

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOKLU İLAÇ DİRENÇLİ PROSTAT KANSERİ (DU-145) HÜCRE  
SERİLERİNDE ABSİSİK ASİT VE 17-DMAG'IN KEMOTEROPATİK  
ETKİLERİ**

**DENİZ ŞUMNULU**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR**

**EDİRNE-2019**

Deniz ŞUMNULU'nun hazırladığı “Çoklu İlaç Dirençli Prostat Kanseri (DU-145) Hücre Serilerinde Absisik Asit ve 17-DMAG'ın Kemoteropatik Etkileri” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvan, Ad, Soyad):

Prof. Dr. İlker DIBİRDİK

Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

Doç. Dr. Belgin ERDEM

Dr. Öğr. Üyesi Hayati Arda

Dr. Öğr. Üyesi Berna ERDAL

İmza  
Z. Doğanlar  
Belgin Erdem  
Hayati Arda  
Berna Erdal

Tez Savunma Tarihi: **18/10/2019**

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylıyorum.

Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

İmza

Z. Doğanlar

Murat Yurtcan

Prof. Dr. Murat YURTCAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BIYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA  
PROGRAMI DOĞRULUK BEYANI**

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



19/09/2019

Deniz ŞUMNULU

Doktora Tezi

Çoklu İlaç Dirençli Prostat Kanseri (DU-145) Hücre Serilerinde Absisik Asit ve 17-DMAG'ın Kemotropatik Etkileri

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

## ÖZET

Kanser günümüzün en önemli insan ölümleri nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün bildirisine göre; her yıl 12,6 milyon yeni bireye kanser teşhisi konulmakta ve 7,6 milyon insan farklı kanser tipleri sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Günümüzde 200 den fazla kanser türü için yaklaşık 50 çeşit kemoterapik ajan mevcuttur. Ancak kanserle mücadelede kullanılan bu kemoterapik ajanlara karşı kanser hücreleri çoklu ilaç direnci geliştirebilmektedir ve bu durum %90 ölümle sonuçlanmaktadır.

Bu çalışmada çoklu ilaç direnci geliştirilmiş prostat kanseri hücre hattı türü olan DU-145 hücreleri üzerinde absisik asit ve 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)'ın kemoterapik etkileri araştırılmıştır. Bunun için önce dosetaksel ve mitoksantronun ayrı ayrı ve birlikte, dirençli olmayan DU-145 hücrelerinin %50'sini öldüren dozları olan IC50 dozları hesaplanmıştır. Daha sonra dirençli olmayan DU-145 hücre hattına dosetaksel ve mitoksantronun birlikte IC50 dozunun seri uygulanmasına bağlı olarak hücrelere çoklu ilaç direnci kazandırılmıştır.

Son olarak çoklu ilaç direnci oluşturulmuş DU-145 hücre hattına dosetaksel, absisik asit ve 17-DMAG'ın birlikte ve ayrı ayrı uygulanmasına bağlı ölümcül etkileri ve genetik yollar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ölümcül etkileri araştırmak için MTT, ışık mikroskobu, floresan mikroskobu ve TALI görüntü temelli sitometre analizlerinden yararlanılmıştır. Işık mikroskobu, MTT ve TALI görüntü temelli sitometre analizleri neticesinde uygulanan madelere ve miktarlarına bağlı olarak dirençli DU-145 hücre hattında, dirençsiz hücre hattına göre daha az ölüm görülmüştür. Floresan mikroskobunda uygulanan madde ve miktarlarına bağlı dirençsiz DU-145 hücrelerinin membran ve

çekirdek yapılarının, dirençli hücre hattına göre daha olumsuz etkilendiği gözlemlenmiştir. Bu durum da uygulanan dosetaksel ile mitoksantronun DU-145 hücre hattında çoklu ilaç direnci meydana getirdiğini ispatlamaktadır.

Gen ekspresyonu analizleri neticesinde de uygulanan maddelere bağlı dirençli hücre hattında dirençsize göre; çoklu ilaç direnci genleri, sağ kalım genleri ve ER stresi genlerinin ifadelerinde daha fazla artış görülürken hem dirençli hemde dirençsiz hücrelerin HSP70 ve HSP90 gen ifadesi seviyelerinde kontrole göre azalma görülmüştür.

Yıl: 2019

Sayfa Sayısı: 259

Anahtar Kelimeler: 17-DMAG, Absisik Asit, Çoklu İlaç Direnci, Dosetaksel, Mitoksantron

PhD Thesis

The Chemotherapeutic Effects of Abscisic Acid and 17-DMAG on Multi Drug Resistance Prostate Cancer Cell Lines (DU-145)

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetic

## **ABSTRACT**

Present day, cancer is the most important cause of human deaths. According to the World Health Organization report; each year 12,4 million new cancer cases are diagnosed and every year 7,6 million people dies due to different types of cancer. Approximately 50 different chemotherapeutic agents are exist for fight with more than 200 different types of cancer. But against to these chemotherapeutic agents, cancer cells can develop multidrug resistance and this situation usually results with %90 death.

In this study, chemotherapeutic effects of abscisic acid and 17-DMAG on multi drug resistance prostate cancer cell line DU-145 were researched. For this purpose lethal doses 50 (IC50) of docetaxel and mitoxantrone on non-resistance DU-145 cell line were calculated seperately and together. Subsequently, multidrug resistance was improved due to the serial application of the IC50 of docetaxel and mitoxantrone together on the non-resistance DU-145 cell line.

Finally, we investigated the fatal effects and genetic pathways by applied to docetaxel, abscisic acid and 17-DMAG seperately and together on multidrug resistance DU-145 cell line. For investigate the lethal effects of them; MTT, light microscopy, fluorescence microscopy and TALI imaging-based cytometer analyzes were used. The light microscope, MMT and TALI imaging-based cytometer analyzes showed that there were fewer deaths obserwed in multi drug resistant-treated DU-145 cell line compared to non-resistant cell line due to applied materials and substance of materials. In fluorescence microscopy, it has been observed that the skeletal and nucleus structures were more

affected adversely at non-resistance DU-145 cell line than multi drug resistant cell line due to applied materials. This situation proves that applied docetaxel and mitoxantrone produces to multidrug resistance at DU-145 cell line.

Result of gene expression analysis; there was a greater increase of multidrug resistance genes, survival genes and ER stress genes expression at multi drug resistant cell line than non-resistance cell line, whereas both resistant and non-resistance cell lines showed decreased levels of HSP70 and HSP90 gene expression compared to control cells.

Year: 2019

Number of Pages: 259

Keywords: 17-DMAG, Abscisic Acid, Multidrug Resistance, Docetaxel, Mitoxantrone

## TEŐEKKÖR

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum doktora tezim için Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR (Trakya Üniversitesi, Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) başta olmak üzere, katkılarından dolayı Prof. Dr. Ođuzhan DOĞANLAR'a, finansal olarak desteklerinden ötürü Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje Numarası: 2017/223), kullanılan kemoterapik ilaçların etkileşimleriyle ilgili istatistiksel analizlerde yardımlarından dolayı doktora öğrencisi Bayram Ođuz Özer'e (Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı), tezin yazım aşamasında yardımlarından dolayı Şef Mehmet Biter'e (Rektörlük) ve bu zorlu süreçte benden manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkürü borç bilirim.

Deniz ŞUMNULU

Edirne, Eylül 2019



## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
SİMGELER.....	xv
KISALTMALAR .....	xvi
ŞEKİLLER.....	xxi
ÇİZELGELER.....	xxxviii
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	6
KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	6
2.1. Çoklu İlaç Direnci Nedir ve Hangi Faktörlere Bağlı Olarak Gelişir .....	6
2.1.1. İlaç İnaktivasyonu .....	8
2.1.2. İlaça Alternatif Hedeflerin Oluşması .....	9
2.1.3. İlacın Dışarı Pompalanması .....	10
2.1.4. DNA Hasarlarının Onarılması.....	14
2.1.5. Hücre Ölümünün İnhibisyonu .....	15
2.1.6. Epitelyal-Mezenşimal Geçiş .....	18
2.1.7. Epigenetik .....	20
2.2. Dositaksel ve Mitoksantronun, Kansere Hücrelerinde Çoklu İlaç Direnci Gelişmesinde Moleküler Etkileri .....	21

2.2.1. Prostat Kanseri Hücrelerinde Doksosetaksi Karşı Direnç Gelişmesi .....	21
2.2.2. Kanseri Hücrelerinde Mitoksantrona Karşı Direnç Geliştirilmesi .....	24
2.3. Kanseri Hücrelerinde Genel Sorun Olan Çoklu İlaç Direnci İle Mücadelede Alternatif Uygulamalar .....	26
2.3.1. Absisik Asit (ABA)'in Kanseri İle Mücadelede Etkisi .....	26
2.3.2. 17-dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG)'in Çoklu İlaç Direnci Gelişmiş Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi .....	28
<b>BÖLÜM 3 .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>31</b>
3.1. Çalışmaya Genel Bakış ve Takip Edilen Basamaklar .....	31
3.2. Kullanılan Hücre Hatları .....	33
3.2. Hücrelerin Kültüre ve Uygun Koşullarda Muhafaza Edilmesi .....	34
3.3. MTT Yöntemi ile Hücre Hatlarına Uygulanacak Madde Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .....	36
3.5. RNA İzolasyonu.....	50
3.6. Ters Transkripsiyon Aktivitesi ile Elde Edilen RNA'lardan cDNA Elde Edilmesi	51
3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) .....	51
3.8. Gerçek Zamanlı PCR Analizlerinin İstatistiksel Analizlerinin Yapılması .....	57
3.9. TALI Görüntü Temelli Sitometre (Hücre Görüntüleme) Yöntemiyle Canlı, Ölü ve Apoptik Hücre Miktarlarının Hesaplanması .....	57
3.10. Dirençsiz ve Direnç Geliştiği Düşünülen DU-145 Hücrelerinin Sağ Kalım, Apoptoz ve Kaspaz Aktivitelerinin Floresan Mikroskopta Gösterilmesi .....	59
<b>BÖLÜM 4 .....</b>	<b>61</b>
<b>SONUÇLAR .....</b>	<b>61</b>
4.1. Doksosetaksi ve Mitoksantronun Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulanmasına Bağlı Dirençsiz DU-145 Hücre Hattında Çoklu İlaç Direnci Oluşturmak İçin Belirlenen IC50 Değeri	61

4.1.1. DU-145 Hücre Hattına Dosekselin 0.39-200 nM Doz Aralığının 24, 48 ve 72 Saat Uygulanması Sonucunda El Edilen IC50 Değerleri .....	61
4.1.2. DU-145 Hücre Hattına Mitoksantronun 0,39- 200 nM Doz Aralığının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulanması Sonucunda Elde Edilen IC50 Değerleri.....	65
4.1.3. Doseksel ve Mitoksantronun Birlikte Dirençsiz DU-145 Hücre Hattına 0,39- 200 nM'lık Dozlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulanması Sonucunda IC50 Değerlerinin Hesaplanması .....	69
4.2.1. DU-145 Hücrelerinde Çoklu İlaç Direnci Gelişimi .....	73
4.2. Dirençli DU-145 Hücreleri Üzerinde Doseksel, Mitoksantron, 17-DMAG ve ABA'nın Etkilerini Araştırmak İçin MTT Analizlerinin Yapılması .....	76
4.2.1. Dirençli DU-145 Hücreleri Üzerinde Dosekselin Etkisi .....	76
4.2.2. Dirençli DU-145 Hücrelerinin Üzerinde Mitoksantronun Etkisi .....	77
4.2.3. Çoklu İlaç Dirençli DU-145 Hücre Hattında 17-DMAG'ın Etkileri .....	79
4.2.4. Dirençli DU-145 Hücrelerinin Üzerinde Absisik Asit (ABA)'in Etkisi .....	82
4.2.5. Doseksel ve ABA'nın Birlikte Dirençli DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri .....	84
4.2.6. Doseksel ve 17-DMAG'ın Birlikte Dirençli DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri .....	85
4.2.7. Doseksel, 17-DMAG ve ABA'nın Birlikte Dirençli DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri.....	86
4.2.8. ARPE-19 (Sağlıklı Retinal Pigment) Hücre hattında, Dirençli DU-145 Hücre Hattında Etkin Olan Doseksel, 17-DMAG ve ABA'nın Etkileri .....	88
4.3. Gen İfadesi Analizi Sonuçları .....	89
4.3.1. Dirençsiz DU-145 Hücre Hattında Madde Uygulanmasına Bağlı Gen İfadesi Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler .....	89
4.3.1.1. Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadeleri .....	89
4.3.1.2. BCL-2 Onkogeninin İfadesi .....	94

