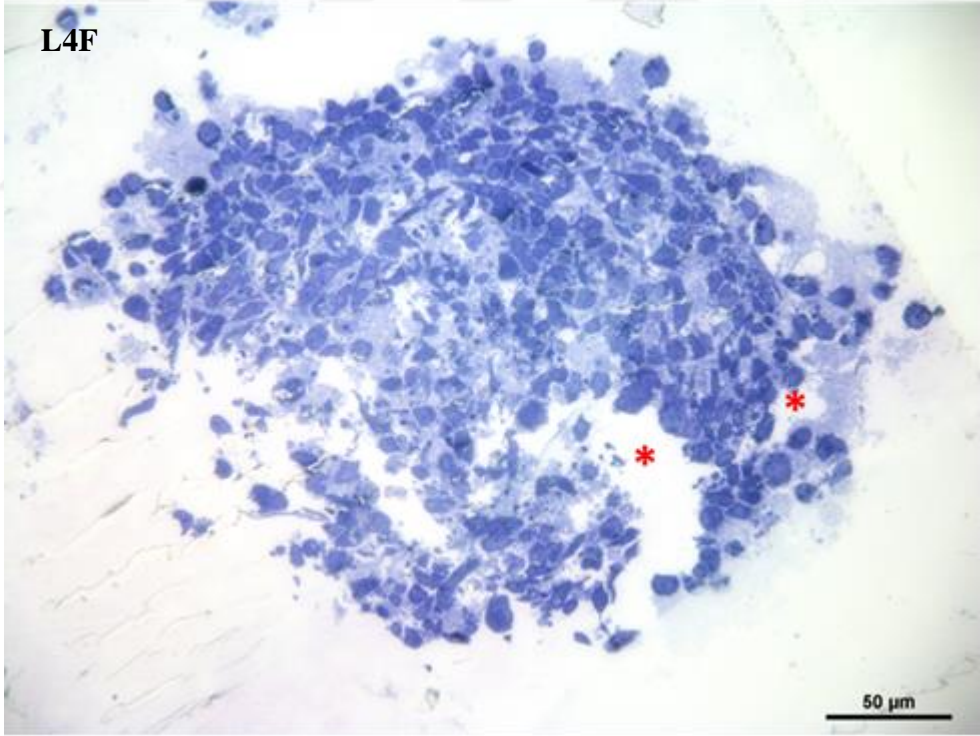
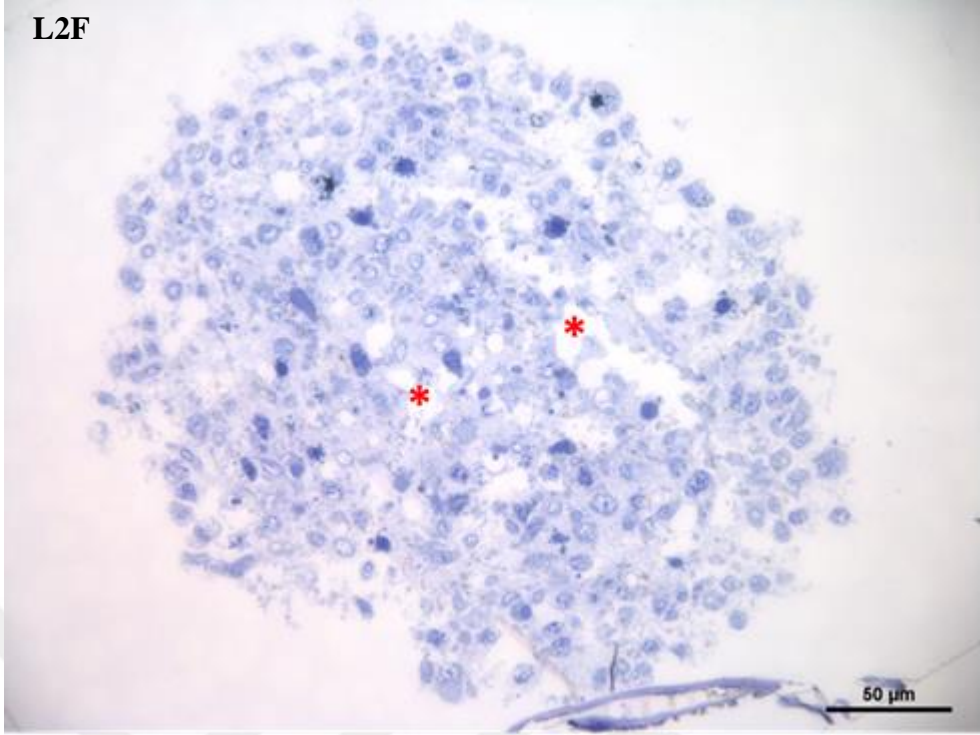
Şekil 6.63 2D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X



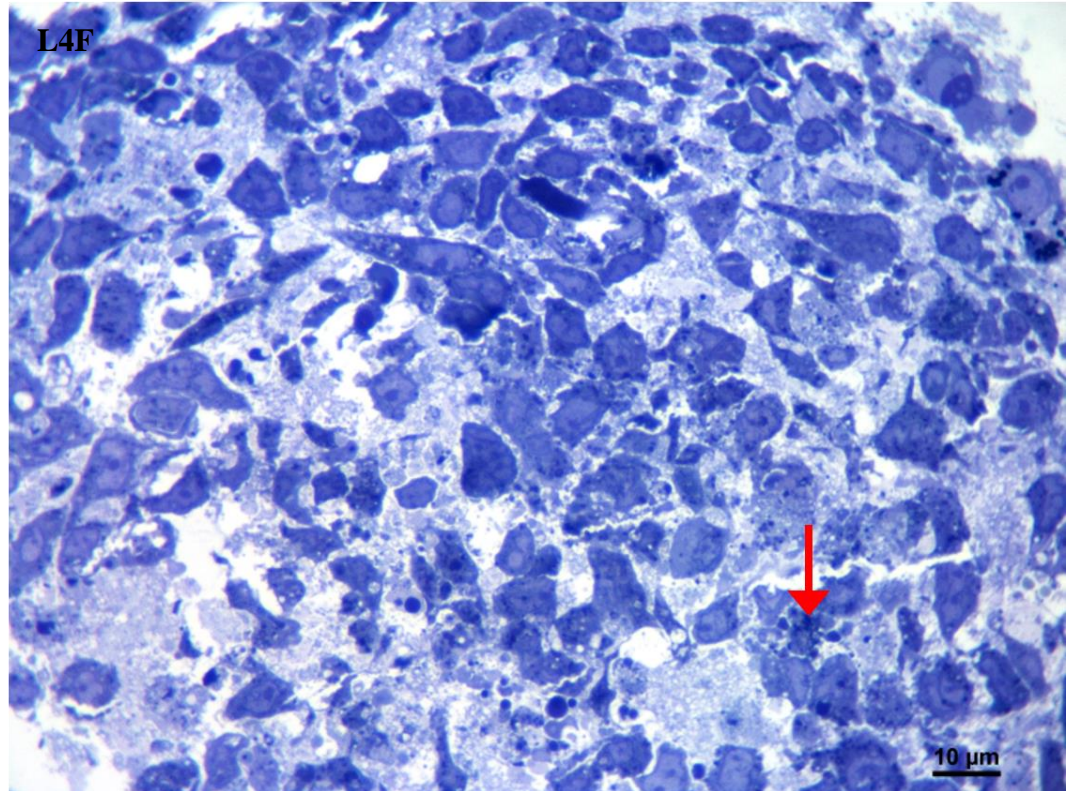
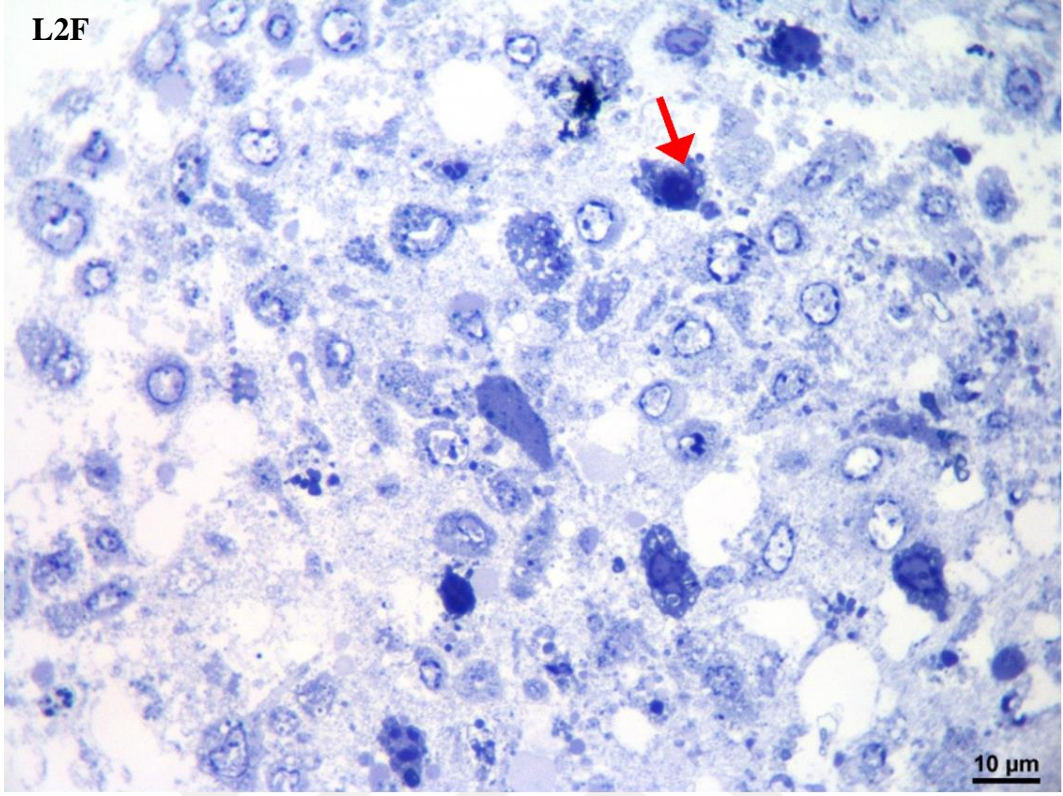
Şekil 6.64 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X



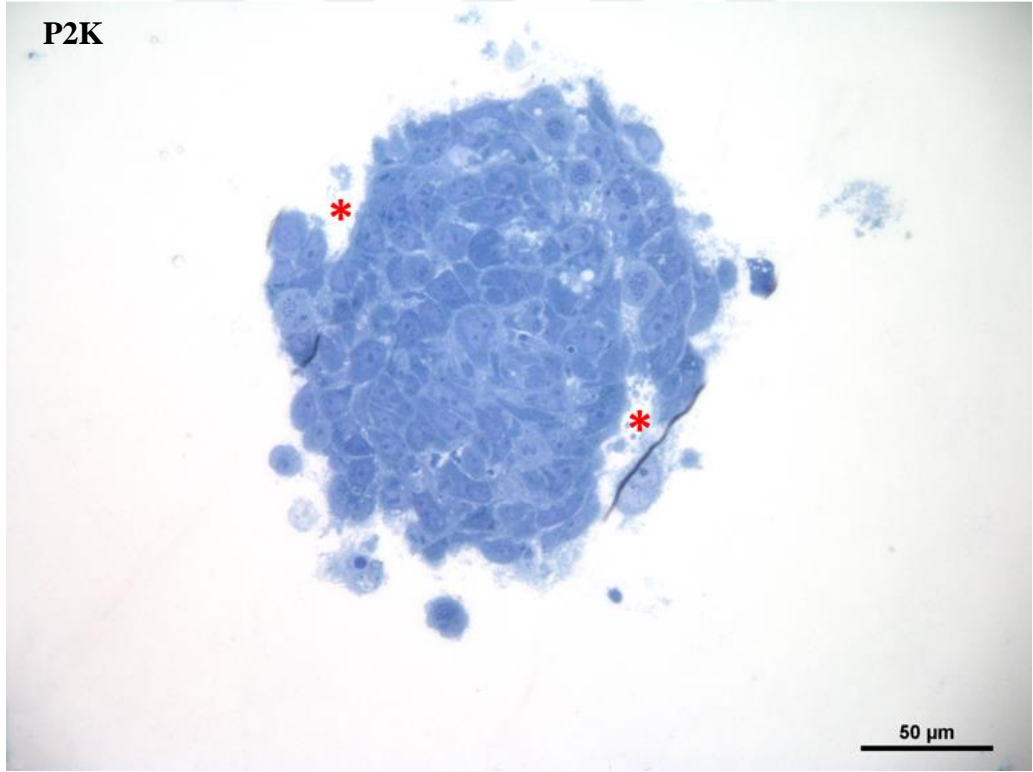
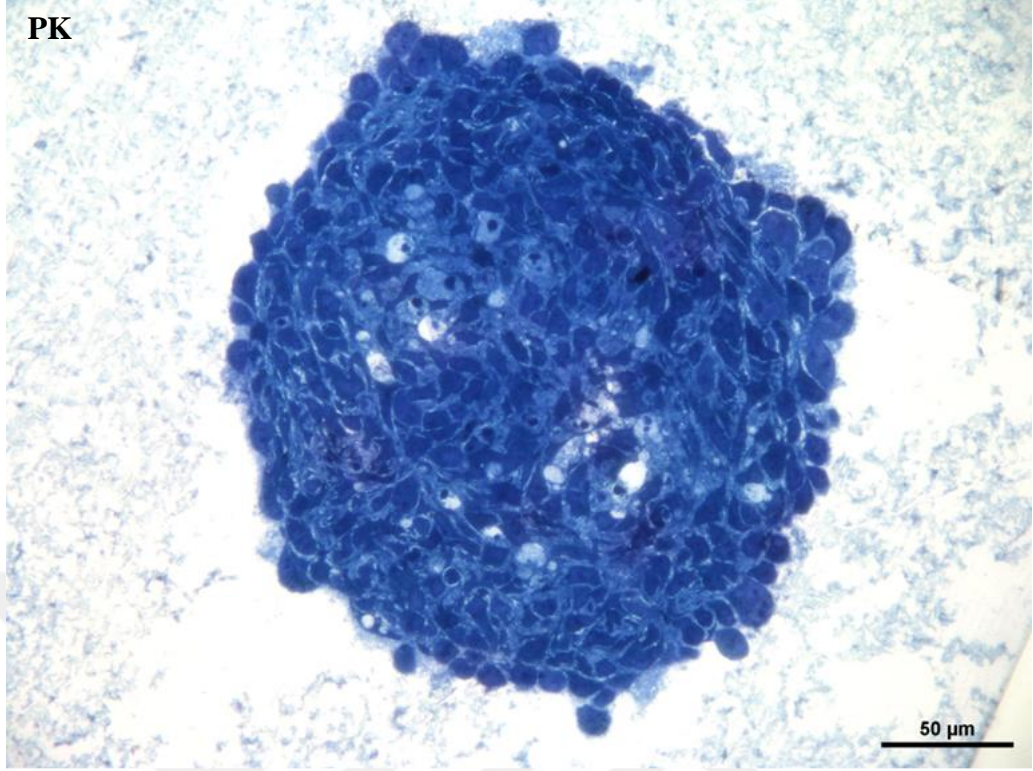
Şekil 6.65 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip bölünmekte olan LNCaP hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X