4.3.1.3. Sağ Kalım Genlerinin İfadesi .....	95
4.3.1.4. Apoptoz İnhibitör Genlerinin İfadeleri .....	96
4.3.2. Dirençli DU-145 Hücre Hattına Doksetaksel ve Mitoksantronun Birlikte Uygulanmasına Bağlı Gen İfadesi Seviyelerinde Meydana Gelen Değişimler .....	97
4.3.2.1. Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadeleri .....	97
4.3.2.2. BCL-2 Onkogeninin İfadesi .....	102
4.3.2.10. Sağ Kalım Genlerinin İfadeleri .....	102
4.3.2.11. Apoptoz İnhibitör Genlerinin İfadeleri .....	104
4.3.3. Geliştirilen Direncin Kalıcılığının Gen İfadesi Analizleriyle Açıklanması .....	105
4.3.3.1. Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadeleri .....	105
4.3.3.9. BCL-2 Onkogeninin İfadesi .....	110
4.3.3.10. Sağ Kalım Genlerinin İfadeleri .....	111
4.3.3.11. Apoptoz İnhibitör Genlerinin İfadeleri .....	112
4.3.4. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarına Doksetaksel, Absisik Asit ve 17-DMAG Uygulanmasına Bağlı Gen İfadelerinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması .....	114
4.3.4.1. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması.....	114
4.3.4.2. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Isı Şoku Ailesi Proteini Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması .....	122
4.3.4.3. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Oksidatif Stres Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması .....	130
4.3.4.4. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında ER Stresi Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması .....	135
4.3.4.5. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Sağ Kalım ve Ölüm Sinyali İnhibitörü Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması .....	144

4.3.4.6. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Onkogenlerin İfadelerinin Karşılaştırılması .....	147
4.3.4.7. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Hücre Bölünmesi ve Büyümesi Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması .....	149
4.3.4.8. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında DNA Tamir Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması.....	154
4.3.4.9. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Apoptoz ve Diğer Ölüm Sinyal Yolağı Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması	157
4.4. TALI Görüntü Temelli Sitometre Analizleri .....	170
4.4.1. Dirençsiz DU-145 Hücre Hattında TALI Görüntü Temelli Sitometre Analizleri. ...	170
4.4.2. MDR'li DU-145 Hücre Hattında TALI Görüntü Temelli Sitometre Analizler.	172
4.5. Mikroskop Görüntüleri .....	174
4.5.1. Doseksel ve Mitoksantronun Dirençsiz DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin Işık Mikroskopunda Gösterilmesi .....	174
4.5.2. DU-145 Hücre Hattında Direnç Oluşturma Çalışmalarının Işık Mikroskopu Görüntüleri .....	175
4.5.3. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması .....	176
4.5.3.1. Madde Uygulaması Yapılmadan Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması .....	176
4.5.3.2. 50 nM Doseksel Uygulanması Neticesinde Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması .....	177
4.5.3.3. 50 nM Doseksel ve 35 nM 17-DMAG'ın Birlikte Uygulanması Neticesinde Dirençli ve Dirençsiz DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması .....	178

4.5.3.4. 50 nM Doksetaksel ve 500 µM ABA'nın Birlikte Uygulanması Neticesinde Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması .....	179
4.5.3.5. 50 nM Doksetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500 µM ABA'nın Birlikte Uygulanması Neticesinde Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması .....	180
BÖLÜM 5 .....	182
TARTIŞMA .....	182
KAYNAKLAR .....	202

## SİMGELER DİZİNİ

$\text{Ca}^{+2}$	:	Kalsiyum
$\text{Cm}^3$	:	Santimetre küp
$\text{CO}_2$	:	Karbondioksit
$^{\circ}\text{C}$	:	Santigrat Derece
$\text{dH}_2\text{O}$	:	Saf su
$\text{g}$	:	Relatif Santrifüj Kuvveti
$\mu\text{M}$	:	Mikro Molar
$\text{mL}$	:	Mili Litre
$\text{mM}$	:	Mili Molar
$\text{nm}$	:	Nanometre
$\text{nM}$	:	Nano Molar

## KISALTMALAR DİZİNİ

17-AAG	: 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17-DMAG	: 17-Dimethylamino-17-demethoxygeldanamycin
ABA	: Absisik Asit
ABB	: Annexin bağlama tamponu
ABC	: ATP bağlayıcı kaset
ABCC1	: ATP bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 1
ABCC2	: ATP bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 2
ABCG2	: ATP bağlayıcı kaset alt ailesi G üyesi 2
A.B.D.	: Amerika Birleşik Devletleri
ADT	: Androjenden yoksun bırakma
Akt	: Serin treonin kinaz 1
AML	: Akut miyeloid lösemi
ANOVA	: Değişken Analizleri
AO	: Akridin oranj
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1
ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
B-aktin	: Beta aktin
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X apoptoz düzenleyici protein
BCL-2	: B hücreleri Lenfoma 2
BCRP	: Göğüs kanseri direnç proteini



Bid	: BH3 ölüm agonist kısmı
Bip	: Isı şoku proteini ailesi A (Hsp70) üyesi 5
CD1	: Siklin bağımlı kinaz 1
CDI	: İlaçların etkileşim kat sayısı
CHOP	: DNA hasarının tetiklediği transkript 1
CI	: Kombinasyon indeksi
CRPC	: Kısırlık oluşturan dirençli prostat kanseri
Cu-Zn SOD	: Bakır çinko süper oksid dismutaz
DDR	: DNA hasarına cevap
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
EtBr	: Etidyum bromür
EDEM	: Endoplazmik retikulum yıkım arttırıcı alfa mannozidaz benzeri protein 1
EMG	: Epitel mezenşimal geçiş
ER	: Endoplazmik retikulum
EXO1	: Ekzonükleaz 1
GA	: Geldanamisin
GRP94	: Isı şoku protein 90 beta ailesi üyesi 1
GS	: Glutasyon sentetaz
GST	: Glutasyon S transferaz
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
HDAC	: Histon deasetilaz inhibitörü
Hif1- $\alpha$	: Hipoksiya tetikleyici faktör 1 alt ünite alfa

HSA	: En yüksek etkiye sahip tek ajanın birlikte etkiye oranı
HSP26	: Isı şoku proteini 26
HSP60	: Isı şoku proteini 60
HSP70	: Isı şoku proteini 70
HSP90	: Isı şoku proteini 90
HSP	: Isı şoku proteini
IC50	: Kullanılan kimyasalın en etkili konsantrasyonunun yarısı
IGF1R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
Iκβ	: Çekirdek faktörü kappa B alt ünitesi inhibitörü
JNK	: c-JUN N-terminal kinaz
Kas 3	: Kaspaz 3
Kas 8	: Kaspaz 8
KAT	: Katalaz
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
mCRPC	: Metastatik kısırlık oluşturan dirençli prostat kanseri
MDR	: Çoklu ilaç direnci
MDR1	: Çoklu ilaç direnci proteini 1
Mn-SOD	: Manganez süper oksid dismutaz
mRNA	: Haberci ribonükleik asit
MRP	: Çoklu ilaç direnci ilişkili protein
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
MVP	: Büyük çatı proteini
MXR1	: Çoklu ilaç direnci pompa taşıyıcısı ATP bağlayıcı kaser alt ailesi üyesi 2

NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NAD[P]H	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Nf-κB	: Çekirdek faktörü kappa B alt ünitesi
P21	: Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1A
P27	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B
P53	: Tümör proteini 53
PBS	: Fosfat tampon tuzu
PERK	: Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 alfa kinaz
P-gP	: P-glikoprotein
PI3K	: Fosfoinositid 3 kinaz
PI	: Propodyum iyodid
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
qRT-PZR	: Miktersal gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RA	: Retinoik asit
RNA	: Ribonükleik asit
RQ	: Bağlı kantitasyon
Sit C	: Sitokrom C
Soks 2	: Sitokrom oksidaz 2
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
Tnf-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
totalXBP1	: Toplam X kutusu bağlayıcı protein 1
TRAIL	: Tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptozu tetikleyen ligand
usXBP1	: İşlenmemiş proteinlerden sorumlu X kutusu bağlayıcı proteini 1

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü  
XIAP : X bağlantılı apoptoz inhibitör proteini  
XRP1 : BRCA1 DNA tamir geni proteini

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İğne biyopsisiyle alınan örnekten elde edilen porstat adenoid bazal hücreleri ve adenoik kistik bazal prostat kanseri hücreleri. ....	3
Şekil 2.1. İnsan kanser hücrelerinde ilaç direnci meydana getiren faktörlerin kategorize edilmesi. ....	7
Şekil 2.2. İlaç inaktivasyonu ve ilaç inaktivasyonundan etkilenen başlıca genler. ....	9
Şekil 2.3. PI3K/ Akt yolağının aktive olması. ....	10
Şekil 2.4. ABCB1 (P-gP) ve ABCB11'in, ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2) ve ABCC3 (MRP3)'ün, ABCG2 (BCRP/MXR)'nin transmembran ve bağlanma domainleri. ....	11
Şekil 2.5. ABCB1 (P-gP), ABCG2 (BCRP/ MXR), kısa ABCC4, ABCC5, ABCC11 ve uzun ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2), ABCC3 (MRP3), ABCC6, ABCC10 taşıyıcı pompalarının lokalizasyonu ve topografik yapıları. Herbir ABC taşıyıcısı, kendi yapısına özgül endojenik ve zenobiyotik substratları dışarı taşır. ....	12
Şekil 2.6. Hatalı eşleşen bazın kesip çıkarılma mekanizması. ....	15
Şekil 2.7. Akt'nin, mitokondrinin aracılık ettiği apoptotik yolakta kaspaz aktivitesini teşvik etmesi. ....	16
Şekil 2.8. TRAIL'in apoptotik yolak üzerindeki teşvik edici etkisi ve TRAIL inhibitörü olan c-FLIP'in sağ kalım ve hücre bölünmesi yolakları üzerindeki etkisi. ....	17
Şekil 2.9. Kanser hücrelerinin ilaca dirençli hale gelmesi. ....	20
Şekil 2.10. Hücre ölümü ve dosetaksi direnç yolakları. ....	22
Şekil 2.11. Mitoksantronun DNA Topoizomeraz II'yi inhibe etmesi ve kanser hücrelerinin alternatif topoizomeraz aktivitesi gerçekleştirerek hücre sağ kalımı. ....	25
Şekil 2.12. İnsan adrenal kanseri NCI-H295'de, retinoik asit, absisik asit, epigallokateşin galat gibi anti kanser ajanlarının indüklediği sinyal yolaklarında yer alan genlerin ifadelerinde meydana gelen değişimler. ....	27

Şekil 2.13. Kanser hücrelerine karşı 17-DMAG'ın kuinon'u indirgeyerek reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi. ....	30
Şekil 3.1. DU-145 hücre hattının mikroskopik görüntüsü. ....	33
Şekil 3.2. ARPE-19 hücre hattının mikroskopik görüntüsü. ....	33
Şekil 3.3. Besiyeri-hücre karışımının 25 cm <sup>3</sup> 'lük flaska ekilmesi. ....	35
Şekil 3. 4. Flasklardaki hücrelerin pasajlanması. ....	35
Şekil 3.5. MTT'nin formazana indirgenmesi. ....	36
Şekil 3.6. 96'lık plakanın MTT analizi örneği. ....	37
Şekil 3.7. Hücre-besiyeri karışımının 96'lık plakalara ekilmesi. ....	38
Şekil 3.8. DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat dozetaksel uygulanması. ....	39
Şekil 3.9. DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat mitoksantron uygulanması. ....	40
Şekil 3.10. DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat dozetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanması. ....	41
Şekil 3.11. DU-145 hücre hattında direnç oluşturulması. ....	42
Şekil 3.12. DU-145 hücre hattının dirençli hale geldiğinin kontrol edilmesi. ....	42
Şekil 3.13. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamış, 5. Pasaj sonunda dozetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı yapılan MTT analiziyle direncin korunduğunun ispatlanması. ....	43
Şekil 3.14. Dirençli DU-145 hücre hattında dozetaksel ve mitoksantronun IC50 dozlarının belirlenmesi MTT analizleriyle belirlenmesi. ....	44
Şekil 3.15. 17-DMAG'ın dirençli DU-145 hücre hattı için IC50 dozunun hesaplanması. ....	45
Şekil 3.16. ABA'nın dirençli DU-145 hücre hattına uygulanıp MTT analizi yapılması. ....	46
Şekil 3.17. Dirençli DU-145 hücre hattına dozetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın ikili ve üçlü kombinasyonlar şeklinde uygulanması. ....	47
Şekil 3.18. Dozetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın etkin dozlarının ARPE-19 hücre hattına uygulanması. ....	48

Şekil 3.19. Apoptotik hücrelerde fosfotodil serinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıyla Annexin V'ye Ca <sup>2+</sup> aracılığı ile bağlanması. ....	58
Şekil 4.1. DU-145 hücrelerine 0,39-200nM dosetaksel uygulandıktan 24 saat sonra canlılık miktarlarına bağlı renk değişimi ve MTT istatikselsel analiz neticeleri. ....	62
Şekil 4.2. Dosetakselin DU-145 hücrelerine 24 saatlik uygulanmasına bağlı IC50'nin probit analiziyle hesaplanması. ....	62
Şekil 4.3. Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM dosetaksel uygulandıktan 48 saat sonra canlılık miktarlarına bağlı renk değişimi ve istatikselsel sütun grafiği. ....	63
Şekil 4.4. DU-145 hücrelerine dosetakselin 48 saat uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması. ....	63
Şekil 4.5. Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 100nM dosetaksel uygulandıktan 72 saat sonraki canlılık miktarları. ....	64
Şekil 4.6. DU-145 hücrelerine dosetakselin 72 saatlik uygulanmasına bağlı IC50'nin probit analiziyle hesaplanması. ....	65
Şekil 4.7. DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM mitoksantron uygulandıktan 24 saat sonra canlılık miktarı ve MTT istatikselsel analiz neticesinin sütun grafiği.....	66
Şekil 4.8. Mitoksantronun DU-145 hücrelerine 24 saatlik uygulanmasına bağlı IC50'nin probit analiziyle hesaplanması. ....	66
Şekil 4.9. DU-145 hücrelerine 48 saat 0,39- 200nM mitoksantron uygulandıktan sonra canlılık miktarı ve MTT istatikselsel analiz neticesinin sütun grafiği.....	67
Şekil 4.10. DU-145 hücrelerine 48 saat mitoksantron uygulanmasına bağlı IC50'nin probit analiziyle hesaplanması. ....	67
Şekil 4.11. Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM mitoksantron uygulandıktan 72 saat sonra canlılık miktarı ve MTT istatikselsel analiz neticesinin sütun grafiği.....	68
Şekil 4.12. DU-145 hücrelerine 72 saat mitoksantron uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması. ....	68
Şekil 4.13. Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM dosetaksel ve mitoksantron birlikte uygulandıktan 24 saat sonraki canlılık miktarlarının MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.....	69

Şekil 4.14. DU-145 hücre hattına 24 saat dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.....	70
Şekil 4.15. DU-145 hücrelerine 48 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun 0,39-200 nM dozunun uygulanmasına bağlı canlılık miktarlarının MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.....	71
Şekil 4.16. DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.....	71
Şekil 4.17. Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM dosetaksel ve mitoksantron uygulandıktan 72 saat sonraki canlılık miktarlarının MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.....	72
Şekil 4.18. DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.....	72
Şekil 4.19. Direnç geliştirilen DU-145 hücrelerine 0,39- 100 nM dosetaksel ile mitoksantron birlikte 72 saat süreyle uygulandıktan sonra MTT analizine bağlı canlılık miktarı ve 96'lık plakadaki canlılık miktarına bağlı renk değişimi. ....	74
Şekil 4.20. Direnç geliştirmek maksadıyla 6,25 nM Dosetaksel ve mitoksantron birlikte 5 pasaj boyunca uygulanmasına bağlı DU-145 hücrelerinde değişen IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.....	74
Şekil 4.21. Çoklu ilaç direnci oluşturulan DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmadan MTT analizinin yapılmasına bağlı sütun grafiği ve canlılık miktarına bağlı 96'lık plakadaki renk değişimi. ....	75
Şekil 4.22. MDR geliştiği düşünülen DU-145 hücre hattına herhangi bir madde uygulanmadan MTT analizi yapılması neticesinde elde edilen verilere göre IC50 değerinin hesaplanması. ....	76
Şekil 4.23. Dirençli DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 1- 500 nM dosetaksel uygulanması sonucunda MTT analizinden elde edilen sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi. ....	77
Şekil 4.24. MDR'li DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle dosetaksel uygulanması neticesinde probit analiziyle IC50 değerinin hesaplanması. ....	77



Şekil 4.25. Dirençli DU-145 hücre hattına 1- 500 nM mitoksantronun 72 saat süreyle uygulanmasına bağlı oluşturulan MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.....	78
Şekil 4.26. Dirençli DU-145 hücre hattına 1- 500 nM mitoksantronun 72 saat süreyle uygulanması sonucunda IC50 değerinin hesaplanması.....	78
Şekil 4.27. Dirençli DU-145 hücrelerine 48 saat süreyle 1,95 nM- 1 µM 17-DMAG uygulandıktan sonra yapılan MTT analizinin sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılığına bağlı renk değişimi. ....	79
Şekil 4.28. Dirençli DU-145 hücrelerine 48 saat süreyle 1 nM- 1 µM 17-DMAG uygulanması sonucunda IC50 değerinin hesaplanması.....	80
Şekil 4.29. Dirençli DU-145 hücre hattına 1,95 nM- 1 µM 17-DMAG uygulandıktan 72 saat sonra yapılan MTT analizinin sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.....	81
Şekil 4.30. Dirençli DU-145 hücrelerine 72 saat süreyle 1 nM- 1 µM 17-DMAG uygulanmasına bağlı IC50 değerinin hesaplanması.	81
Şekil 4.31. Dirençli DU-145 hücre hattına 24 saat süreyle 3,9 µM- 2 mM ABA'nın uygulanması neticesinde oluşturulan MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.....	82
Şekil 4.32. Dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 3,9 µM- 2 mM ABA'nın uygulanması neticesinde elde edilen MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.....	83
Şekil 4.33. Dirençli DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 3,9 µM- 2 mM ABA'nın uygulanması neticesinde elde edilen MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.....	84
Şekil 4.34. Dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel ile 1 mM ABA ve 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı canlılık miktarının MTT sütun grafiğinde ve 96'lık plakada gösterilmesi. ....	85

Şekil 4.35. Dirençli DU-145 hücrelerine 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG ve 50 nM dosetaksel ile 70 nM 17-DMAG birlikte uygulanmasına bağlı canlılık miktarları ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi. ....	86
Şekil 4.36. Dirençli DU-145 hücre hattına dosetaksel, 17-DMAG ile ABA'nın farklı konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda elde edilen MTT grafiği ve 96'lık plakada canlılık miktarına bağlı renk değişimi.....	87
Şekil 4.37. ARPE-19 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan maddelere karşılık hücrelerin canlılık miktarındaki değişimin MTT analizi ve 96'lık plakada gösterilmesi. ....	89
Şekil 4.38. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCRP/ ABCG2 (MXR1) geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	90
Şekil 4.39. Dirençsiz DU-145 hücre hattında 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak P-gp/ MDR1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	91
Şekil 4.40. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	91
Şekil 4.41. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	92
Şekil 4.42. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	92
Şekil 4.43. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	93
Şekil 4.44. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	94

Şekil 4.45. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. .....	94
Şekil 4.46. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak Livin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. .....	95
Şekil 4.47. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak Survivin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	96
Şekil 4.48. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak CIAP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. .....	96
Şekil 4.49. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. .....	97
Şekil 4.50. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	98
Şekil 4.51. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak P-gP/ MDR1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. .....	98
Şekil 4.52. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	99
Şekil 4.53. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	100
Şekil 4.54. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	100
Şekil 4.55. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	101

Şekil 4.56. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	101
Şekil 4.57. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	102
Şekil 4.58. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak LIVIN geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	103
Şekil 4.59. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak Survivin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. .	103
Şekil 4.60. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak CIAP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	104
Şekil 4.61. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	105
Şekil 4.62. 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmayan dirençli DU-145 hücre hattına 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	106
Şekil 4.63. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantron birlikte uygulanmasına bağlı olarak P-gp/MDR1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	106
Şekil 4.64. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	107
Şekil 4.65. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	108
Şekil 4.66. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	108

Şekil 4.67. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	109
Şekil 4.68. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	110
Şekil 4.69. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	110
Şekil 4.70. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak Livin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	111
Şekil 4.71. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak Survivin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. .	112
Şekil 4.72. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak CIAP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	113
Şekil 4.73. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	113
Şekil 4.74. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCB1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	115
Şekil 4.75. Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCB1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	115

Şekil 4.76. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.	116
Şekil 4.77. Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	117
Şekil 4.78. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	117
Şekil 4.79. Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC2 ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	118
Şekil 4.80. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	119
Şekil 4.81. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	119
Şekil 4.82. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	120
Şekil 4.83. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	121
Şekil 4.84. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı GST geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	121
Şekil 4.85. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı GST geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	122
Şekil 4.86. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP26 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	123
Şekil 4.87. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP26 ifadesindeki değişimler. ....	123
Şekil 4.88. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP60 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	124
Şekil 4.89. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP60 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	125

Şekil 4.90. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP70 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	125
Şekil 4.91. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP70 ifadesindeki değişimler. ....	126
Şekil 4.92. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP90 ifadesindeki değişimler.....	127
Şekil 4.93. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP90 ifadesinde meydana gelen değişimler.....	127
Şekil 4.94. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Bip geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	128
Şekil 4.95. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Bip geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	129
Şekil 4.96. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı GRP94 ifadesindeki değişimler.....	129
Şekil 4.97. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı GRP94 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	130
Şekil 4.98. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı CuZn-SOD geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	131
Şekil 4.99. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı CuZn-SOD ifadesindeki değişimler. ....	131
Şekil 4.100. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Mn-SOD ifadesindeki değişimler.....	132
Şekil 4.101. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Mn-SOD geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	132
Şekil 4.102. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı KAT geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	133
Şekil 4.103. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı KAT geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	134

Şekil 4.104. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı GS geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	134
Şekil 4.105. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı GS geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	135
Şekil 4.106. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı EDEM geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	136
Şekil 4.107. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı EDEM geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	136
Şekil 4.108. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı usXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	137
Şekil 4.109. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı usXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	137
Şekil 4.110. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı totalXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	138
Şekil 4.111. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı totalXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	139
Şekil 4.112. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı PERK geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	139
Şekil 4.113. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı totalXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	140
Şekil 4.114. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ATF4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	141
Şekil 4.115. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı ATF4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	141
Şekil 4.116. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı CHOP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	142
Şekil 4.117. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı CHOP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	143