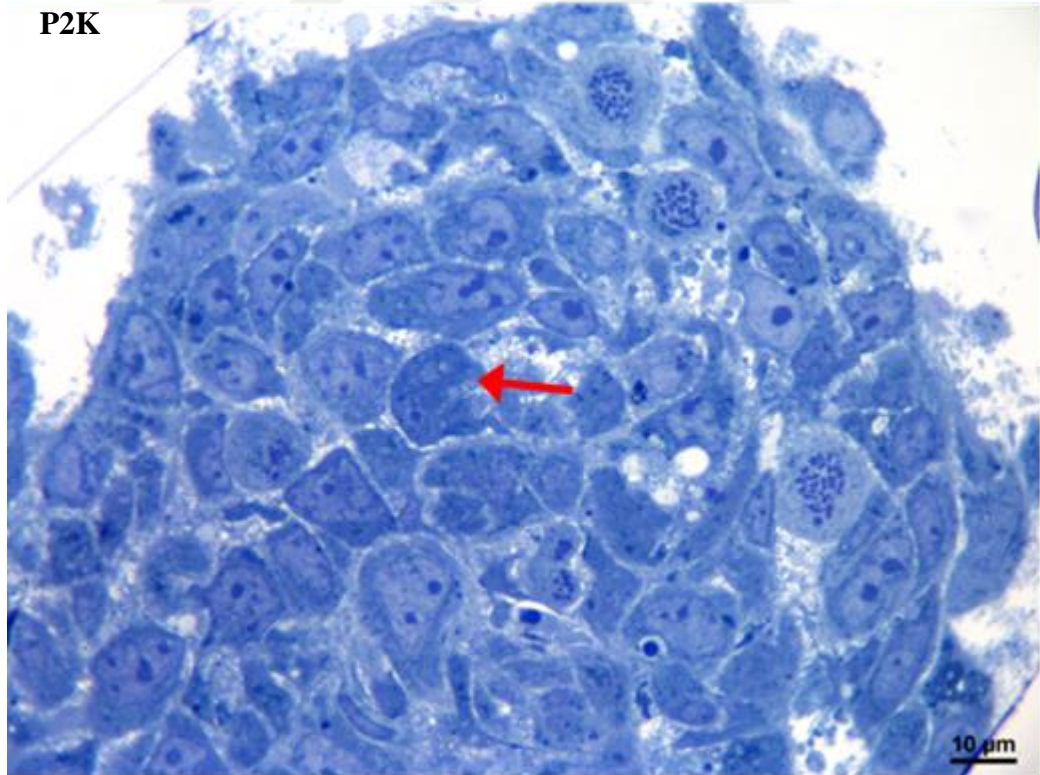
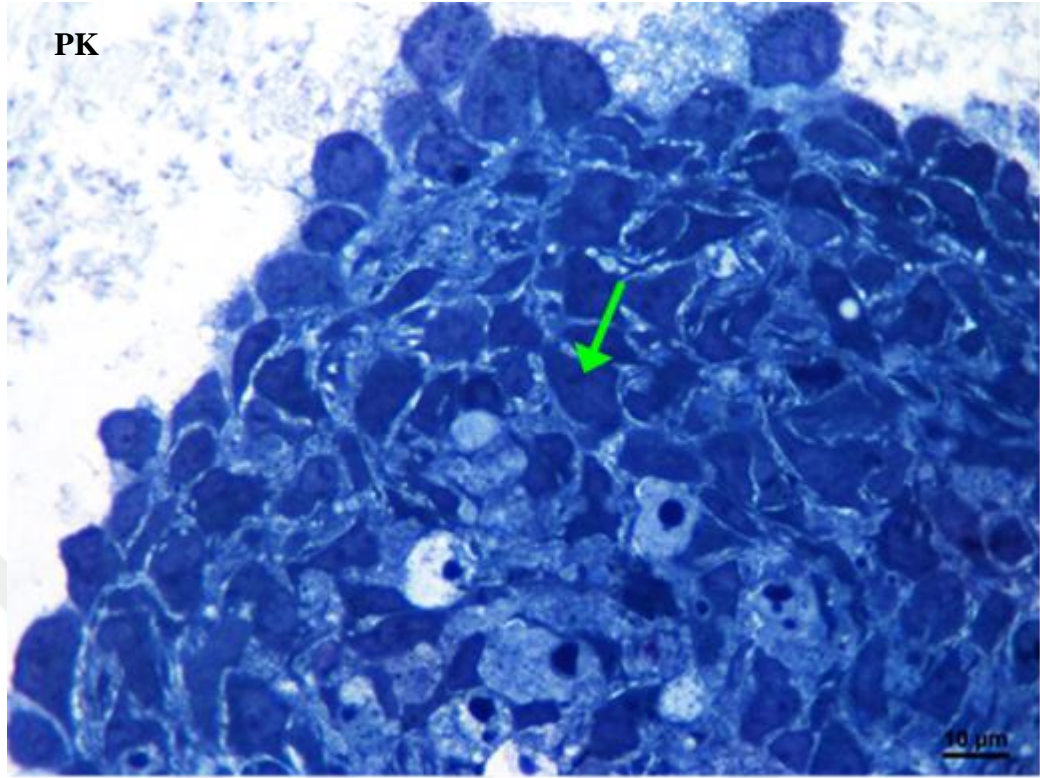
Şekil 6.66 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X



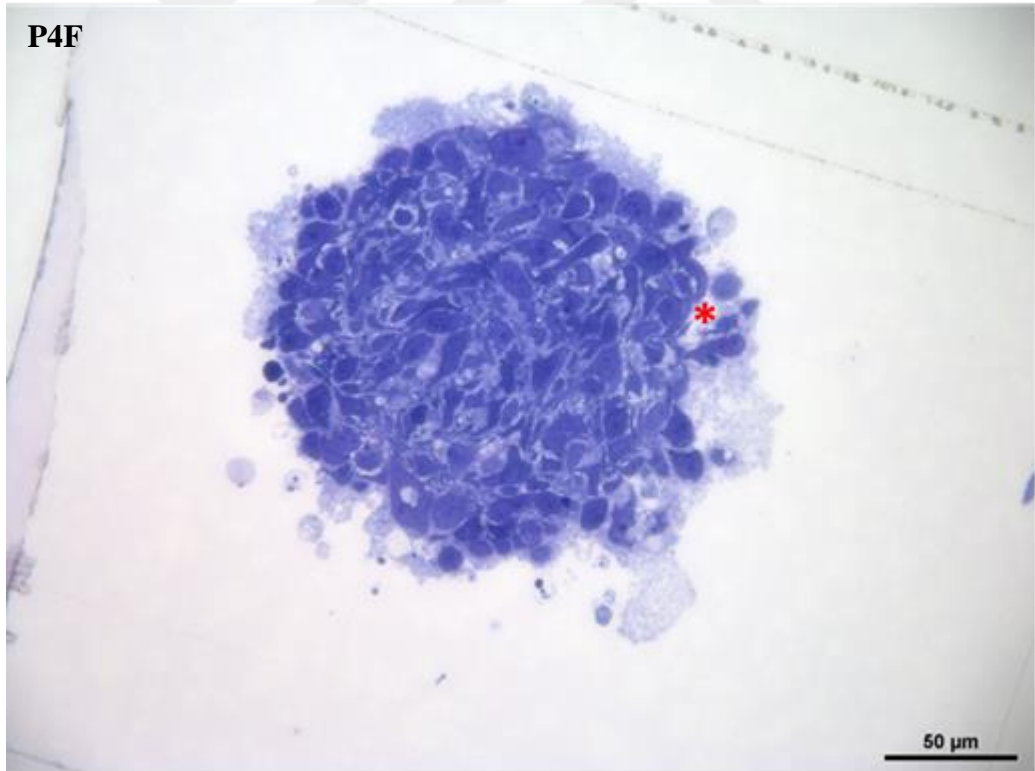
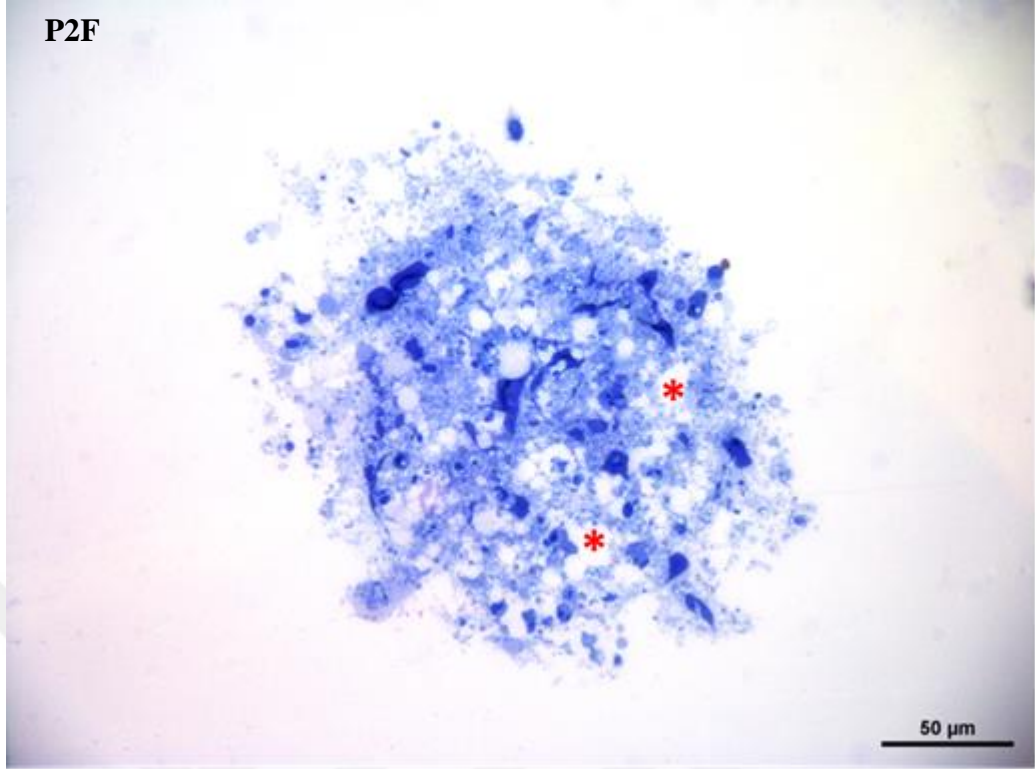
Şekil 6.67 3D kültür modelinde LNCaP hücrelerinden yarı ince kesitler. Apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X



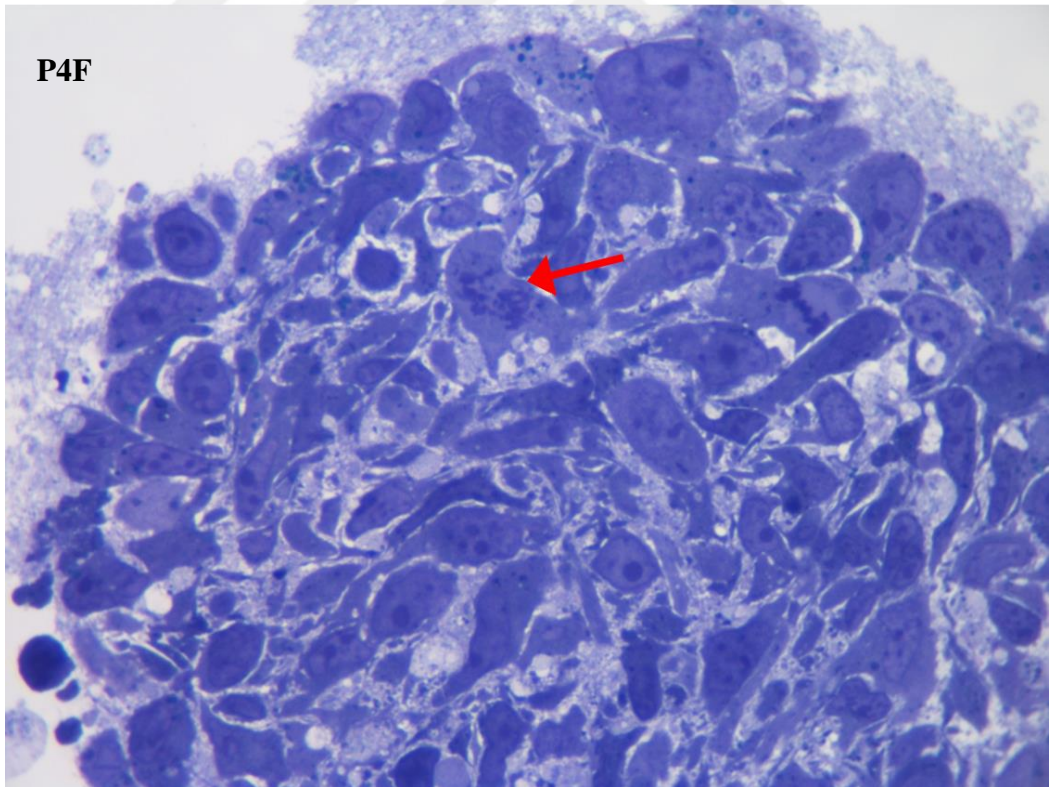
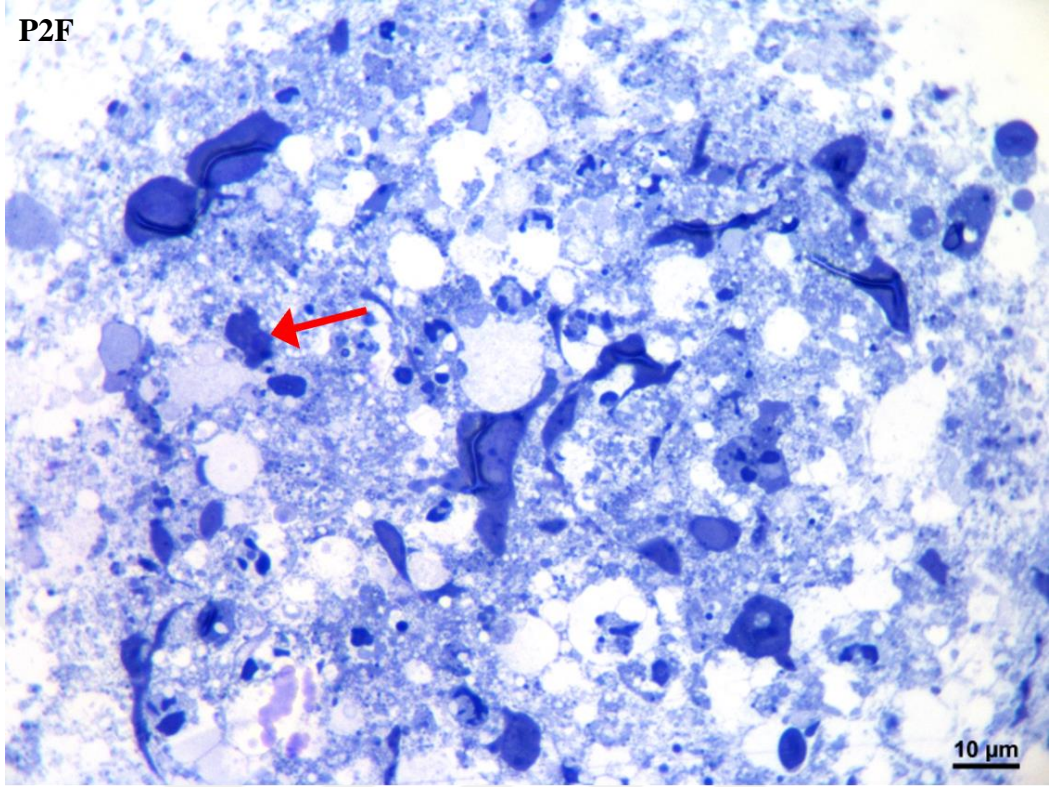
Şekil 6.68 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X



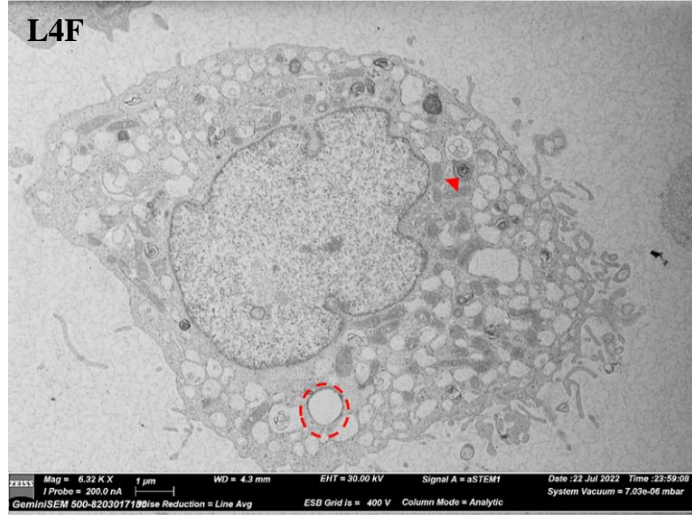
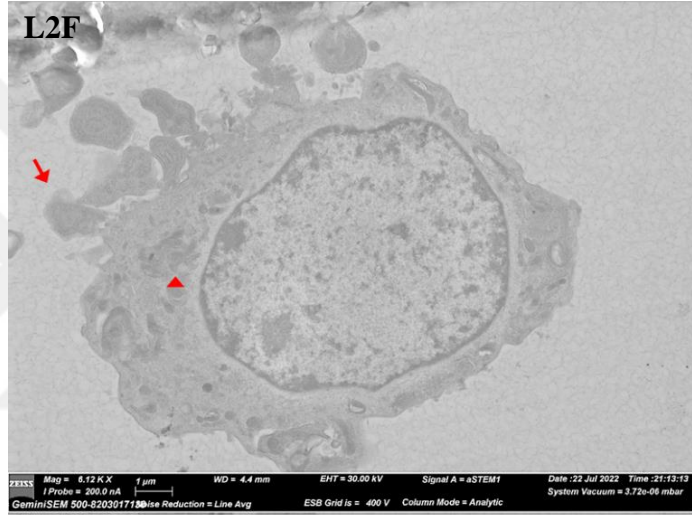
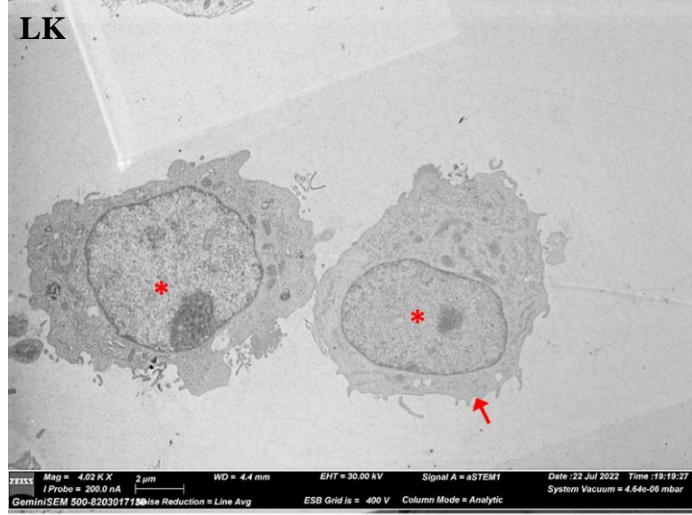
Şekil 6.69 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Normal morfolojiye sahip bölünmekte olan PC3 hücresi (yeşil ok), apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X



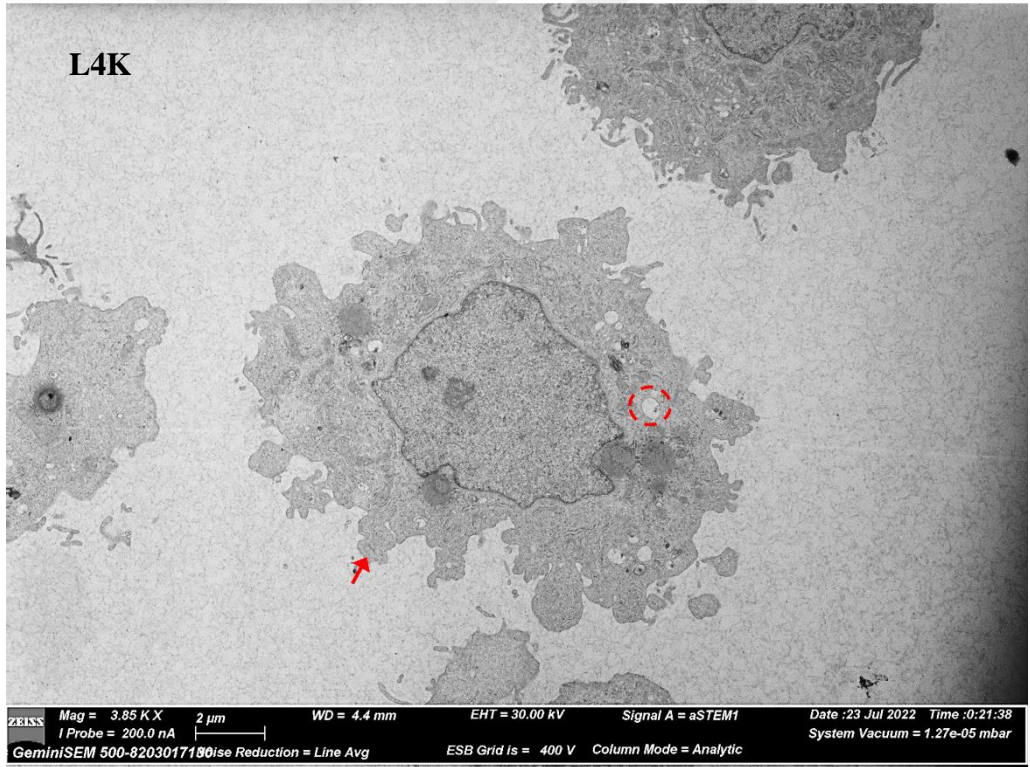
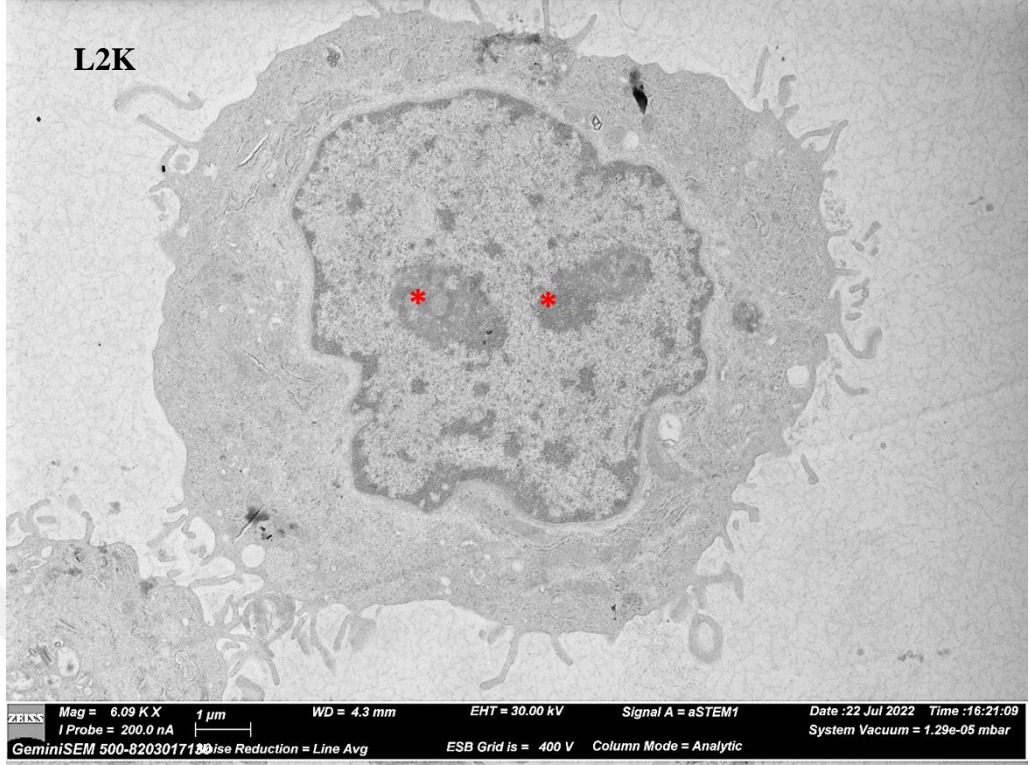
Şekil 6.70 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Hücreler arası bağlantıların koparak sferoid içinde oluşturduğu lakunar alanlar (kırmızı yıldız). Büyütme: 40X



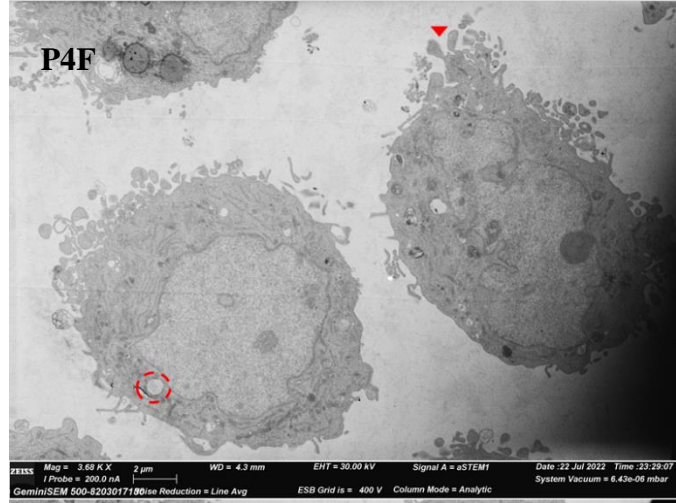
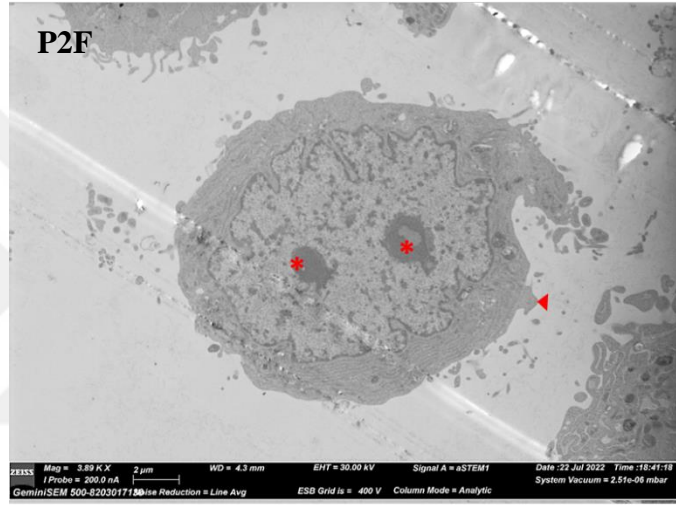
Şekil 6.71 3D kültür modelinde PC3 hücrelerinden yarı ince kesitler. Apoptotik hücre (kırmızı ok). Büyütme: 100X