Şekil 4.118. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Ire1- $\alpha$ geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	143
Şekil 4.119. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Ire1- $\alpha$ geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	144
Şekil 4.120. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı I $\kappa$ BA ifadesindeki değişimler.....	145
Şekil 4.121. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı I $\kappa$ BA geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	145
Şekil 4.122. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı XIAP ifadesindeki değişimler.....	146
Şekil 4.123. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	146
Şekil 4.124. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Akt geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	147
Şekil 4.125. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Akt geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	148
Şekil 4.126. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	148
Şekil 4.127. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	149
Şekil 4.128. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı SiklinD1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	150
Şekil 4.129. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı SiklinD1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	150
Şekil 4.130. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı PI3K geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	151
Şekil 4.131. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı PI3K geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	151

Şekil 4.132. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı VEGF geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	152
Şekil 4.133. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı VEGF geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	153
Şekil 4.134. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Hif1- $\alpha$ geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	153
Şekil 4.135. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Hif1- $\alpha$ geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	154
Şekil 4.136. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı XRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	154
Şekil 4.137. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı XRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	155
Şekil 4.138. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı EXO1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	156
Şekil 4.139. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı EXO1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	156
Şekil 4.140. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı BAX geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	157
Şekil 4.141. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BAX geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	158
Şekil 4.142. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Bid geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	158
Şekil 4.143. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Tnf- $\alpha$ geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	159
Şekil 4.144. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Kas3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	160
Şekil 4.145. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Kas3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	160

Şekil 4.146. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Kas8 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	161
Şekil 4.147. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Kas8 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	161
Şekil 4.148. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı NF-κB geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	162
Şekil 4.149. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı NF-κB geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	163
Şekil 4.150. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Soks2 ifadesindeki değişimler.....	163
Şekil 4.151. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Soks2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	164
Şekil 4.152. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı SitC geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	164
Şekil 4.153. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı SitC geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	165
Şekil 4.154. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Tnf-α geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	166
Şekil 4.155. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Tnf-α geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	166
Şekil 4.156. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı p21 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	167
Şekil 4.157. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı p21 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	167
Şekil 4.158. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı p27 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	168
Şekil 4.159. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı p27 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler. ....	169

Şekil 4.160. DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı p53 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.....	169
Şekil 4.161. Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı p53 ifadesindeki değişimler.....	170
Şekil 4.162. Dirençsiz DU-145 hücre hattında canlı, ölü ve apoptotik hücre miktarları. ....	171
Şekil 4.163. Dirençsiz DU-145 hücre hattında canlı hücrelerin koyu renkli, ölü hücrelerin kırmızı- sarı renkli, apoptotik hücrelerin yeşil renkli görülmeleri.....	172
Şekil 4.164. Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanmasına bağlı canlı, ölü ve apoptik hücre miktarı. ....	173
Şekil 4.165. 24 saat süre ile madde uygulanmış dirençli DU-145 hücreleri.....	174
Şekil 4.166. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 0,39-100 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanması neticesinde hücre miktarlarının ışık mikroskopunda görüntülenmesi.....	175
Şekil 4.167. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca 6,25 nM dosetaksel ile mitoksantron birlikte uygulanmıştır. 5. pasaj sonunda 72 saat süreyle 0,39-100 nM dosetaksel ile mitoksantronun birlikte dirençli DU-145 hücre hattına uygulanmasına bağlı hücre miktarlarının ışık mikroskopunda görüntülenmesi. ....	176
Şekil 4.168. Madde uygulaması yapılmamış dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarının floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması. ....	177
Şekil 4.169. 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel uygulaması yapılmış dirençsiz ve dirençli hücre hatlarının floresan mikroskopu görüntülerinin karşılaştırılması.....	178
Şekil 4.170. 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG'ın birlikte uygulamasına bağlı dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması. ....	179
Şekil 4.171. 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel ve 500 µM ABA'nın birlikte uygulamasına bağlı dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması. ....	180

Şekil 4.172. 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500 µM ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı olarak dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması. .... 181

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yapısında meydana gelen mutasyonlar sonucunda tümörögenezi tetikleyen X kromozomuyla ilişkili çekinik ve otozomal çekinik başlıca genler. ....	2
Çizelge 3.1. Çalışmada yapılan analizler ve takip edilen basamaklar. ....	32
Çizelge 3.2. ARPE-19 ve DU-145 hücre hatları hakkında genel bilgiler. ....	34
Çizelge 3.3. cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve miktarları. ....	51
Çizelge 3.4. RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi için uygulanan PZR metodu. ....	51
Çizelge 3.5. Endojen (kontrol) genlerin pirmer baz dizileri. ....	52
Çizelge 3.6. Çoklu ilaç direnci genlerinin pirmer baz dizileri. ....	53
Çizelge 3.7. Apoptoz ve diğer ölüm sinyali genlerinin pirmer baz dizileri. ....	54
Çizelge 3.8. Isı şoku proteini ailesi genlerinin pirmer baz dizileri. ....	54
Çizelge 3.9. Oksidatif ve endoplazmik retikulum stresi genlerinin pirmer baz dizileri. ....	55
Çizelge 3.10. DNA tamir mekanizması genlerinin pirmer baz dizileri.....	55
Çizelge 3.11. Onko genler, hücre büyüme faktörü, hücre bölünmesi, sağ kalım ve apoptoz inhibitör genlerinin primer baz dizileri. ....	56
Çizelge 3.12. Bir gerçek zamanlı PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi için kullanılan malzemeler ve miktarları.....	56
Çizelge 3.13. Gerçek Zamanlı PZR protokolü.....	57

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Kanser; hücre içinde genetik farklılaşmalar neticesinde meydana gelen bir olaydır. Bu farklılaşmalar anormal hücre çoğalmalarına ve bu hücrelerin çevresinde mevcut olan doku ve organlara klonal yayılmalarına neden olur. Bunun neticesinde hücreler dokuları çevreleyerek invazyonlar ve bu dokulardan uzaktaki dokulara sıçrayarak metastaz meydana getirirler. Genetik anomaliler kanser hücrelerine seçici avantaj sağlayarak onları sağlıklı hücrelere karşı baskın hale getirirler. Genetik anomaliler arttıkça tümörögenез (normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi) ve tümör gelişmesi (metastatik tümörlerin meydana gelmesi ve tedaviye dirençli kanserlerin oluşması) meydana gelir. Tümörögenезin ilerlemesi; kolon, prostat ve mesane kanseri gibi kanser türleriyle histolojik olarak ilişkilendirilirken kanser öncü lezyonları herhangi bir kanser sınıfına tabi edilmez. Tümörögenезde, tümörün gelişmesinden sorumlu düzinelerce gen tanımlanmıştır (Malkin vd., 2014; Smith vd., 2014) (Çizelge 1.1.).

**Çizelge 1.1.** Yapısında meydana gelen mutasyonlar sonucunda tümörögenezi tetikleyen X kromozomuyla ilişkili çekinik, otozomal çekinik ve baskın başlıca genler.

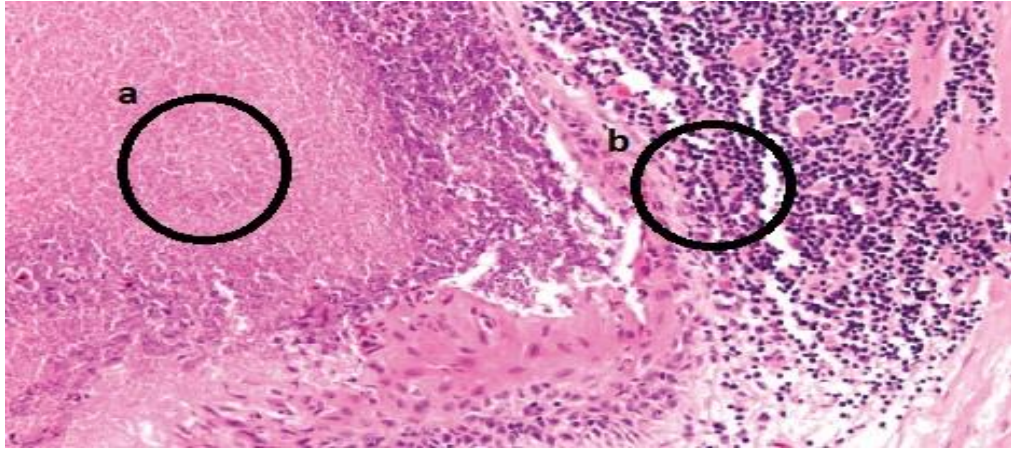
<b>X Kromozomuyla İlişkili Çekinik</b>	<b>Kanser Sendromu</b>	<b>Mutasyon Meydana Gelen Gen</b>	<b>Tümör/Kanser Tipi</b>
	Simpson Globi Behmel Sendromu	GPC3	Wilms' Tümörü, Hepatoblastoma
	X Kromozomuyla İlişkili Lemfoproliferasyon Hastalığı	SH2D1A	Lemfomalar
<b>Otozomal Çekinik</b>	Ataxia Telangiectasia	ATM	Lemfomalar, Lösemiler
	Bloom Sendromu	BLM	Birçok Çeşit
	Fanconi Anemisi	FANC Ailesi	AML
	MUTYH İlişkili Polipozis	MUTYH	Kolon
	Nijmegen Kırığı Sendromu	NBM	Lemfomalar
	Rothmund-Thomson Sendromu	RECQL-4	Osteosarkoma
	Werner Sendromu	WRN	Melanoma, Sarkoma
	Xeroderma Pigmentosum	XP Ailesi	Cilt
<b>Otozomal Baskın</b>	Adenomatous Polyposis, Ailesel	APC	Kolon
	Beckwith- Wiedemann Sendromu	IGF-2 veya CDKN1C	Birçok Çeşit
	Birt-Hogg-Dube Sendromu	FLCN	Renal
	Canale-Smith Sendromu	FAS	Lemfomalar
	Cardio-facio-cutaneous Sendromu	BRAF/ KRAS	Birçok Çeşit
	Carney Sendromu	PRKAR1A	Testiküler
	Kalıtsal Göğüs- Rahim Kanseri Sendromu	BRCA1/ 2	Göğüs/ Rahim
	Li-Fraumeni Sendromu	TP53	Birçok Çeşit
	Leopard Sendromu	PTPN11/ RAF1	AML
	Prostat Kanseri (Ailesel)	HPC1, BRCA1/ 2	Prostat
	Retinoblastoma	RB1	Retinoblastoma
	Wilms' Tümör Sendromu	WT1	Nefroblastoma

Tümörögenez neticesinde meydana gelen bu genlerin ürünleri; hücrelerin çoğalması, sağ kalımı ve ölümsüzleşmeleri gibi birçok olaydan sorumludur.



Tümörögenез süresince çevresel faktörler genetik farklılaşmayı tetikleyebilir. Örneğin sigara dumanına maruz kalma neticesinde meydana gelen mutasyonlar tümör tetikleyici gen olan K-ras onkogenini tetikleyebilir veya tümör baskılayıcı gen olan p53 (TP53)'ü baskılayabilir. Bundan başka astbest ve ultraviyole ışına gibi diğer kanserojen ajanlara uzun süreler maruz kalma neticesinde kanser vakaları meydana gelebilir. İyonize radyasyona maruz kalmanın kanser ve tümörögenезle ilişkisi atom bombası aracılığı ile iyonize radyasyona maruz kalanlarda lösemi ve diğer katı tümör vakalarının görülmesi ile ortaya çıkmıştır. Buna benzer olarak radyoterapi ve kemoterapi gibi genotoksik ajanlara maruz kalan hastalarda farklı kanser türleri saptanmıştır. Bu gibi çevresel faktörlerin kanser tümörögenезinde hem genetik anomaliler gibi faktörlerle hemde kök hücre genetik çeşitlilikleri gibi hücresel çeşitliliklere bağlı faktörlerle birlikte etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir (Anderson, Alsina, Bensinger & Biermann, 2007).