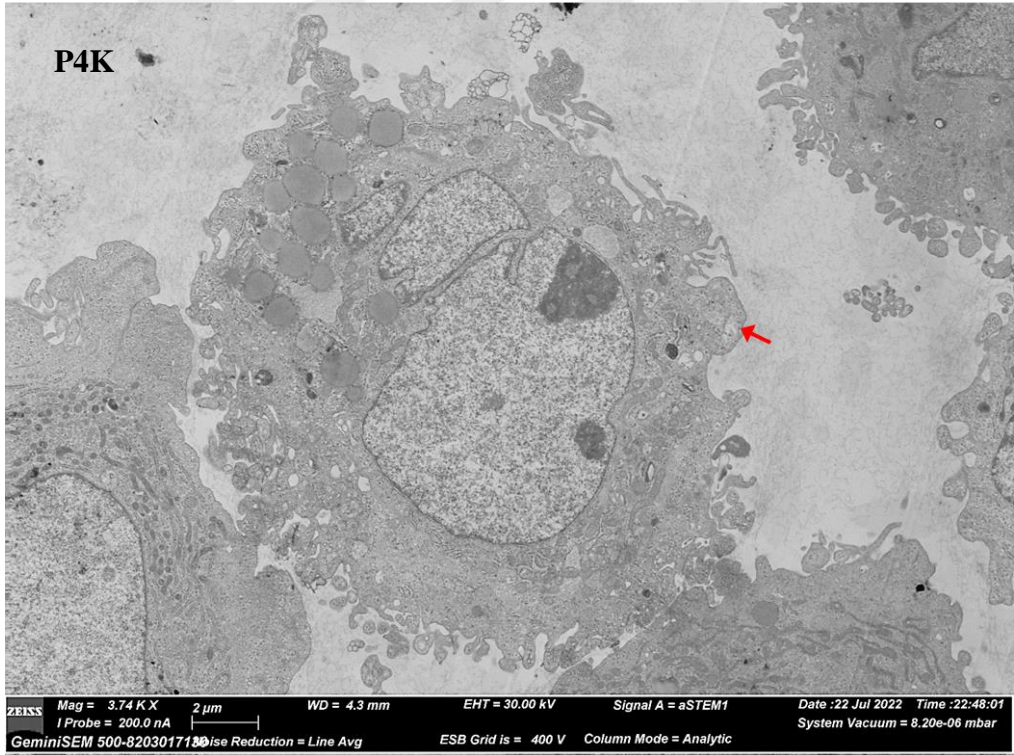
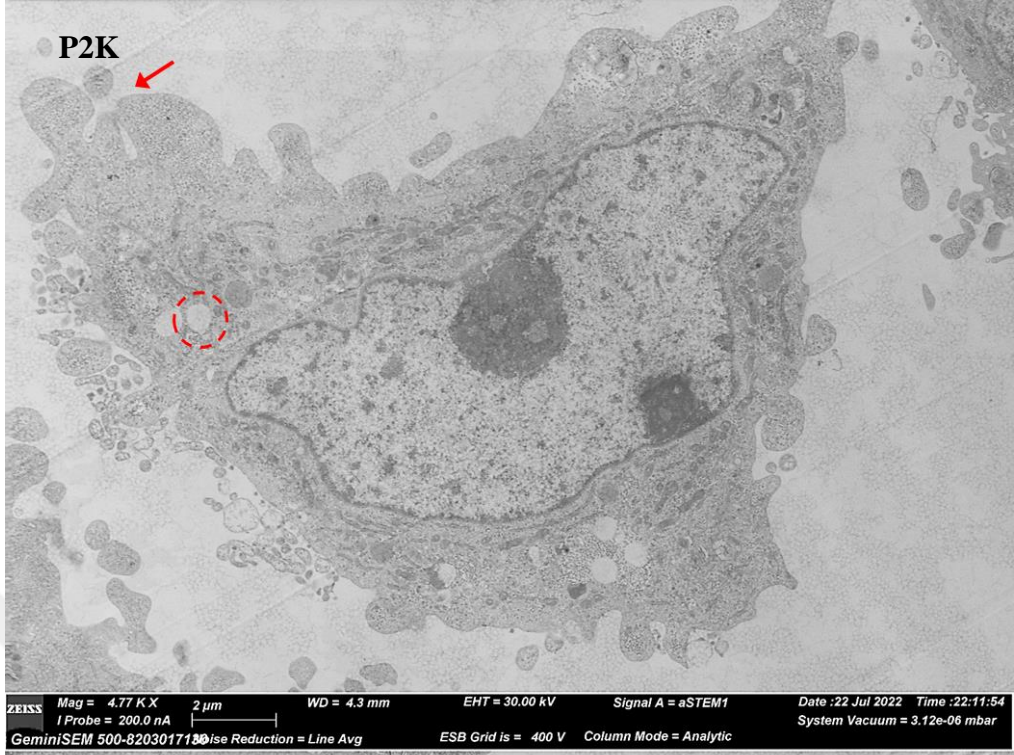
Şekil 6.72 2D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Normal morfolojiye sahip nükleus (kırmızı yıldız) ve normal morfolojiye sahip filopodlar (LK, kırmızı ok), apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), apoptotik tomurcuklanma (L2F, kırmızı ok), vakuol (kırmızı kesikli daire),



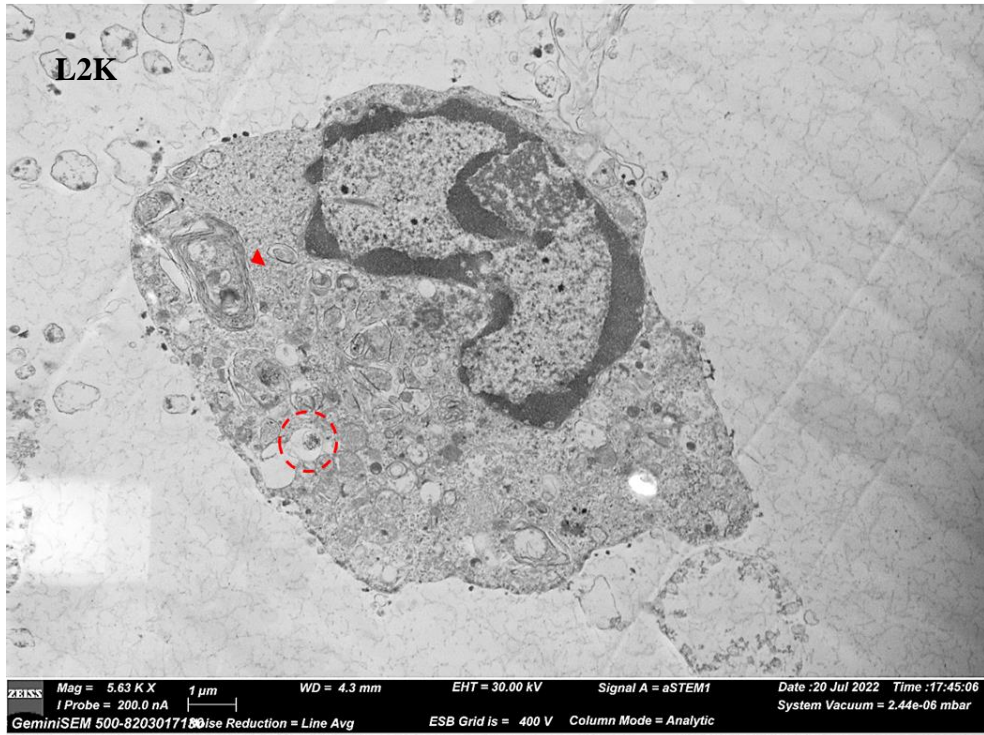
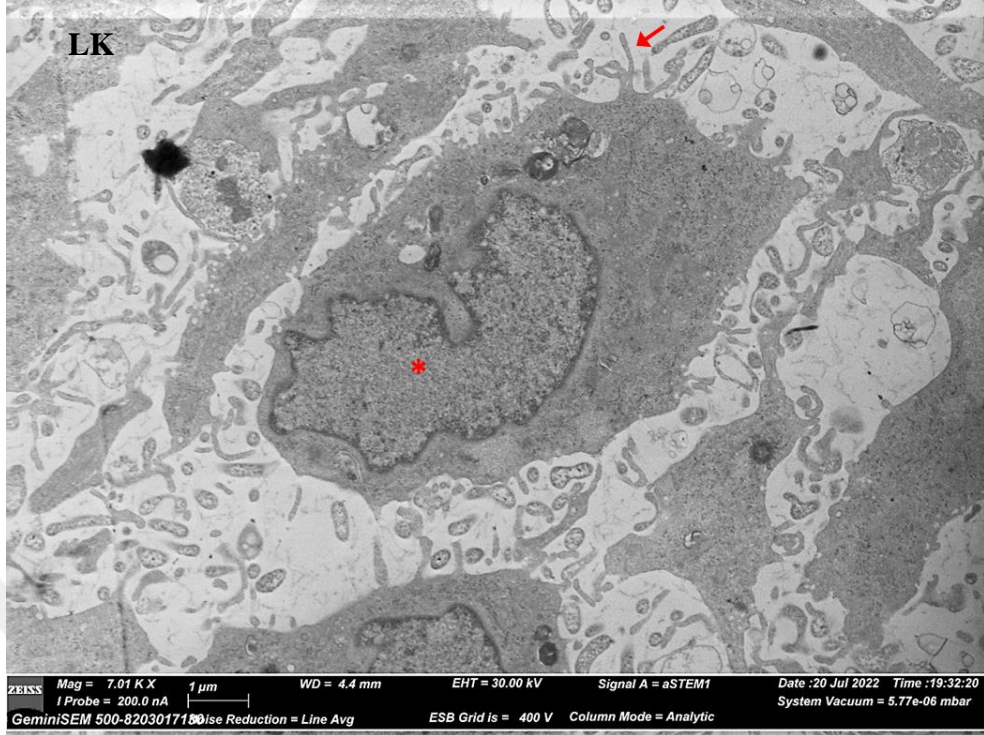
Şekil 6.73 2D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Çift nukleolus (kırmızı yıldız), vakuol (kırmızı kesikli daire), hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok)



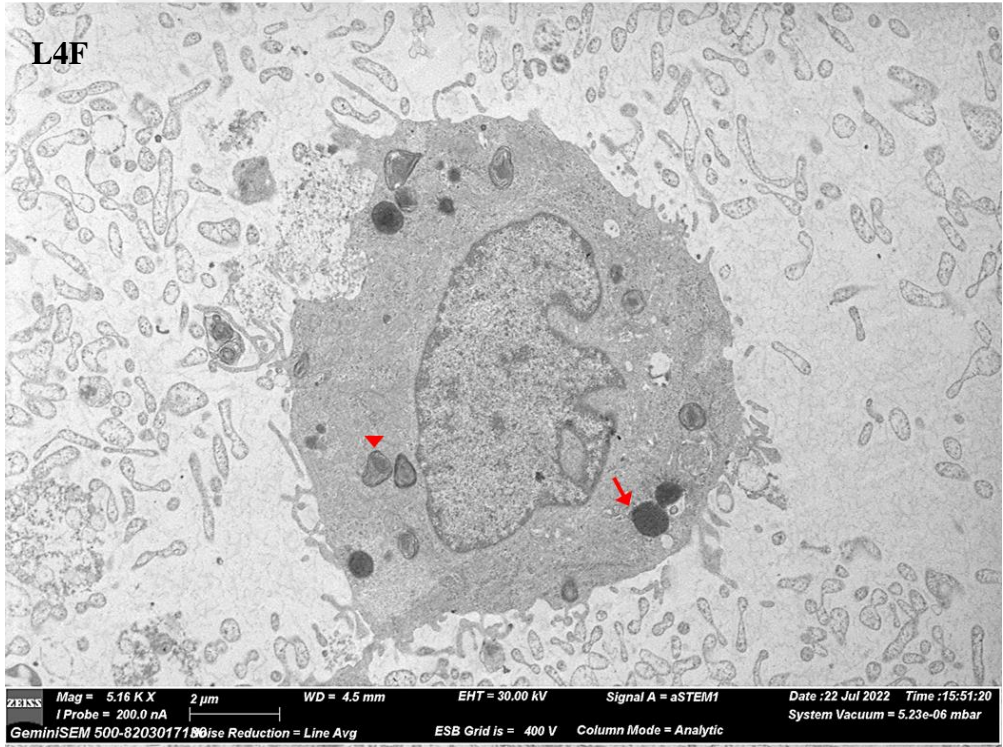
Şekil 6.74 2D kültür modelinde PC3 hücreleri. Normal morfolojiye sahip filopodlar (kırmızı ok), çift nukleolus (kırmızı yıldız), hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok), vakuol (kırmızı kesikli daire)