Prostat kanseri; erkek üreme sisteminde bir çeşit salgı bezi olan prostatta meydana gelir (Shin vd., 2018). Prostat kanserinde hücreler asıl mevcut olduğu prostat bezinden kemik ve lenf nodları gibi diğer bölgelere yayılır (Ruddon, 2007, s. 223). 2010'da yapılan bir çalışmaya göre prostat adenoid bazal hücreleri, prostat kanserinin en sık meydana geldiği hücreler olarak belirtilmiştir (National Cancer Institute, 2014) (Şekil 1.1.)



**Şekil 1.1.** İğne biyopsisiyle alınan örnekten elde edilen a) prostat adenoid bazal hücreleri ve b) adenoid kistik bazal prostat kanseri hücreleri (Yang, Entee & Epstein, 1998).

Başlangıçta hiçbir belirti görülmez iken, ileri aşamalarda idrar yapmakta zorlanmaya, idrarda kanın mevcudiyetine veya idrar yaparken pelviste veya bel bölgesinde ağrıya neden olabilir. İyi huylu prostatik hiperplazi olarak bilinen diğer bir hastalık ile benzer belirtiler görülebilir. Daha ileri belirtiler olarak kırmızı kan hücre miktarının azalmasına bağlı yorgunluk gösterilebilir (National Cancer Institute, 2014). Prostat kanserinin tam olarak hangi sebeplerden meydana geldiği kesin olmamakla birlikte risk faktörlerinin başında obezite, yaş ve aile öyküsü gelmektedir (Cruijsen vd., 2005). 45 yaş altı erkeklerde çok nadir olmakla birlikte, ileri yaşlarda daha sık görülmektedir. Ortalama teşhis yaşı 70 olmakla birlikte vakaların %99'undan fazlasının 50 yaş üstünde olduğu bildirilmiştir (Hsing & Chokkalingam, 2006). Çin, Alman, İsrail, Jameika ve Uganda'lı bireylerde yapılan otopsi sonuçlarına göre 50 yaş grubu kadavralarda %30, 70 yaş grubu kadavralarda ise %80 prostat kanseri tespit edilmiştir (Hankey vd., 1999). Aile bireylerinde prostat kanseri mevcut olan bireylerin olmayanlara göre iki kat daha fazla prostat kanseri olma riskiyle karşı karşıya oldukları belirtilmiştir (Breslow vd., 1977). Prostat kanseri olma riski; erkek kardeşlerinde prostat kanseri mevcut olanların, babalarında olanlara oranla daha yüksektir. Yüksek tansiyonu olan bireylerde prostat kanseri olma riski olmayan bireylere göre daha fazladır (Jemal vd., 2005). İşlenmiş etlerle yapılan diyetler, kırmızı eti veya süt ürünlerini bol miktarda tüketmek veya yeşil sebzeleri düşük miktarda tüketmek prostat kanseri riskini arttıran diğer faktörler arasında olduğu belirtilmiştir (Steward & Wild, 2014). Cinsel temas yoluyla geçiş sağlayan *Neisseria gonorrhoeae* adındaki bakterinin neden olduğu Gonorrhoea olarak bilinen hastalık da prostat kanseriyle ilişkilendirilmiştir (Caini vd., 2014). Önemli bir risk faktörü de BRCA genlerinde meydana gelen mutasyonlarıdır (Lee vd., 2016). Ayrıca düzenli egzersiz yapmayan bireyler düşük oranda da olsa prostat kanseri olma riskiyle karşı karşıyadır (Martin, Vatten, Gunnell & Romunstad, 2010). Prostat kanserinin başlıca tedavi yöntemleri olarak; cerrahi müdahale, radyasyon terapisi, hormon terapisi veya kemoterapi sayılabilir (National Cancer Institute, 2014). Kanser, sadece prostatın iç kısmında oluştuğunda kemoterapi uygulanabilmektedir (Ruddon, 2007, s. 223). Ancak kanser kemiklere yayıldığında ağrı tedavisi, biyofosfonat tedavisi (kemik yoğunluğunu korumak için uygulanan bir tür tedavi) ve hedef doku tedavisi uygulamanın daha uygun olduğu bildirilmiştir. Kanser yaşa bağlı ve/veya diğer sağlık problemleriyle birlikte meydana gelişi, daha inatçı bir yol izlemesine neden olmakla birlikte birçok insan için prostat kanserinin doğrudan ölümle sonuçlanmadığı bildirilmiştir

(Bray vd., 2018). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 verilerine göre tüm kanserler içerisinde dördüncü sırada yer alan prostat kanseri 1,3 milyon birey ile dünya genelinde tüm kanser vakalarının %7,1'ini oluşturmaktadır. Globocan 2018 verilerine göre her 100.000 kişi için; Kuzey Avrupada 85,7 kişi, Batı Avrupada 75,8 kişi, Güney Avrupada 60,7 kişi ve Doğu Avrupada 42,2 kişinin prostat kanseri olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerdeki 100.000 kişi başına ölüm oranları ise sırasıyla; 13,5; 10,1; 7,9 ve 13,5'tur (Bray vd., 2018). Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre ülkemizde 2017 yılında 3703 ve 2018 yılında 3568 kişi prostat kanserinden hayatını kaybetmiştir.

Günümüzde kanser ile savaşta en çok başvurulan yöntemlerden biri kemoterapidir ve 200 den fazla kanser türü için yaklaşık 50 çeşit kemoterapik ajan mevcuttur. Kansere karşı kemoterapi uygulandıktan kısa bir süre sonra sıklıkla çoklu ilaç direnci meydana gelmektedir ve bu durum %90 ölümle sonuçlanmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2014). Bu bilgiler doğrultusunda, bu tezde çoklu ilaç dirençli prostat kanseri (DU-145) hücreleri üzerinde absisik asit (ABA) ve 17-N,N-dimetilaminoetilamino-17-demetoksi geldanamisin (17-DMAG)'ın farklı konsantrasyonlarının çoklu ilaç direncinin kırılmasındaki rolleri ve kemoterapik etkileri ile ABA ve 17-DMAG'ın etkilediği hücresel sinyal yollarının belirlenmesi ve böylece kanser tedavisine yeni ve sitotoksik etkisi düşük kemoterapi ajanları veya yardımcı tedavi ajanlarının kazandırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak dosetaksel ve mitoksantronun düşük dozları uygulanarak çoklu ilaç dirençli DU-145 hücreleri meydana getirilmiştir. Daha sonra hem dirençli hem de dirençli olmayan hücre hatları için 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) analizi yöntemiyle dosetaksel, mitoksantron, ABA ve 17-DMAG için %50 ölümcül doz (IC50) değerleri hesaplanmıştır. Çoklu ilaç direnci gelişip gelişmediği hem MTT analizleri ile hem de çoklu ilaç direnci genlerinin ifade seviyelerindeki artışa bakılarak yorumlanmıştır. Üçüncü aşamada çoklu ilaç dirençli DU-145 hücrelerinin direncini azaltabilecek veya ortadan kaldıracabilecek ABA ve 17-DMAG miktarları kullanılarak karşılaştırmalı gen ifadesi analizleriyle bu iki ajanın ayrı ayrı ve birlikte kullanılmasına bağlı kemoterapik etkileri araştırılmıştır.

## BÖLÜM 2

### KAYNAK ARAŞTIRMASI

#### 2.1. Çoklu İlaç Direnci Nedir ve Hangi Faktörlere Bağlı Olarak Gelişir

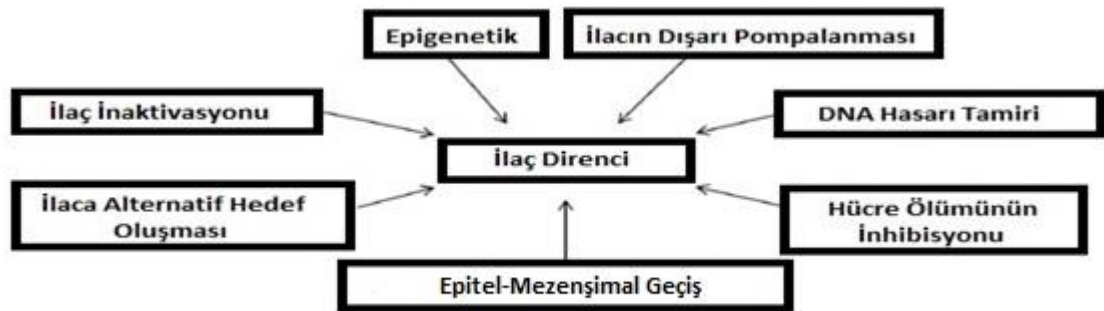
Kanser günümüzde dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Global kanser istatistik kurumu 2018 verilerine göre 18,1 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş ve aynı yıl içinde 9,6 milyon kanserli birey hayatını kaybetmiştir (Bray vd., 2018).

Kanser kemoterapisi 1940'lı yıllarda hardal gazı gibi genel sitotoksik ajanların kullanılması ile başlamış, 1960'larda vinka alkaloidleri ve antrasiklinler gibi günümüzde halen kanser tedavisinde kullanılan doğal kökenli antikanser ilaçların geliştirilmesi ile devam etmiştir (Peer vd., 2007).

Günümüzde yaklaşık 200 farklı kanserin tedavisinde kullanılan 50 kadar farklı kemoterapi ilacı mevcuttur. Ancak bu kemoterapi ilaçlarının seçici özelliği olmadığından sağlıklı organlarda da hasarlara neden olabilmektedirler. Bu tip ajanların normal organlardaki toksisitesini sınırlandırmak için ilaç molekülleri; lipozomlar, miseller, mini hücreler, lipopleksler, altın nanopartiküller, manyetik nanopartiküller, karbon nanotüpler, dendrimerler, çekirdek parçacıkları, polimer-ilaç bileşikleri gibi partüküllere yüklenerek veya kapsüllenerek ilaçların özellikle kanser hücreleri tarafından alınması sağlanmaktadır (Cyrus vd., 2009; Peer vd., 2007).

Her ne kadar kemoterapi ajanları kanser hücrelerini öldürse de, uzun süreli uygulamalarda veya bazen kısa süreli bir uygulamadan sonra bu hücreler uygulanan ilaçlara karşı direnç geliştirebilmektedir. Bu durum çoklu ilaç direnci olarak adlandırılmaktadır (Luqmani, 2005; Persidis, 1999).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, böbrek ve kolon kanseri gibi bazı kanserler uygulamanın başlangıcından itibaren kemoterapi ilaçlarına cevap vermemektedir ve bu durum primer veya doğal direnç olarak isimlendirilmektedir. Diğer taraftan bazı kanserler tedavinin erken safhalarında ilaçlara iyi cevap verseler de daha sonra bu etki azalmaktadır. Bu durum kazanılmış direnç olarak adlandırılır. Kanserle mücadele için ilaç uygulaması yapılırken farklı tipte bileşikleri içeren ilaç moleküllerine karşı kanser hücreleri kalkan olarak kullanmak üzere genlerini aktif hale getirerek benzer veya tamamen farklı ilaçlara dirençli hale de gelebilirler (kazanılmış direnç) (Chabner & Roberts, 2005; Luqmani, 2005; Persidis, 1999). İlaç direnci; farmakolojik müdahaleye karşı hücre, doku ve organların direnç geliştirmesidir. Bu durum ilk olarak bakterilerin doğal antibiyotiklere karşı ilaç direnci geliştirmesiyle saptanmıştır. Ancak daha sonra kanser hücrelerinde de aynı durumun mevcut olduğu ortaya çıkmıştır. İlaç direncinin gelişmesinde başlıca iki farklı unsur vardır. Bunlardan birincisi hastalığa özgül ilaç direncinin gelişmesidir. İkincisi bakterilerde ve insan kanser hücrelerinde ilacın dışarı pompalanması mekanizmasıdır. Bu durumlar evrimsel olarak korunmuştur. İlaç direncinin gelişmesine etken faktörler; ilaç inaktivasyonu, ilacın hedefinde alternatif oluşturulması, ilacın dışarı pompalanması, DNA hasarlarının tamir edilmesi, epigenetik faktörler, hücre ölümünün inhibisyonu ve kanserde epitel mezenşimal geçiş (EMG) gelişmesidir (Housman vd., 2014) (Şekil 2.1.).



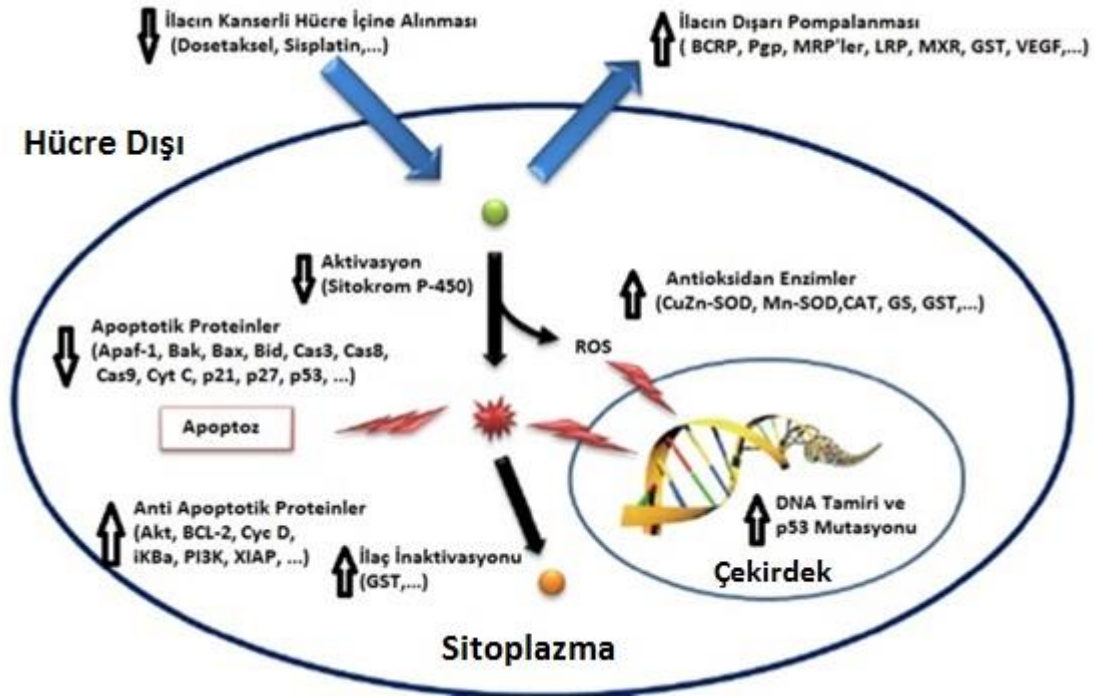
**Şekil 2.1.** İnsan kanser hücrelerinde ilaç direnci meydana getiren faktörlerin kategorize edilmesi.

Bu etkiler, kemoterapi ilaçlarının etkilerini sınırlandırmaktadır. Çoklu ilaç direncine karşı güçlü antikanser ilaçların keşfi için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmekte ve bunu

başarabilmek için kanser hücrelerinin ilaçlara karşı direnç gelişmesinden sorumlu mekanizmalarının anlaşılması gittikçe önem kazanmaktadır. Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız olarak veya birlikte çeşitli sinyal yollarını etkiler (Housman vd., 2014).

### **2.1.1. İlaç İnaktivasyonu**

Birçok antikanser ilacı, ilgili olduğu hücre reseptörüne bağlanarak hücre içine alınır ve metabolik olarak aktif hale gelir. Kanser hücreleri bu aktivasyonu azaltıcı veya tamamen baskılayıcı bir direnç geliştirir. Cerrahi müdahale görmüş ilerlemiş rahim kanserli hastalar platin ve taksan temelli kemoterapi tedavisi görmektedirler. Platine karşı direnç oluşmasından sorumlu yollardan biri metallotiyoneyin ve tiyol glutatyon aracılığı ile ilaç inaktivasyonudur ve bu durum detoksifikasyon sistemi tarafından gerçekleştirilir (Mehta & Fok, 2009). Ayrıca apoptotik proteinlerin yapısında meydana gelen değişimler de ilaç direnci gelişmesine neden olur. Kemoterapiye cevap kısa bir süreliğine apoptoz ve tümör supresör proteini olan p53 tarafından tetiklenir. Kanser vakalarında p53 geni %50 ihtimalle mutasyona uğrar (Rivlin, Brosh, Oren & Rotter, 2011). Bu gende delesyon veya mutasyon meydana gelmesi onun fonksiyonunu yitirmesine neden olur ve ilaç direnci oluşur (Aas vd., 1996). Alternatif olarak; p53 düzenleyicileri olan kaspaz-9 ve onun kofaktörleri veya apoptotik proteaz aktivasyon faktörü (APAF-1)'nin inaktivasyonu ilaç direncinin meydana gelmesine neden olur (Soengas vd., 1999). İlaç aktivasyonu veya inaktivasyonu ile ilgili diğer önemli bir inceleme glutatyon S-Transferaz (GST) süper ailesi üzerine yapılmıştır. Bu süper aile detoksifikasyon enzimlerinden meydana gelmektedir ve görevi hücrel makro molekülleri elektrofilik birleşenlerden korumaktır. GST'ler doğrudan detoksifikasyona neden olarak ve mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağını inhibe ederek ilaç direncinin gelişmesine neden olurlar (Towsend & Tew, 2003). GST ifade seviyesinin artması, kanser hücrelerinde antikanser ilaçlarına karşı detoksifikasyonun artmasına neden olur. Bu durum neticesinde kanserli hücreler bu ilaçlar tarafından daha az sitotoksik etkiye maruz kaldığı için daha az hasar görürler (Manolitsas, Englefield, Eccles & Campbell, 1997). Bu artış aynı zamanda apoptozun başlattığı birçok faktörün baskılanmasıyla da ilişkilendirilmiştir (Cumming vd., 2001). Bu durum Şekil 2.2.'de şematize edilmiştir (Akhdar, Legendre, Aninat & Morel, 2012).



Şekil 2.2. İlaç inaktivasyonu ve ilaç inaktivasyonundan etkilenen başlıca genler.

### 2.1.2. İlaç Alternatif Hedeflerin Oluşması

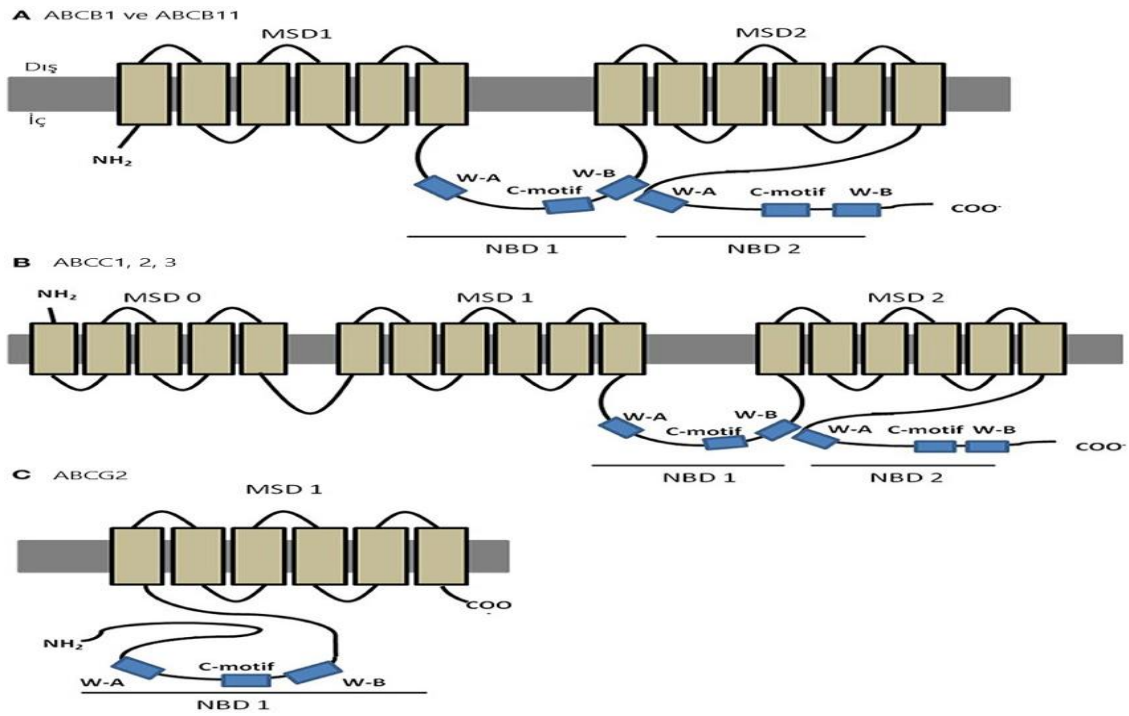
Bir ilaç; moleküler hedeflerinde meydana gelen mutasyonlar veya gen ifadelerindeki değişimlere bağlı olarak farklı etkiler göstermektedir. Kanselerde bu çeşit alternatif hedeflerin oluşması çoğunlukla ilaca direncin gelişmesine neden olmaktadır. İlaç hedeflerinin değişmesi, ilaç aktivasyonunun aracılık ettiği sinyal iletim mekanizmalarının değişmesine ve bu durumda ilaç direncinin gelişmesine neden olmaktadır. Örneğin HER2-pozitif göğüs kanseri tümörlerine bir monoklonal antikör olan trastuzumab (Herseptin) uygulanması, kemoterapinin etkilerini yüksek derecede arttırmaktadır. Bununla birlikte birçok hasta başlangıçta trastuzumab tedavisine olumlu yanıt vermektedir ancak tedaviye bu ilaçla devam edildiğinde direnç meydana gelmekte veya gelişmeler tekrar eski haline dönmektedir. Aynı zamanda bazı hastalar HER2-pozitif olmasına rağmen tek başına trastuzumab uygulamasına karşı hemen hemen hiçbir yanıt vermemektedir. Hücre-hücre inhibisyonu, büyüme faktör reseptörlerinin birlikte ifade olması, PI3K/Akt yolağının aktive olması, fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) fonksiyonunu kaybetmesinin direncin meydana gelmesinde etkili olan faktörler olduğu







transmembran proteinleridir. Sadece insan hücrelerinde bulunmazlar, varolan bütün türlerde mevcuttur ve birçok çeşit bileşenin hücre dışına atılmasından sorumludurlar. Taşıyıcı yapılarının proteinden proteine farklılık gösterdiği düşünülmektedir. İnsanlarda ABC ailesinin 49 üyesi bilinmektedir (Lage, 2008). 49 adet ABC ailesi üyesi haricinde 21 adet ABC psödogeni tanımlanmıştır (Piehler, Hellum, Wenzel, 2008). Ayrıca bir bitki türü olan *Arabidopsis thaliani*'nin 120 adet ABC proteini kodladığı tespit edilmiştir (Rea, 2007). Bu proteinler iki farklı kısma göre sınıflandırılırlar. Bu kısımlar; yüksek derecede korunmuş bir nükleotid bağlanma kısmı ve daha değişken olan transmembran kısmıdır (Chang & Roth, 2001). Bu kısımlar ilgili bazı örnekler Şekil 2.4.'te gösterilmiştir (Gerloff vd., 1998).