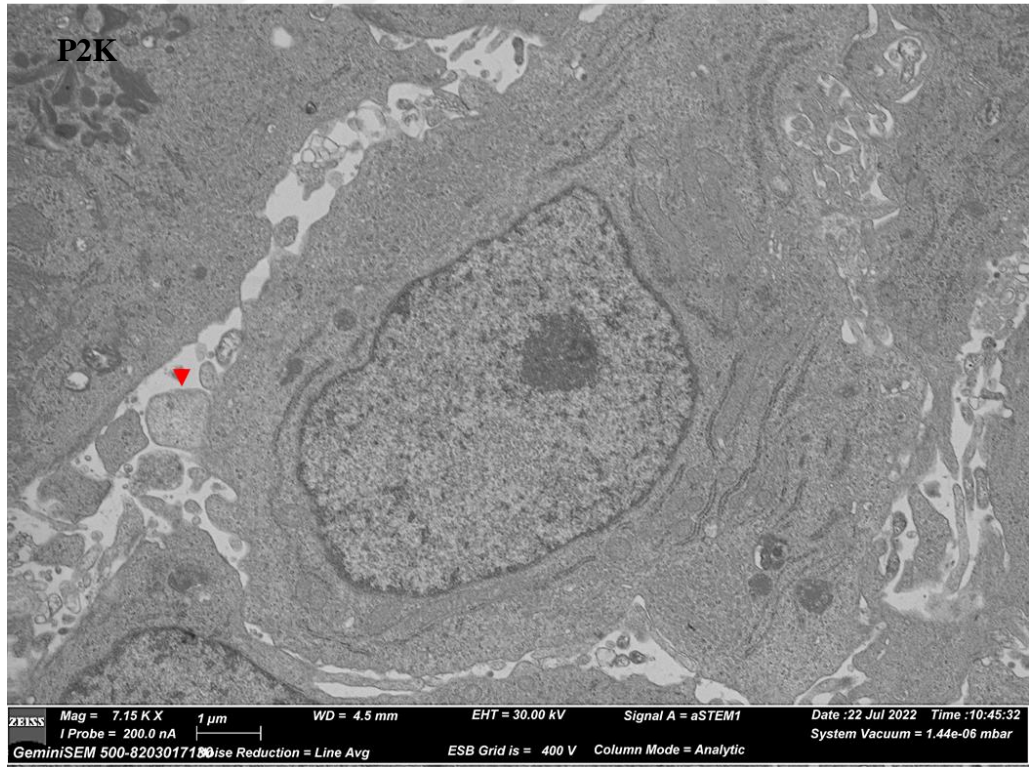
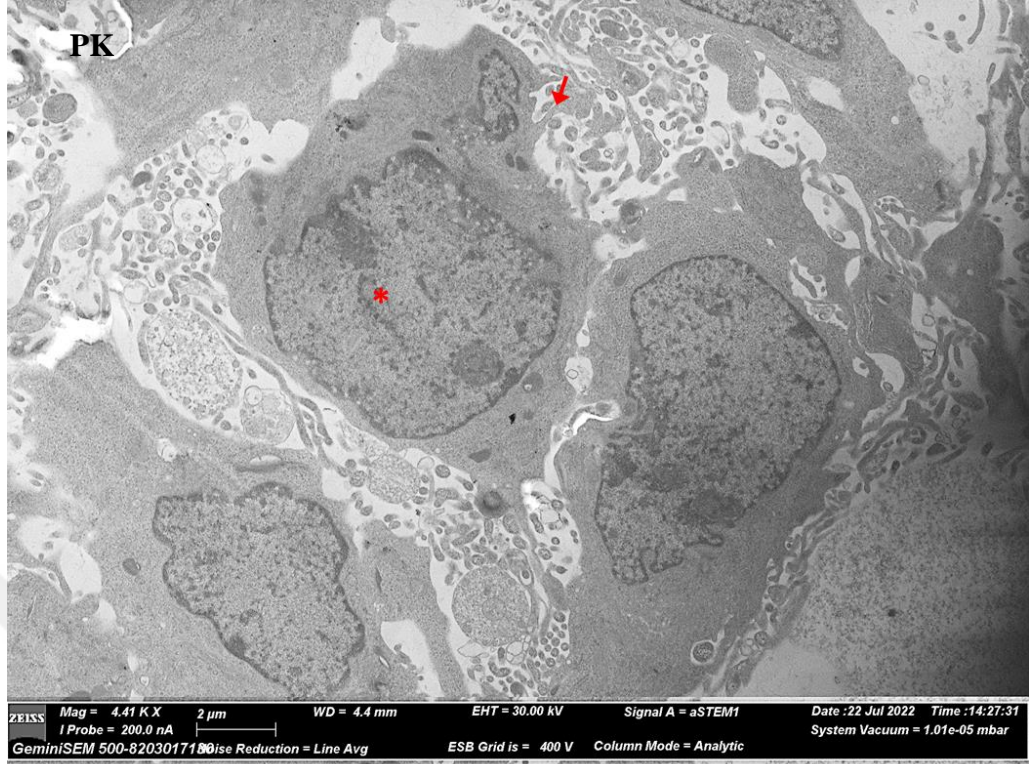
Şekil 6.75 2D kültür modelinde PC3 hücreleri. Hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok), vakuol (kırmızı kesikli daire)



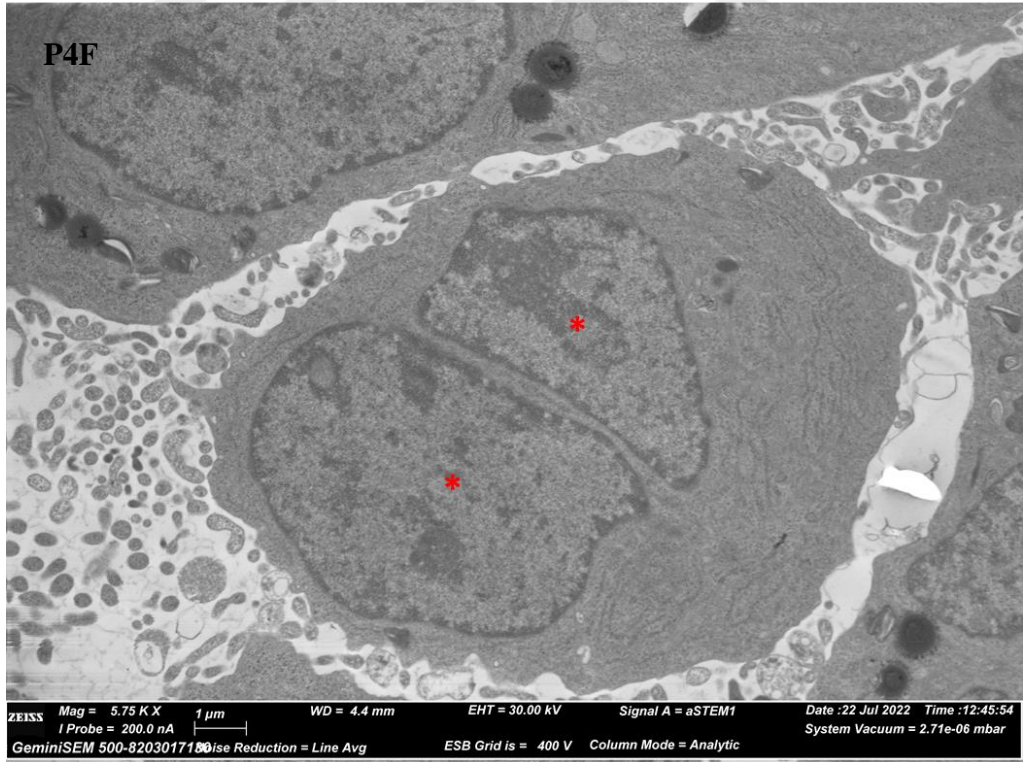
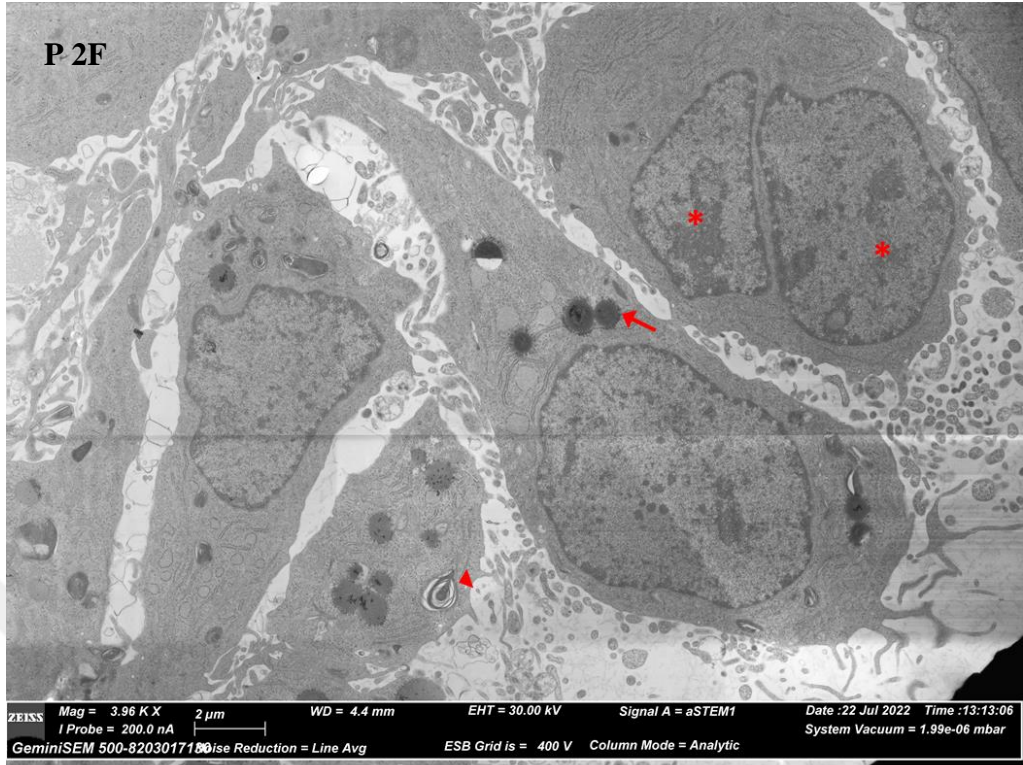
Şekil 6.76 3D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Normal morfolojiye sahip filopodlar (kırmızı ok), Normal morfolojiye sahip nukleus (kırmızı yıldız), apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), vakuol (kırmızı kesikli daire)



Şekil 6.77 3D kültür modelinde LNCaP hücreleri. Apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), apoptotik cisimler (kırmızı ok) ve vakuol (kırmızı kesikli daire)



Şekil 6.78 3D kültür modelinde PC3 hücreleri. Normal morfolojiye sahip nükleus (kırmızı yıldız), normal morfolojiye sahip filopod (kırmızı ok), hücre membranında apoptotik tomurcuklanma (kırmızı ok başı)



Şekil 6.79 3D kültür modelinde PC3 hücreleri. Apoptotik lamellar vakuol (kırmızı ok başı), çift nukleolus (kırmızı yıldız), apoptotik cisim (kırmızı ok)

7. TARTIŞMA

Kanser araştırmalarında 3D kültür modellerinin tercih edilmesinin en önemli sebeplerinden biri, kemoterapide klinikte alınan yanıtta benzerlik gösterebilen bir deney modeli olmasıdır (150). Sferoidi oluşturan hücreler, oluşturdukları küresel yapıda farklı derinlikteki alanlara sahip olmaları sebebiyle oksijen, besin, sinyal molekülleri ve metabolitlere eşit derecede maruz kalmamaktadır (22). Bu sebeple ilaç maruziyeti de değişeceğinden 2D kültürde elde edilen sonuçlardan farklı yanıtların ortaya çıkabileceği ve 2D kültüre kıyasla kliniğe daha uyarlanabilir sonuçlar elde edildiği çalışmalarda ifade edilmektedir (144). Literatür ile paralel olarak, çalışmamızın canlılık analizi sonuçlarında her rneğin 3D modelinde elde edilen IC_{50} değerlerinin 2D modelinde elde edilenden IC_{50} değerlerinden 2-3 kat daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 6.1). FBA'nın ileriki çalışmalarında 3D modelde elde edilen IC_{50} değerlerinin kliniğe daha uyarlanabilir olabileceğini düşünmekteyiz.

Kemoterapötik olarak kullanılan antimitotik ajanların en büyük dezavantajının muhtemel toksisite olduğu belirtilmektedir (54, 152). Prostat kanseri hücre hatlarından elde edilen canlılık analizi verilerinin sağlıklı prostat epiteli hücresinden elde edilenlere oranlanmasıyla hesaplanan toksisite oranı, uygulanacak olan IC_{50} değerinin sağlıklı hücreler üzerindeki muhtemel toksisitesi hakkında bilgi sunmaktadır. Yapılan hesaplamalar sonucu Kolşisin'in toksisite değerinin zamanla doğru orantılı arttığını, FBA'nın ise azaldığını görmekteyiz. FBA'nın 24 ve 48 saat PC3 hücrelerine uygulandığı ve 48 saat LNCaP hücrelerine uygulandığı örneklerde toksisite oranının negatif yönde olduğu görülmektedir. Bu süre ve doz uygulamasının sağlıklı hücrede toksisiteye sebep olmadığını kantitatif olarak ortaya koymaktayız. Sonuçlarımızın FBA'nın toksisite deneyi kapsamının derinleştirilmesiyle beraber klinik kullanım için tercih edilebilirliğini arttıracadığını söyleyebiliriz.

3D modelde 48 saat Kolşisin uygulanan PC3 ve LNCaP hücrelerinin canlılık analizlerinde uygulanan dozlardan daha yüksek konsantrasyonda IC_{50} değerleri elde edildi. Dozların artırılarak deneyin tekrarlanması sonucunda da uygulanan dozlardan daha yüksek konsantrasyonda IC_{50} değerleri elde edilmesi zerine Kolşisin'in hücrede daha erken metabolize olabileceği düşünülerek 12 saat maruziyet ile canlılık analizi yapıldı. Kolşisin'in 12 saat uygulandığı hücrelerin canlılık analizlerinde de 48 saatlik sonuçlar ile paralel değerler elde edildi. Kolşisin'in 12 ve 48 saat uygulamalarında

karşılaşılan bu durumun Kolşisin direnci olabileceği düşünüldü. Literatürde örnekleri bulunan Kolşisin direnci hücrelerdeki sinyal mekanizmalarının Kolşisin indüksiyonu ile değişmesi sonucu ilacın antikarsinojen etkisinden hücrenin kaçınabilmesi olarak ifade edilmektedir (147, 153). Kolşisin'in 24 saat uygulandığı 3D kültür modelinde PC3 ve LNCaP sferoidleri ile yapılan tekrarlı deneylerin birinde doz aralığında bulunan IC₅₀ değeri elde edilmesinin üzerine 3D modelde hücrelere bu Kolşisin konsantrasyonları uygulandı. Bu konsantrasyon değerinin bir defa elde edilebilmesinden dolayı, 24 saat uygulanan Kolşisin örneklerinde de ilaca direnç gelişmiş veya gelişmek üzere olduğunu düşünmekteyiz. PC3 ve LNCaP hücrelerinin 24 saat Kolşisin maruziyeti sonucu 2D modelde analiz edilen IC₅₀ değerlerine kıyasla 3D modelde analiz edilen değer daha düşük konsantrasyonda olduğundan 3D modelde Kolşisin uygulanan örneklerin sonuçları düşük doz maruziyetin yol açtığı yanıtlar olarak değerlendirildi. Literatürde Kolşisin'in yüksek ve düşük dozlarda farklı metabolik sonuçlar oluşturabileceğinden bahsedilmektedir (74). FBA uygulanan örneklerde ilaç direnci ile karşılaşılması ilacın metabolik etkisinin devamlılığını ve uzun süreli düşük doz uygulama yönteminde dahi Kolşisin'e tercih edilebileceğini göstermektedir.

Antimitotik kemoterapotiklerin hücrelerin mobilite davranışlarında, hücrenin adaptasyon durumuna bağlı olarak yeniden şekillenmesinde ve birbirleri ile iletişimleri gibi fiziksel yönelimlerinde mikrotübül dinamiğini bozarak değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir (154). Kanser araştırmalarında test edilen antikarsinojenlerin koloni formasyonu üzerine etkileri temel antikarsinojen analizler arasında migrasyon testi ile birlikte yer almaktadır (7, 155, 156). Hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetleri *in vivo* tümörojente davranışı hakkında bilgi sahibi olmayı sağlamaktadır. Ovaryum kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada Borik asit'in koloni formasyonunu inhibe ettiği raporlanmaktadır (157). Koloni formasyon analizi sonuçlarımıza bakıldığında FBA'nın 24 saat uygulandığı her iki kanser hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon etkisi olduğu görüldü (Şekil 6.9, Şekil 6.11). Kolşisin uygulama gruplarında ise sadece PC3 hücre hattında 48 saatlik uygulamanın koloni formasyonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaya yol açtığı görüldü. Kolşisin'in tümörojenteyi daha agresif olan PC3 hücre hattında uygulama süresinin ancak 48 saate yükseltildiğinde engellediği söylenebilmektedir. FBA'nın ise

tümörojenite üzerine inhibitör etkisini kısa süreli yüksek doz uygulama yönteminde gösterdiği görülmektedir.

Prostat kanseri tedavileri hakkındaki birçok araştırmanın hastalığın metastatik sürecini durdurmaya yönelik olduğu dikkat çekmektedir (67). Hastalık başlangıçtan itibaren hızlı ilerleyebildiğinden metastatik sürece de kısa sürede girmektedir. Dolayısıyla metastatik mekanizmanın önlenmesi veya aktifliğinin fark edilmesi kritik önem taşımaktadır. Metastatik süreçte kanser hücreleri başta akciğer ve kemik olmak üzere birden fazla dokuya ulaşabilmektedir (55, 158, 159). Bu sebeple hücre göçünün engellenebilmesi hastalığın seyrinde önemli değişikliklere yol açabilmektedir. Literatür doğrultusunda kanser hücrelerinin metastatik davranışını inceleyebilmek için çizik testi olarak bilinen migrasyon analiz yönteminden faydalandı (Şekil 6.12, Şekil 6.14). 2D kültür modelinde yüzeyi kaplayan hücrelerin üzerine pipet ucu yardımıyla çizilerek oluşturulan mesafenin kapanması hücrelerin mobilite davranışlarını incelememizi sağlamaktadır (160). Borik asit ve FBA'nın migrasyona etkisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada kastrasyon bağımsız hücre hattı olan DU-145 üzerinde FBA'nın migrasyonu daha fazla inhibe ettiği raporlanmaktadır (29). Migrasyon verileri analiz edildiğinde 48 saat Kolşisin uygulaması hariç diğer grupların LNCaP hücrelerinde migrasyonu istatistiksel olarak anlamlı derece azalttığı tespit edildi. FBA uygulamasının 24 saatte 48 saate kıyasla daha fazla inhibisyon etkisi gösterirken, Kolşisin'in 24 saat uygulanması migrasyonu daha fazla inhibe etmektedir. LNCaP hücrelerinde FBA uygulamasının migrasyonu Kolşisin'den daha fazla inhibe ettiği görülmektedir. PC3 hücrelerinde ise FBA ve Kolşisin'in 24 ve 48 saat uygulandığı örneklerde migrasyonun istatistiksel olarak anlamlı derece azaldığı tespit edildi. FBA ve Kolşisin'in etkilerini karşılaştırdığımızda 48 saatlik uygulamada Kolşisin'in 24 saat uygulandığı gruba kıyasla migrasyonu önleme etkisinin azaldığı görülmektedir. FBA'da ise bu oran 24 ve 48 saat uygulama gruplarında sabit olarak %50'nin altında seyretmektedir. Bu doğrultuda, PC3 ve LNCaP hücrelerinde Kolşisin'in zamanla migrasyon inhibitör etkisini yitirmiş olabileceği düşünülmektedir.

2D kültür modelinde koloni ve migrasyon analizlerine paralel olarak immunofloresan analizlerde 24 saat FBA uygulanan PC3 ve LNCaP hücrelerinde JNK ekspresyon oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptandı (Şekil 6.56, Şekil 6.57). 3D kültür modelinde ise LNCaP hücrelerinde 24 saat FBA uygulamasında

da JNK ekspresyon oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. 24 saat FBA uygulamasının LNCaP hücrelerinin her iki kültür modelinde de JNK ekspresyon oranında azalmaya sebep olmasından dolayı JNK ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi olabileceği ifade edilebilmektedir. 3D kültür modelinde 24 saat FBA uygulamasında JNK ekspresyon oranındaki azalmayla birlikte p38 ekspresyon oranında istatistiksel olarak anlamlı derece artış göstermesi LNCaP hücrelerinin stres aktivasyonunda p-38 aracılı apoptotik yanıt oluşturduğunu ifade edebilmektedir Şekil 6.58. 2D kültür modelinde FBA'nın LNCaP hücrelerinde p38 ekspresyon oranında süre ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği görülmektedir. 3D kültür modelinde ise FBA maruziyeti LNCaP hücrelerinde p38 ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. 2D ve 3D model arasında LNCaP hücrelerinin FBA maruziyetine karşı farklı metabolik yanıtlar gösterdiği söylenebilmektedir. PC3 hücrelerinde ise her iki modelde de FBA maruziyetinin p38 ekspresyon oranında artışa sebep olduğu görülmektedir. Bu durumda FBA'nın PC3 hücreleri üzerinde p38 kinaz üzerine direkt etkisi olduğu ifade edilebilmektedir. JNK'nın tümör baskılayıcı rolünden dolayı karsinogenezde tümör hücrelerinin inhibisyonuna uğramaktadır (161). 2D kültür modelinde 24 saat FBA uygulamasında görülen ekspresyon oranındaki azalma prostat kanseri hücrelerinde JNK'nın primer yanıtta baskılandığını fakat 48 saat uygulama süresinde üzerindeki inhibitör etkiden kurtulmuş olabileceğini ifade etmektedir. 2D ve 3D kültür modellerinde FBA'nın süre ile doğru orantılı olarak JNK ekspresyon oranında artışa sebep olduğu görülmektedir. Burdan yola çıkarak FBA'nın LNCaP hücreleri üzerinde direkt JNK aracılı bir etkisi olduğu söylenebilmektedir. PC3 hücrelerinde ise 2D kültür modelinde süre ile bağlantılı olarak JNK ekspresyon oranında artış olduğu görülmektedir. Fakat 3D'de bu şema devam etmediğinden LNCaP hücrelerinde olduğu gibi bir yorum getirilememektedir. Literatürde JNK proteininin sağlıklı hücrede sitoiskelet mimarisini ve mikrotübül dinamiklerini düzenlediği bilgisi yer almaktadır (34). PC3 ve LNCaP hücrelerinde yapılan bir çalışmada JNK aktivasyonundaki azalmanın hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda azalmaya yol açarak hücreleri apoptoza sürüklediği ifade edilmektedir (66). Bu doğrultuda 24 saat FBA uygulama gruplarında koloni ve migrasyon inhibisyonuna JNK ekspresyon oranındaki azalmanın eşlik ediyor olması, FBA'nın mikrotübül dinamiği üzerine etkisini JNK üzerinden gerçekleştirebileceği anlamına gelebilmektedir. Kolomeichuk

ve ark. Tubulin promotör bölgesindeki aktivatör protein (AP-1) bağımlı yolağın c-Jun seviyesi hakkında pozitif geri bildirim oluşturduğunu tespit ettiklerinden dolayı, JNK-mikrotübül arasında bir geri bildirim sarmalı bulunabileceğini ve stres yanıtını bu şekilde oluşturabileceğini ifade etmektedir (162).

Mikrotübül dinamiğini bozan kemoterapötiklerin temel hedeflerinden birinin proliferasyonu önlemek olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda mikrotübül polimerizasyonunu inhibe eden kemoterapötiklerin hücre siklusunda arreste sebep olduğu belirtilmektedir (35, 163). Mitotik aktivite başlamış olsa da sitoskelet desteği olmadığından ve başka metabolik sinyalizasyon değişikliklerinden dolayı kanser hücresi proliferasyonu tamamlayamamaktadır. Literatürde FBA'nın ve Borik asit'in prostat kanser hücreleri de dahil olmak üzere kanser hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği yönünde ifadeler yer almaktadır (28, 29, 36, 90). Kolşisin'in bilinen anti-mitotik etkisinin yanında proliferasyon artışına sebep olduğu da ifade edilmektedir (149, 164) Proliferasyon analizi sonuçlarında Kolşisin uygulanan LNCaP ve PC3 hücrelerindeki proliferasyon artışının, Kolşisin'in medyadaki etkinliğini yitirerek hücrelerde sebep olduğu kompensatuar etkinin sonucu olabileceği düşünülmektedir. 3D kültür modelinde PC3 ve LNCaP hücrelerine karşılaşılan ilaç direnci durumu bu veriyi desteklemektedir. 2D kültür modeline yalnızca proliferasyon analizlerinde görebildiğimiz bu etkiyi, 3D modelde değişen hücresel yanıt sonucu canlılık analizlerinde de karşılaştığımız göz önünde bulundurulduğunda, 3D modelde daha açıkça ortaya konduğu söylenebilmektedir.

Çalışmamızın proliferasyon analizlerinde FBA uygulamasının 3D kültür modelinde prostat kanseri hücrelerinde proliferasyonu %80-90 oranlarında inhibe ettiği görülmektedir (Tablo 6.3). 2D proliferasyon analizleri ile karşılaştırıldığında en yüksek farkın LNCaP hücrelerinde olduğu görülmektedir (Şekil 6.16, Şekil 6.17, Şekil 6.20, Şekil 6.21). LNCaP sferoidlerinde FBA uygulamasının proliferasyonu önemli oranda inhibe ettiği söylenebilmektedir. LNCaP sferoidlerinde ERK ekspresyon oranındaki istatistiksel olarak anlamlı azalmanın proliferasyon analizi sonucu ile korelasyon gösterdiği görülmektedir. P38 ekspresyon oranındaki istatistiksel olarak anlamlı artışın ise LNCaP hücrelerinde proliferasyonun ERK aracılı inhibe edilerek ortaya çıkan apoptozda p38'in rolü olabileceğini düşündürmektedir. Benzer moleküler şema 24 saat Kolşisin ve 48 saat FBA uygulanan PC3 hücrelerinin 3D