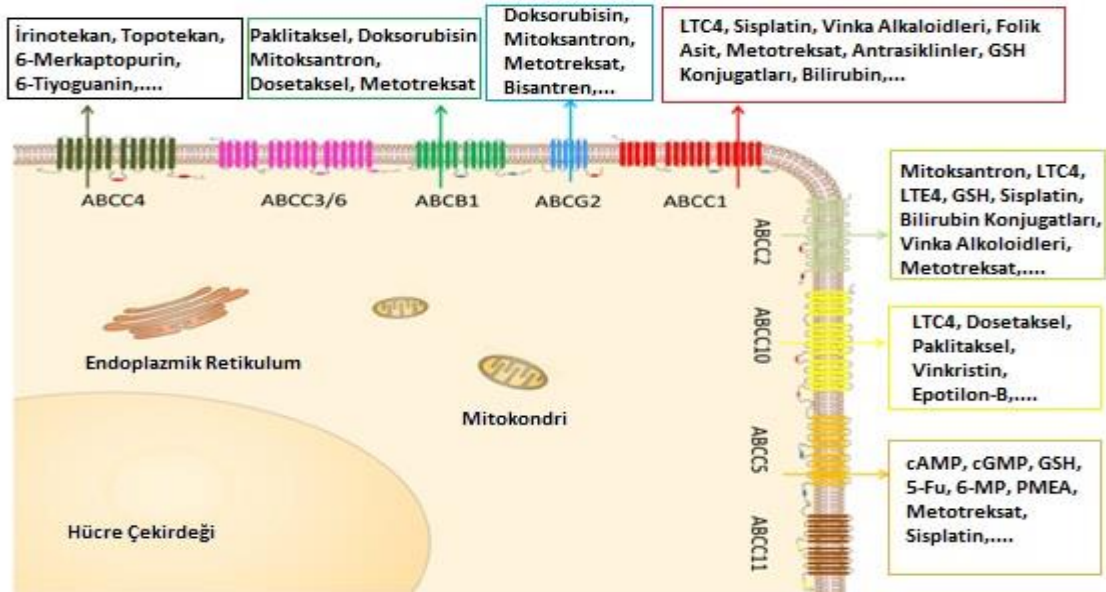


**Şekil 2.4.** A'da ABCB1 (P-gP) ve ABCB11'in, B'de ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2) ve ABCC3 (MRP3)'ün, C'de ABCG2 (BCRP/MXR)'nin transmembran ve bağlanma kısımları.

İlgili substrat, transmembran kısmına bağlanınca ATP hidrolizi gerçekleşir ve nükleotid bağlayan tarafı konformasyonel olarak değişerek substratı hücre dışına iter. Bu dışa pompalama mekanizması, hücre içinde toksinlerin aşırı birikmesinin önlenmesi açısından önemlidir (Sauna & Ambudkar, 2001). ABC taşıyıcıları karaciğerde ve barsak

sisteminde yüksek seviyelerde ifade olurlar ve bu dokularda biriken ilaç ve zararlı maddeleri safra kanalına ve barsak lümenine pompalayarak uzaklaştırırlar. Aynı zamanda kan-beyin bariyerinin korunmasında önemli rolleri vardır (Borst & Elferink, 2002; Schinkel vd., 1994).

ABC taşıyıcılarının toksinleri hücre dışına pompalama olayı normal bir işlem iken bu durumun aynı zamanda kanser hücrelerinin ilaçlara karşı direnç mekanizmasıyla ilişkili olduğu da bilinmektedir. Çoklu ilaç direnci proteini 1 (MDR1), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1 (MRP1) ve göğüs kanseri direnç proteini (BCRP) olarak isimlendirilen üç taşıyıcı protein birçok kanser vakasında ilaç direncinde öncelikli rolü üstlenmektedir. Çok geniş substrat gruplarına özgül olan bu proteinler vinka alkaloidleri, epipodofilotoksinleri, antrasiklinleri, taksanları ve kinaz inhibitörlerini hücre dışına pompalama kabiliyetine sahiptirler (Şekil 2.5.) (Wang, Zhang, Kathwala & Chen, 2014).



**Şekil 2.5.** ABCB1 (P-gP), ABCG2 (BCRP/ MXR), kısa ABCC4, ABCC5, ABCC11 ve uzun ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2), ABCC3 (MRP3), ABCC6, ABCC10 taşıyıcı pompalarının lokalizasyonu ve topografik yapıları. Herbir ABC taşıyıcısı, kendi yapısına özgül endojenik ve zenobiyotik substratları dışarı taşır.

Çoklu ilaç direnci genleri bu özelliklerinden dolayı kemoterapi ajanlarına karşı kanser hücrelerini korurlar. P-gP'yi üreten MDR1 ilk tanımlanmış olanıdır ve üzerinde en çok çalışılanıdır (Gottesman & Bates, 2002; Hilgendorf, 2007; Szakas vd., 2004).

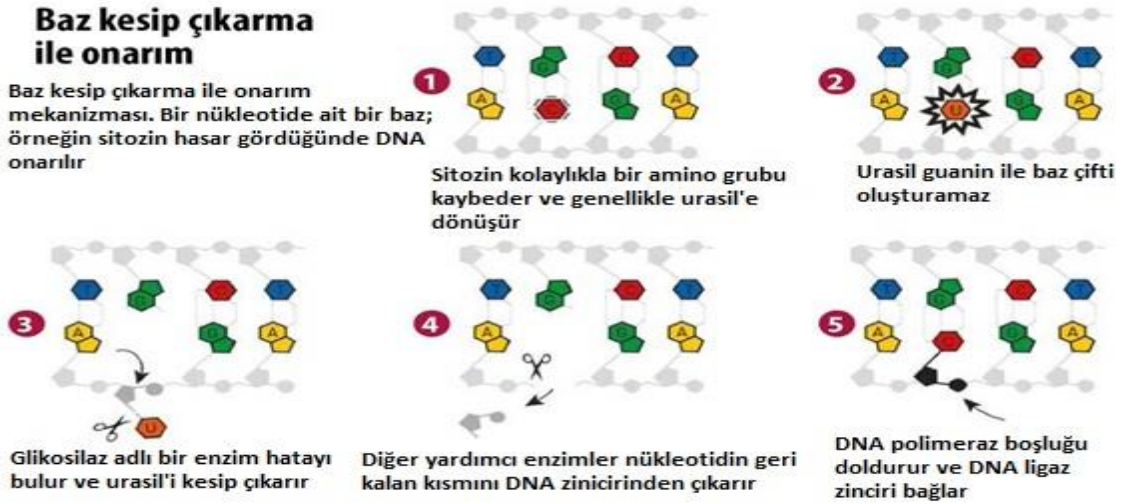
Kolon, karaciğer ve böbrek dokularında kanser gelişince MDR1'in ifade seviyesinde artış meydana gelmektedir. İlginç olarak, bir çalışmada doksorubisinin uygulandığı akciğer kanser hücrelerinde MDR1 seviyesinde artış belirlenirken normal sağlıklı akciğer hücrelerine uygulandığında MDR1 artışı olmadığı bildirilmiştir (Haber vd., 2006). Bu durum bütün var olan ve sonradan kazanılmış MDR1 aşırı ifade mekanizmaları için örnek teşkil etmektedir. Karaciğer, prostat ve göğüs gibi dokularda normal koşullarda MDR1 ifade olmamaktadır. Bu dokularda meydana gelen ilaç direnci genellikle MRP1 ve BCRP'nin aşırı ifade olmasına neden olur. BCRP normal hücreleri; zenobiyotikler, devam eden hem ve folat homeostazının meydana getirdiği toksik etkiye karşı korur, aynı zamanda kök hücrelerde ifade olur. Tümör hücrelerinde bu taşıyıcı proteinlerin ifade miktarının artmasıyla ilgili çeşitli kanser tipleri üzerinde yapılan birçok çalışma sonucunda önemli klinik veriler rapor edilmiştir. Nöroblastomalar üzerinde yapılan bir çalışmada MRP1'in yüksek seviyede ifadesi anlamlı klinik verilerle ilişkilendirilmiştir (Yanase vd., 2004). Benzer olarak, küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda BCRP'nin ifadesinin ilaca yanıtta ve sağ kalımın tahmin edilmesinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bazen gefitinib gibi BCRP inhibitörü ilaçlar kullanıldığında ilacın dışarı pomplanmasında azalma meydana gelmektedir. Bu ilaçlar tirozin kinaz inhibitörüdür ve görevleri BCRP'nin taşıyıcı aktivitesini bloke ederek ilaç direncini engellemektir (Doyle vd., 1998). BCRP'yi doğrudan inhibe edebilecek bazı bileşikler tanımlanmıştır. Mesela östrojenin, BCRP'nin gen ifadesini düzenlemesinde birçok etkiye sahip olduğu açıklığa kavuşmuştur. Göğüs kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada 17b estradiol'ün BCRP ifade seviyesinin azalmasına neden olduğu ve bu nedenle kemoterapik ilaçlardaki konsantrasyonunun arttırıldığı bildirilmiştir (Imai, Ishikawa, Asada & Sugimoto, 2005).

Sinyal moleküllerinin kinazlanma gibi teşvik edici aktiviteleri hücrelerin normal hücre döngüsünün dışına çıkmalarına neden olur ve sonuç kanserdir. Ek olarak bu proteinler P-gP ifadesini düzenler ve ilaç direncinin gelişmesine yardımcı olurlar. Östrojen, ER-pozitif göğüs kanseri hücrelerinde P-gP protein sentezini baskılamak, doksorubisine dirençli ER-negatif rahim kanseri hücrelerinde veya ER-negatif göğüs kanseri hücrelerinde bu baskılamayı sergileyemez (Mutoh, Tsukohara, Mitsunashi, Katayama & Sugimoto, 2006). Buna karşılık MAPK yolağındaki; HRas, c-Raf, MEK1/2, ERK1/2 gibi proteinlerin aşırı ifadesi, tirozin kinaz aktivitesi aracılığı ile P-gP ifade

seviyesini arttırır. Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) yolağı inhibitörleri P-gP aktivitesini azaltırken EGF ve FGF gibi büyüme hormonları P-gP'nin ifadesini düzenler (Katayama, Yoshioka, Tsukahara, Mitsuashi & Sugimoto, 2007). Birçok proteinin yapısının sabit kalmasından sorumlu ve bir şaperon proteini olan HSP90'ın inhibisyonu P-gP ifadesini azaltır (Fukuyo, Hunt & Horikoshi, 2010). Bütün bu veriler; P-gP'nin ifadesinin ve yapısının, tümör hücrelerinin gelişmesiyle sıkı bir ilişki içinde olduğunu göstermektedir.

#### **2.1.4. DNA Hasarlarının Onarılması**

Hasarlı DNA'ların tamirinin antikanser ilaçlarına karşı direnç gelişmesinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Kemoterapi ilaçları doğrudan veya dolaylı DNA hasarı meydana getirir. Bu DNA hasarına yanıt olarak kanser hücrelerinde DNA hasarına cevap ("DNA Damage Response", DDR) mekanizması aracılığı ile ilacın etkisi ortadan kaldırılır. Örneğin platin içeren bir kemoterapi ilacı olan sisplatin; DNA çapraz bağların oluşmasına neden olarak hücreleri apoptoza götürmektedir. Bununla birlikte sıklıkla platin içeren ilaçlara karşı direnç gelişir. Bu durumda nükleotid kesip çıkarma tamir mekanizmasıyla çapraz (hatalı) eşleşen nükleotid çıkarılır, homolog rekombinasyon ile hatalı eşleşen bazın yerine doğru eşleşme sağlanır, böylece sisplatinin etkileri eski haline çevrilmiş olur (Bonanno, Favaretto & Rosell, 2014; Selvakumaran, Pisarcik, Bao, Yeung & Hamilton, 2003). Bu durum Şekil 2.6.'da gösterilmiştir (Lindahl, Modrich & Sancar, 2015).



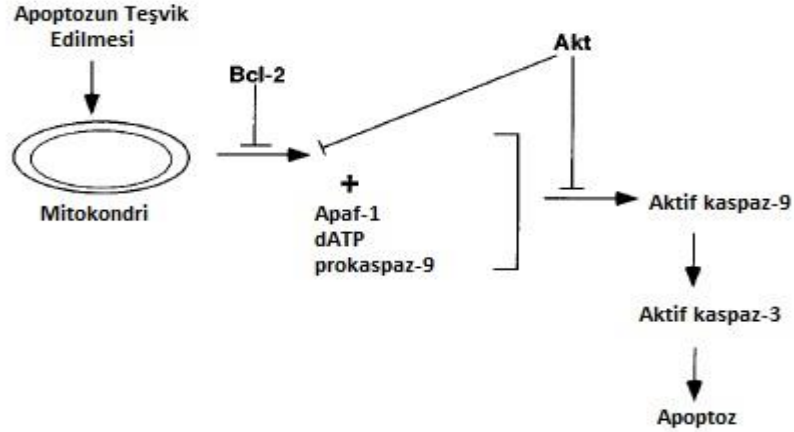
**Şekil 2.6.** Hatalı eşleşen bazın kesip çıkarılma mekanizması.