modelinde de rastlanmaktadır. Burada da oluşan proliferasyon inhibisyonunun ERK üzerinden, apoptozun ise p38 aracılı bir yol izliyor olabileceği söylenebilmektedir. FBA yol açtığı bu moleküler şemanın LNCAP hücrelerinde 24 saat, PC3 hücrelerinde ise 48 saat uygulama sonucunda ortaya çıkmış olması iki hücre hattındaki uygulama farkının gerekliliğini ortaya koymaktadır. 2D kültür modelinde uygulanan kemoterapötiklerin LNCaP hücrelerinde süreye bağımlı ERK ekspresyonunda azalmaya yol açtığı görülmektedir. Hücrelerin zamanla FBA maruziyeti arttıkça ERK aracılı metabolik yanıtta değişikliğe gitmiş olabileceği söylenebilmektedir. PC3 hücrelerinin 2D ve 3D kültürde ERK yanıtlarına bakıldığında; 2D modelde FBA'nın ERK aracılı etkisini süre ile bağımlı olarak artırdığı görülürken, 3D modelde tam tersi şekilde ERK ekspresyon oranında azalma olduğu görülmektedir. Bu iki farklı etki hücrelerin 2D ve 3D modelde FBA maruziyetine karşı ERK proteini üzerinden farklı yanıtlar oluşturduğunu ifade etmektedir. ERK ekspresyon oranı analizlerinde 3D L2K ve 2D P4K gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olduğu görüldü (Şekil 6.54, Şekil 6.55). Farklı örnek gruplarında aynı moleküler yanıtla karşılaşılması hücrelerin metabolik farklılıklarını ortaya koymaktadır. Kolşisin gibi mikrotübül yapısını bozan ajanların ERK aktivasyonuna yol açtığı da literatür bilgisi arasında yer almaktadır (165, 166). ERK ekspresyon oranındaki artış Kolşisin'in hücrelerde ERK aracılı apoptoz, migrasyon veya invazyon gibi başka moleküler yanıtları aktive etmiş olabileceğini ifade etmektedir. Bu örneklerde p38 ekspresyon oranında artış olmaması, literatürde LNCAP ve PC3 hücrelerinde örneğine rastlanılan, hücrelerin apoptotik yanıtlarını ERK aracılı gerçekleştirdiğini düşündürmektedir (66). Bir diğer yandan ERK MAPK proteininin hücre içindeki birden fazla uyarıcı ve MAPKK tarafından ayrıca aktive edildiği belirtilmektedir (110, 167). DU-145 hücrelerinde yapılan bir çalışmada apoptotik indüksiyonun fosforile ERK miktarını artırdığı raporlanmaktadır (36). Proliferasyon analizi sonuçlarında 2D ve 3D model karşılaştırıldığında LNCaP hücrelerinde 3D modelde görülen istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon artışı PC3 hücrelerinde daha az oranda seyretmektedir. Bu durumun PC3 hücrelerinin sahip olduğu metastatik kabiliyet, yüksek metabolik aktivite ve iyi adaptasyon yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kemoterapötik uygulamalarının yol açtığı koloni formasyonundaki, migrasyon davranışlarındaki, proliferatif yönlerdeki değişiklikler ve moleküler metabolik yanıtların

yanı sıra kanser hücrelerinde yol açtığı morfolojik değişiklikler ultrastrüktürel düzeyde incelendi. FBA'nın prostat kanser hücrelerinde oluşturduğu bozulmuş nukleus ve hücre membranı, apoptotik kesecik oluşumu, filopod yapılarında bozulmalar, vakuolizasyon ve lameller vakuol birikimi gibi hücre ölümünü ifade eden ultrastrüktürel belirteçlerin ilk mikrografları çalışmamızda yer almaktadır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda antimitotik kemoterapötiklerin yol açtığı antikarsinojen etkiler farklı hücrelerde, farklı doz ve sürelerde farklı metabolik yanıtlar gösterebilmektedir. Bu durum hücrelerin androjen reseptörü bulundurup bulundurmamasına bağlı olmakla beraber yol açtığı sinyal mekanizmalarındaki farklılıklar ve uyaran çeşitliliğinden kaynaklanıyor olabilmektedir. Dolayısıyla prostat kanseri hakkında yapılacak araştırmalarda kastrasyon bağımlı ve kastrasyon dirençli metabolik sinyal mekanizmalarının birlikte araştırılması doğru terapinin uygulanabilmesi için önem arz etmektedir.

8. SONUÇ

FBA'nın 2D ve 3D kültür modellerinde prostat kanseri hücreleri üzerinde antimitotik etkisi bulunduğu gösterilmektedir. Koloni formasyonunda gerileme, migrasyon ve proliferasyon inhibisyonu gibi temel antikarsinojen etkilere sahip olduğu raporlanmaktadır. Sağlıklı prostat hücre hattında yapılan canlılık analizleri ile FBA'nın Kolşisin'e kıyasla sahip olduğu düşük toksisite ortaya konmaktadır. Antikarsinojen etkisini göstermek üzere prostat kanseri hücrelerinde ERK, JNK ve p38 sinyalizasyonunda sebep olduğu değişiklikler ile birlikte değerlendirildiğinde MAPK proteinleri hedefli kombine tedaviler için avantajlı bir alternatif olabilmektedir. Her iki mikrotübül polimerizasyon inhibitör ajanının da antikarsinojenik etkileri göz önüne alındığında toksisite ve sürdürülebilir etki açısından FBA'nın daha güvenilir sonuçlar verdiği söylenebilmektedir. Klinik kullanımda Kolşisin'in dezavantajları literatürde yer almaktadır. Bu dezavantajlardan dolayı yeni ve benzer özellikteki alternatif kemoterapötiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın 48 saat Kolşisin uygulamasında sferoid oluşturulamaması, RWPE-1 hücrelerinde sferoid oluşturulamaması, her bir MAPK yolağına ait tüm kinazların birlikte değerlendirilememiş olmaması ve sferoidlerin clearing yöntemi kullanılarak daha iyi görüntülenememiş olması gibi limitasyonları göz önünde bulundurulsa da, klinik kullanım açısından FBA'nın umut vaat edici bir antikarsinojenik ajan olduğu söylenebilmektedir.

9. KAYNAKLAR

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, .. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*; 72,7–33, 2022.
- [2] Palmberg C, Koivisto P, Visakorpi T. PSA decline is an independent prognostic marker in hormonally treated prostate cancer. *Eur Urol*; 36,191–196, 1999.
- [3] EAU Guidelines: Prostate Cancer | Uroweb, <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/#11> (2 , 2020).
- [4] Berish RB, Ali AN, Telmer PG, .. Translational models of prostate cancer bone metastasis. *Nat Rev Urol*; 15,403, 2018.
- [5] Wang J, Rizvi SMA, Madigan MC, .. Overexpression of E-Cadherin and b-Catenin Proteins in Metastatic Prostate Cancer Cells in Bone. *Prostate*; 67,1384–1396, 2007.
- [6] Kochuparambil ST, Al-Husein B, Goc A, .. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression. *J Pharmacol Exp Ther*; 336,496–505, 2011.
- [7] Qin M, Peng S, Liu N, . LG308, a novel synthetic compound with antimicrotubule activity in prostate cancer cells, exerts effective antitumor activity. *J Pharmacol Exp Ther*; 355,473–483, 2015.
- [8] Ramjan A, Hossain M, Runa JF, . Evaluation of thrombolytic potential of three medicinal plants available in Bangladesh, as a potent source of thrombolytic compounds. *Avicenna journal of phytomedicine*; 4,430–6, 2014.
- [9] Hwang EY, Huh J-W, Choi M-M, . Inhibitory effects of gallic acid and quercetin on UDP-glucose dehydrogenase activity. *FEBS Lett*; 582,3793–3797, 2008.
- [10] Kaur M, Velmurugan B, Rajamanickam S, . Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice. *Pharm Res*; 26,2133–2140, 2009.
- [11] George K, Thomas NS, Malathi R. Modulatory Effect of Selected Dietary Phytochemicals on Delayed Rectifier K⁺ Current in Human Prostate Cancer

- Cells. *J Membr Biol*; 252,195–206, 2019.
- [12] Yang SX, Polley E, Lipkowitz S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. *Cancer Treat Rev*; 45,87–96, 2016.
- [13] Abbott A. Biology's new dimension. *Nature*; 424,870–872, 2003.
- [14] Sherin L, Sohail A, Shujaat S. Time-dependent AI-Modeling of the anticancer efficacy of synthesized gallic acid analogues. *Comput Biol Chem*; 79,137–146, 2019.
- [15] Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, . *Phosphorylation of Akt (Ser 473) is an Excellent Predictor of Poor Clinical Outcome in Prostate Cancer*. 2004.
- [16] Le Page C, Koumakpayi IH, Alam-Fahmy M, . Expression and localisation of Akt-1, Akt-2 and Akt-3 correlate with clinical outcome of prostate cancer patients. *Br J Cancer*; 94,1906–1912, 2006.
- [17] Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*; 3,1172–1184, 2008.
- [18] Riedl A, Schleder M, Pudelko K, . Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. 2017. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1242/jcs.188102.
- [19] Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, . Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep*; 33,1837–1843, 2015.
- [20] Haisler WL, Timm DM, Gage JA, . Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc*; 8,1940–1949, 2013.
- [21] Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, . World Health Organization reference values for human semen characteristics * ‡. *Hum Reprod Update*; 16,231–245, 2010.
- [22] Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*; 9,6, 2018.
- [23] Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, . 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv*; 34,1427–1441, 2016.
- [24] Penland JG. *Dietary Boron, Brain Function, and Cognitive Performance*.

1994.

- [25] T.Barranco W, Paul FH, Eckhert CD. Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*; 18,71–77, 2007.
- [26] Li X, Wang X, Zhang J, . Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment. *Nat Commun*; 2017. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1038/ncomms13936.
- [27] Marasovic M, Ivankovic S, Stojkovic R, . In vitro and in vivo antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells. 2017. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1080/14756366.2017.1384823.
- [28] Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, . Boron Supplementation Inhibits the Growth and Local Expression of IGF-1 in Human Prostate Adenocarcinoma (LNCaP) Tumors in Nude Mice. *Toxicol Pathol*; 32,73–78, 2004.
- [29] McAuley EM, Bradke TA, Plopper GE. Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell Adh Migr*; 5:5,382–386, 2011.
- [30] Psurski M, Łupicka-Słowik A, Adamczyk-Woźniak A, . Discovering simple phenylboronic acid and benzoxaborole derivatives for experimental oncology – phase cycle-specific inducers of apoptosis in A2780 ovarian cancer cells. *Invest New Drugs*; 37,35–46, 2019.
- [31] Kaur R, Kaur G, Gill RK, . Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur J Med Chem*; 87,89–124, 2014.
- [32] Mukhtara E, Adhamia VM, Sehib M, . Dietary flavonoid fisetin binds to β -tubulin and disrupts microtubule dynamics in prostate cancer cells. *Cancer Lett*; 367,173–183, 2015.
- [33] Darcy Bates C, Bates D, Eastman A. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *Br J Clin Pharmacol*; 83,255–268, 2017.
- [34] Stone AA, Chambers TC. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3

- carcinoma cells. *Exp Cell Res*; 254,110–119, 2000.
- [35] Shtil AA, Mandlekar S, Yu R, . Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene*; 18,377–384, 1999.
- [36] Barranco WT, Eckhert CD. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *Br J Cancer*; 94,884–890, 2006.
- [37] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*; 69,7–34, 2019.
- [38] Key Statistics for Prostate Cancer | Prostate Cancer Facts, <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/key-statistics.html> (1 , 2022).
- [39] Wang G, Zhao D, Spring DJ, . Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*; 32,1105–1140, 2018.
- [40] Ahmad I, Sansom OJ, Leung HY. Advances in mouse models of prostate cancer. *Expert Rev Mol Med*; 10,1–20, 2008.
- [41] Cunha GR, Foster B, Thomson A, . Growth factors as mediators of androgen action during the development of the male urogenital tract. *World J Urol*; 13,264–276, 1995.
- [42] Djakiew D. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate*; 42,150–160, 2000.
- [43] Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol Suppl*; 79,18–26, 1997.
- [44] AF Olumi, GD Grossfeld, SW Hayward, PR Carroll, GR Cunha PH and TT. *Carcinoma-associated fibroblasts stimulate tumor progression of initiated human epithelium*, <http://breast-cancer-research.com/supplements/2/S1>.
- [45] Body JJ, Casimiro S, Costa L. Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome. *Nat Rev Urol*; 12,340–356, 2015.
- [46] Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *GENES Dev*; 14,2410–2434, 2000.
- [47] Toivanen R, Shen MM. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*; 144,1382–1398, 2017.
- [48] Berquin IM, Min Y, Wu R, . Expression signature of the mouse prostate. *J*

- Biol Chem*; 280,36442–36451, 2005.
- [49] Wu X, Gong S, Roy-Burman P, . Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocrine-Related Cancer* (2013); 20,R155–R170, 2013.
- [50] Wach S, Brandl M, Borchardt H, . Exploring the MIR143-UPAR Axis for the Inhibition of Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acid*; 16,272–283, 2019.
- [51] Veine DM, Yao H, Stafford DR, . A D-amino acid containing peptide as a potent, noncovalent inhibitor of $\alpha 5\beta 1$ integrin in human prostate cancer invasion and lung colonization. *Clin Exp Metastasis*; 31,379–393, 2014.
- [52] Cunha GR, Vezina CM, Isaacson D, . Development of the human prostate. *Differentiation*; 103,24, 2018.
- [53] Liu KC, Huang AC, Wu PP, . Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways. *Oncol Rep*; 26,177–184, 2011.
- [54] Huang H, Li LJ, Zhang HB, . Papaverine selectively inhibits human prostate cancer cell (PC-3) growth by inducing mitochondrial mediated apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of NF- κ B/PI3K/Akt signalling pathway. *J BUON*; 22,112–118, 2017.
- [55] Dehghani M, Kianpour S, Zangeneh A, . CXCL12 Modulates Prostate Cancer Cell Adhesion by Altering the Levels or Activities of $\alpha 5\beta 1$ -Containing Integrins. 2014. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1155/2014/981750.
- [56] Huggins C, Hodges C V. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol*; 168,9–12, 2002.
- [57] Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, . Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells*; 8,74, 2019.
- [58] Ravelli RBG, Gigant B, Curmi PA, . Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*; 428,198–202, 2004.
- [59] Keer HN, Kozlowski JM, Tsai YC, . Elevated transferrin receptor content in

- human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. *J Urol*; 143,381–385, 1990.
- [60] Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, . Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. *Mol Cell Biochem*; 126,151–158, 1993.
- [61] Shi XB, Nesslinger NJ, Deitch AD, . Complex functions of mutant p53 alleles from human prostate cancer. *Prostate*; 51,59–72, 2002.
- [62] Connolly JM, Rose DP. Production of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha by the androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cell line. *Prostate*; 16,209–218, 1990.
- [63] Lorenzo PI, Saatcioglu F. Inhibition of Apoptosis in Prostate Cancer Cells by Androgens Is Mediated through Downregulation of c-Jun N-terminal Kinase Activation 1. *Neoplasia*; 10,418–428, 2008.
- [64] Tomaszewski MR, Gonzalez IQ, O'Connor JPB, . Oxygen enhanced Optoacoustic Tomography (OE-OT) reveals vascular dynamics in murine models of prostate cancer. *Theranostics*; 7,2900–2913, 2017.
- [65] Seim I, Jeffery PL, Thomas PB, . Whole-Genome Sequence of the Metastatic PC3 and LNCaP Human Prostate Cancer Cell Lines. 2017. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1534/g3.117.039909.
- [66] Lim W, Jeong M, Bazer FW, . Coumestrol Inhibits Proliferation and Migration of Prostate Cancer Cells by Regulating AKT, ERK1/2, and JNK MAPK Cell Signaling Cascades. *J Cell Physiol*; 232,862–871, 2017.
- [67] Schatten H. Brief overview of prostate cancer statistics, grading, diagnosis and treatment strategies. *Adv Exp Med Biol*; 1095,1–14, 2018.
- [68] Chang AJ, Autio KA, Roach M, . High-risk prostate cancer-Classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*; 11,308–323, 2014.
- [69] Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*; 24,1967, 2010.
- [70] Qiao M, Sheng S, Pardee AB. Metastasis and AKT activation. *Cell Cycle*; 7,2991–2996, 2008.
- [71] Heidarian E, Keloushadi M, Ghatreh-Samani K, . Gallic acid inhibits invasion and reduces IL-6 gene expression, PSTAT3, PERK1/2, and pAKT cellular

- signaling proteins in human prostate cancer DU-145 cells. *Int J Cancer Manag*; 10, 2017. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.5812/ijcm.9163.
- [72] Esfandiar Heidarian MK. Antiproliferative and Anti-invasion Effects of Carvacrol on PC3 Human Prostate Cancer Cells through Reducing pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 Signaling Proteins. *Int J Prev Med*; 10,1–5, 2019.
- [73] Odero-Marah V, Hawsawi O, Henderson V, . Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and prostate cancer. *Adv Exp Med Biol*; 1095,101–110, 2018.
- [74] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Reviews*; 4, 2004. Epub ahead of print 2004. DOI: 10.1038/nr1317.
- [75] Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, . Drugs that Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective. *Med Res Rev*; 31,443–481, 2011.
- [76] Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*; 5,773–785, 2005.
- [77] Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9,309–322, 2008.
- [78] Morris PG, Fornier MN. Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clin Cancer Res*; 14,7167–7172, 2008.
- [79] Weisenberg, R. C.; Borisy, G. G.; Taylor EW. *Biochemistry*.
- [80] Borisy, G. G.; Taylor EWJ. *Cell Biology*.
- [81] Peterson JR, Mitchison TJ. Small molecules, big impact: A history of chemical inhibitors and the cytoskeleton. *Chem Biol*; 9,1275–1285, 2002.
- [82] Nagaiah G, Remick SC. Combretastatin A4 phosphate: A novel vascular disrupting agent. *Futur Oncol*; 6,1219–1228, 2010.
- [83] Blamey M. Wild flowers of Britain and Ireland. 482.
- [84] Uppuluri S, Knipling L, Sackett DL, . Localization of the colchicine-binding site of tubulin. *Proc Natl Acad Sci*; 90,11598–11602, 1993.
- [85] Skoufias DA, Wilson L. Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry*; 31,738–746, 1992.
- [86] Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, . High-resolution model of the

- microtubule. *Cell*; 96,79–88, 1999.
- [87] Hastie SB. Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther*; 51,377–401, 1991.
- [88] Kuru, Rüya and AY. Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış/Boron and a Current Overview of its Effects on Health. *Clin Exp Heal Sci*; 7, 2017.
- [89] Bradke TM, Hall C, Carper SW, . Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adh Migr*; 2,153–160, 2008.
- [90] Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett*; 216,21–29, 2004.
- [91] Cyrański MK, Jezińska A, Klimentowska P, . Impact of intermolecular hydrogen bond on structural properties of phenylboronic acid: quantum chemical and X-ray study. *J Phys Org Chem*; 21,472–482, 2008.
- [92] O'Brien LE, Zegers MMP, Mostov KE. Building epithelial architecture: Insights from three-dimensional culture models. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3,531–537, 2002.
- [93] Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7,211–224, 2006.
- [94] Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 8,839–845, 2007.
- [95] Friedrich J, Seidel C, Ebner R, . Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat Protoc*; 4,309–324, 2009.
- [96] Affou M, Laurent L, Ploton D, . Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell–cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant. *Clin Exp Metastasis*; 19,161–168, 2001.
- [97] Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, . Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods*; 4,855–860, 2007.
- [98] Weaver VM, Petersen OW, Wang F, . Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three- dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*; 137,231–245, 1997.

- [99] Abu-Absi SF, Friend JR, Hansen LK, . Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res*; 274,56–67, 2002.
- [100] Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*; 7, 2020. Epub ahead of print 6 مارس, 2020. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00033.
- [101] Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, . Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells. *Cells*; 8,143, 2019.
- [102] Souza AG, Silva IBB, Campos-Fernandez E, . Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Curr Pharm Des*; 24,1689–1694, 2018.
- [103] Tomás-Bort E, Kieler M, Sharma S, . 3D approaches to model the tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Theranostics*; 10,5074–5089, 2020.
- [104] Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, . Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res*; 319,75–87, 2013.
- [105] Koledova Z. 3D cell culture: An introduction. في: *Methods in Molecular Biology*, ص.ص. 1–11.
- [106] Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*; 9,726–735, 1995.
- [107] Avruch J. MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*; 1773,1150–1160, 2007.
- [108] Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *Journal of Biological Chemistry*; 270,14843–14846, 1995.
- [109] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, . Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science (80-)*; 270,1326–1331, 1995.
- [110] Kyriakis JM, Avruch J. *Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation*, <http://physrev.physiology.org> (2001, 22 سبتمبر, 2020).
- [111] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol Mol Biol Rev*; 68,320–344, 2004.

- [112] Choi KC, Auersperg N, Leung PCK. Mitogen-activated protein kinases in normal and (pre)neoplastic ovarian surface epithelium. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1,71, 2003.
- [113] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, . Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*; 1773,1263–1284, 2007.
- [114] Dhillon AS, Hagan S, Rath O, . MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*; 26,3279–3290, 2007.
- [115] Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*; 285,1028–1032, 1999.
- [116] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors*; 24,21–44, 2006.
- [117] Dunn KL, Espino PS, Drobnic B, . The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem cell Biol*; 83,1–14, 2005.
- [118] Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*; 31,268–275, 2006.
- [119] Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y, . ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci*; 97,697–702, 2006.
- [120] Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, . High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*; 17,5588–5597, 1997.
- [121] Mirza AM, Gysin S, Malek N, . Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol*; 24,10868–10881, 2004.
- [122] Sahai E, Olson MF, Marshall CJ. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J*; 20,755–766, 2001.
- [123] Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5,355–366, 2004.
- [124] Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev*; 12,14–21, 2002.
- [125] Singh D, Paduch DA, Schlegel PN, . The production of glial cell line-derived neurotrophic factor by human sertoli cells is substantially reduced in sertoli cell-only testes. *Hum Reprod*; 32,1108–1117, 2017.

- [126] Bubici C, Papa S, Pham CG, . NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle*; 3,1524–1529, 2004.
- [127] Orłowski RZ, Baldwin AS. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med*; 8,385–389, 2002.
- [128] Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, . To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*; 22,8961–8982, 2003.
- [129] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*; 15,11–18, 2005.
- [130] She QB, Ma WY, Dong Z. Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene*; 21,1580–1589, 2002.
- [131] Krens SFG, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett*; 580,4984–4990, 2006.
- [132] Bulavin D V., Fornace AJ. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res*; 92,95–118, 2004.
- [133] Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle*; 5,824–828, 2006.
- [134] Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, . Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer*; 97,3017–3026, 2003.
- [135] Goel HL, Li J, Kogan S, . Integrins in prostate cancer progression. DOI: 10.1677/ERC-08-0019.
- [136] Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci*; 2013. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1073/pnas.1300290110.
- [137] LNCaP Cell Line Spheroid Generation and Characterization for HT Assays. *Thermo Fisher Scientific*,
<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/protocols/cell-culture/3-d-cell-culture-protocol/lncap-cell-line-spheroid-generation.html>.
- [138] Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat*; 10,128–134, 2011.
- [139] Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, . Tetrazolium salts and formazan

- products in Cell Biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. 2018,
<http://eprints.gla.ac.uk/158899/http://eprints.gla.ac.uk> (22 مايو, 2022).
- [140] Farfan A, Yeager T, Moravec R, . MULTIPLEXING HOMOGENEOUS CELL-BASED ASSAYS. *CELL NOTES*; 15–18, 2004.
- [141] Corporation P. SELECTING CELL - BASED ASSAYS FOR DRUG DISCOVERY SCREENING Cell-Based Assays for Drug Discovery. 16–21, 2005.
- [142] Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, . 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*; 6,1–11, 2015.
- [143] Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol*; 2109,225–229, 2020.
- [144] Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*; 2,329–333, 2007.
- [145] Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, . Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res*; 77,2722–2734, 2017.
- [146] McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*; 120,5.1.1-5.1.11, 2018.
- [147] Kaushik V, Yakisich JS, Way LF, . Chemoresistance of cancer floating cells is independent of their ability to form 3D structures: Implications for anticancer drug screening. *J Cell Physiol*; 234,4445–4453, 2019.
- [148] Fisher MF, Rao SS. Three-dimensional culture models to study drug resistance in breast cancer. *Biotechnol Bioeng*; 117,2262–2278, 2020.
- [149] Kamath A, Mehal W, Jain D. Colchicine-associated Ring Mitosis in Liver Biopsy and Their Clinical Implications. *J Clin Gastroenterol*; 42, 2008. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31803815b4.
- [150] Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, . Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. *Int J Mol Sci*; 21,1–18, 2020.
- [151] Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical Cancer Models in Tumor

- Biology. *Neoplasia (United States)*; 17,1–15, 2015.
- [152] Patel J, Nguyen SA, Ogretmen B, . mTOR inhibitor use in head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis on survival, tumor response, and toxicity. 2020. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1002/lio2.370.
- [153] Kumar A, Sharma PR, Mondhe DM. Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview. *Anticancer Drugs*; 28,250–262, 2017.
- [154] Yang H, Ganguly A, Cabral F. Inhibition of Cell Migration and Cell Division Correlates with Distinct Effects of Microtubule Inhibiting Drugs. *J Biol Chem*; 285,32242, 2010.
- [155] Yao H, Veine DM, Zeng Z-Z, . Increased potency of the PHSCN dendrimer as an inhibitor of human prostate cancer cell invasion, extravasation, and lung colony formation Optimal cutting temperature FITC Fluorescein isothiocyanate. *Clin Exp Metastasis*; 27,173–184, 2010.
- [156] Arnst KE, Wang Y, Hwang DJ, . A Potent, Metabolically Stable Tubulin Inhibitor Targets the Colchicine Binding Site and Overcomes Taxane Resistance. *Cancer Res*; 78,265–277, 2018.
- [157] Cabus U, Secme M, Kabukcu C, . Boric acid as a promising agent in the treatment of ovarian cancer: Molecular mechanisms. *Gene*; 796–797,145799, 2021.
- [158] Veine DM, Yao H, Stafford DR, . A D-amino acid containing peptide as a potent, noncovalent inhibitor of $\alpha 5 \beta 1$ integrin in human prostate cancer invasion and lung colonization. DOI: 10.1007/s10585-013-9634-1.
- [159] Abel SDA, Dadhwal S, Gamble AB, . Honey reduces the metastatic characteristics of prostate cancer cell lines by promoting a loss of adhesion. *PeerJ*; 2018, 2018. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.7717/peerj.5115.
- [160] Furuno T, White MD, Balasubramanian N, . In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front Cell Dev Biol* / www.frontiersin.org; 1,107, 2019.
- [161] Kennedy NJ, Davis RJ. Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle*; 2,199–201, 2003.
- [162] Kolomeichuk SN, Terrano DT, Lyle CS, . Distinct signaling pathways of microtubule inhibitors--vinblastine and Taxol induce JNK-dependent cell

death but through AP-1-dependent and AP-1-independent mechanisms, respectively. *FEBS J*; 275,1889–1899, 2008.

- [163] Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents*; 5,65–71, 2005.
- [164] Iacobuzio-Donahue CA, Lee EL, Abraham SC, . Colchicine toxicity: Distinct morphologic findings in gastrointestinal biopsies. *Am J Surg Pathol*; 25,1067–1073, 2001.
- [165] Schmid-Alliana A, Menou L, Manié S, . Microtubule Integrity Regulates Src-like and Extracellular Signal-regulated Kinase Activities in Human Pro-monocytic Cells IMPORTANCE FOR INTERLEUKIN-1 PRODUCTION*. *J Biol Chem*; 273,3394–3400, 1998.
- [166] Nair RR, Schwarz. LA. Microtubule-disrupting Agents Increase Transgene Expression in A549 Cells Through The Activation of The Src and ERK Kinase Pathway. *Mol Ther*; 7, 2003.
- [167] Samarakoon R, Higgins PJ. MEK/ERK pathway mediates cell-shape-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression upon drug-induced disruption of the microfilament and microtubule networks. *J Cell Sci*; 115,3093–3103, 2002.

10. ETİK KURUL ONAYI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Fenilboronik Asitin Androjen Bağımlı (LNCaP) ve Androjen Bağımsız (PC3) Prostat Kanseri Hücrelerine Etkisinin MAP Kinazlar Üzerinden, 2D ve 3D Kültür Yöntemleri İle Araştırılması.			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Duygu GÜR SOY			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No:198		Tarih: 18/02/2021			
Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.						

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ilknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Devrim TARAĞCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Neziha HACIHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	Tıbbi Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sekreteri
Bilge KAYA