Buna göre DNA hasarıyla sitotoksik etki gösteren kemoterapi ilaçları DDR mekanizması karşısında çoğu kez başarısızlığa uğramaktadır. Bunun için DNA hasarı meydana getiren kemoterapi ilaçlarıyla birlikte DNA tamir mekanizmasını inhibe edecek birleşikler kullanmak bu ilaçların etkinliğini arttırmaktadır. DDR genlerinin işlevlerinde meydana gelen kayıplar veya onların mekanizmalarını mutasyonlar veya epigenetik susturma teknikleriyle bozmak birçok kanser tipi için potansiyel tedavi olarak görülmektedir (Curtin, 2012; Esteller, 2000; Goode, Ulrich & Potter, 2002). Bununla birlikte bazı DDR mekanizmaları yeniden düzenlenerek tekrar işlevsel hallerine dönebilmektedirler. DNA tamir aktivitelerinin artmasıyla birlikte direncin de artmasına rağmen, bu dengeleyici mekanizma kemoterapi için iki avantaj sağlamaktadır. Birincisi; aşırı derecede aktif olan DDR yolaklarını doğrudan kemoteropatik ilaçlarla hedef alarak (özellikle DNA hasarı oluşturan ilaçlarla) kanserleri savunmasız hale getirilebilir. Diğeri ise daha önceden kazanılmış olan DDR mekanizmasına etki eden DNA hasarı yapıcı ilacı sürekli olarak kullanarak hasarlı bir DDR yolağı oluşturmaktır. Her iki kemoterapi stratejisi de esasında ileri derecede aktif ve daha az aktif DDR mekanizmasını hedef almaktadır.

### 2.1.5. Hücre Ölümünün İnhibisyonu

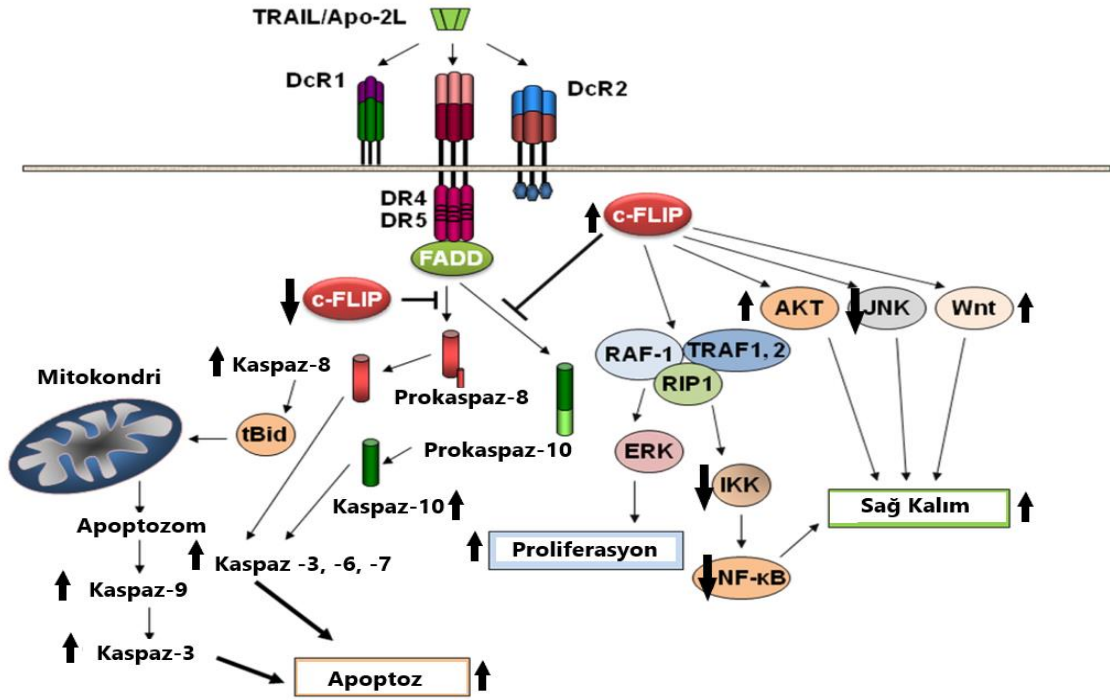
Hücre ölümü; apoptoz ve otofaji olmak üzere iki önemli olay tarafından düzenlenir. Bu iki olay birbirinden farklı olmasına rağmen her ikisi de hücre ölümünün

gerçekleşmesini sağlar. Apoptoz iki temel yolağa dayanmaktadır. Bunlardan birincisi B-hücreleri Lenfoma 2 (BCL-2) ailesi proteinlerini, kaspaz-9'u ve Akt'yi içeren mitokondrinin aracılık ettiği asıl yolaktır (Şekil 2.7.) (Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K. & Hay, N, 1999).



**Şekil 2.7.** Akt'nin, mitokondrinin aracılık ettiği apoptotik yolakta kaspaz aktivitesini teşvik etmesi.

Diğeri ise hücre yüzeyinde mevcut olan ölüm reseptörlerinin olduğu ikincil yolaktır. Birincil ve ikincil yollar aşağı yolda kaspaz-3'ü aktive eder. Apoptoz için elzem olan molekül kaspaz-3'tür. Bununla birlikte birincil ve ikincil yollar arasında iletişim de mevcuttur. Birçok çeşit kanserde; BCL-2 ailesi proteinleri, Akt ve diğer antiapoptotik proteinler yüksek derecede ifade olmaktadır. Bununla birlikte Nf- $\kappa$  $\beta$  ve STAT gibi aşağı yönde transkripsiyonu düzenleyen modülatörler son derece aktiftir. Bunlar ilaç geliştirilmesi için çok iyi birer hedeftir. Tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptozu tetikleyen ligand (TRAIL)'in rekombinant şekli ve bu reseptörlerin agonistik antikoru kaspaz-8'i aktive ederek apoptozu tetikler. Klinik müdahaleler ile TRAIL'in baskılanması sonucunda çok önemli bulgular elde edilmiştir (Şekil 2.8.) (Safa & Pollok, 2011).



**Şekil 2.8.** TRAIL'in apoptotik yolak üzerindeki teşvik edici etkisi ve TRAIL inhibitörü olan c-FLIP'in sağ kalım ve hücre bölünmesi yolları üzerindeki etkisi.

Aslında birçok BCL-2 ailesi proteini inhibitörü kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemede etkili olmaktadır ancak bu inhibitörlerin uzun süre kullanılması direnç gelişmesine neden olmaktadır. Buna ilaveten göğüs kanseri hücrelerinde HDACi'nin TRAIL'e hassasiyet gösterdiği bildirilmiştir (Soria vd., 2010). Sarkar ve Faller'in yaptığı iki farklı çalışmadan birinde; HDACi'nin rahim kanseri hücrelerinde telomer analogu GT-oligo'ya hassasiyet gösterdiği, diğerinde ise GT-oligonun rahim kanserlerindeki TRAIL'e hassasiyet gösterdiği saptanmıştır. Birçok kanser ilacı MAPK yolağının son basamağında bulunan c-JUN N-terminal kinaz (JNK)'ı aktive ederek apoptozu tetikler. TRAIL, JNK'nın aktive olmasıyla apoptozu tetikler ve JNK yolağının inhibe olması siplatinin tetiklediği apoptozun inhibe olmasına neden olur (Sarkar & Faller, 2011; 2013). İlaç direnci kazanmış kanser hücreleri ile ilgili bütün bu verilerden yola çıkarak sistotoksik bir ilacın oluşturduğu alternatif bir gen ifadesine veya düzenlenmeye bağlı oluşan ölüm yolağını ikinci bir ilaç uygulanmasıyla destekleyerek bu hücrelerin direnci kırılabilir ve ölümleri gerçekleşebilir.



Otofaji; asidik lizozomal pH'ta fagolizozomal ölümün gerçekleşmesidir. Klorokinon ve onun türevleri pH'ı yükselterek lizozomdaki parçalayıcı enzimleri inaktif hale getirir ve otofajiyi engeller. Bu ilaçlar ilk olarak sıtma tedavisinde kullanılmış ancak daha sonra kanser hücrelerinin diğer ilaçlara karşı hassas hale gelmesine neden oldukları belirlenmiştir (Sasaki vd., 2010). Sasaki vd., 2010 Fluorourasil'in klorokuin ile kombine edilmesiyle kanser hücrelerine karşı tedavi metodu geliştirilmesinin sadece fluorourasil uygulamasına göre çok daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir (Sasaki vd., 2010). Buna ek olarak, ER-pozitif kanser hücreleri için bir klorokuin türevi olan hidrosiklorokuinin kanser hücrelerinde otofajiyi inhibe ettiği ve tamoksifen gibi ER yolağı inhibitörlerine karşı hassas hale getirdiği bildirilmiştir (Cook vd., 2010). Bu çalışma sonuçlarına göre klorokuinin otofajiye bağımlı direnci kırmada etkili olduğu rapor edilmiştir (Sasaki vd., 2010).

#### **2.1.6. Epitelyal-Mezenşimal Geçiş**

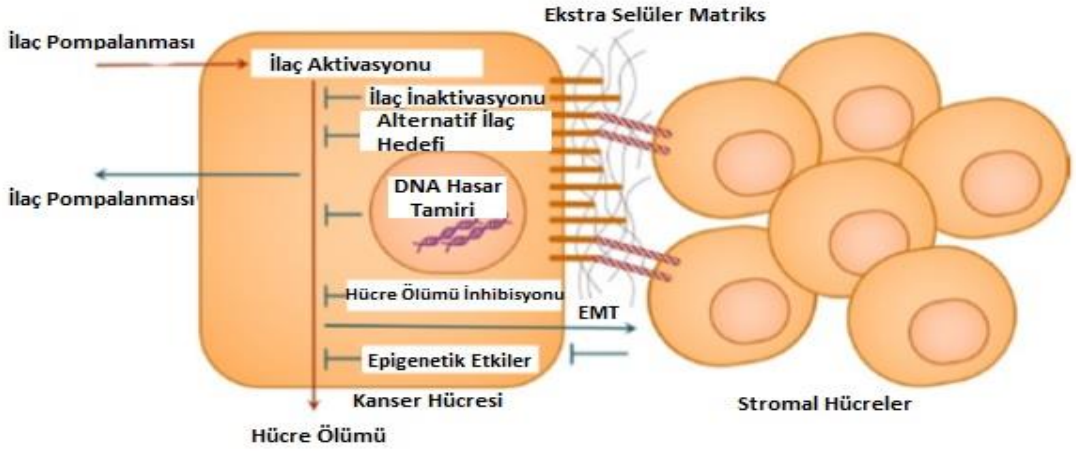
Epitelyal-Mezenşimal Geçiş (EMG); solid tümörlerin metastatik hale geçmesinin ana mekanizmasını oluşturur. Metastazda kanser hücreleri ve stromal hücreler çevresel faktörlerin etkisi altında değişime uğrar. Aynı zamanda metastatik tümörlerin çevresinde damar yolları oluşarak anjiyogenez meydana gelir. EMG süresince tümör hücrelerinde, hücrelerin birbirine tutunmasını sağlayan integrin ve kaderinleri oluşturan hücre adhezyon reseptörlerinin ifade seviyelerinde sürekli bir değişim meydana gelerek, hücrelerin hareketliliği sağlanır. Hareketlilik aynı zamanda tümörlerin çevreye veya tümörlerin birbirlerine yaydıkları sitokin ve kemokinler sayesinde de sağlanabilir. Ayrıca tümör hücrelerinin yüzeyindeki metalloproteazların ifade seviyelerinin artışı, tümör hücrelerin çevreye hareket etmesinde rota oluşturur böylece metastaza yardımcı olur. EMG'nin ilaç direnci üzerine etkileri her geçen gün daha fazla ilgi görerek araştırmalara konu olmaktadır (Shang, Cai & Fan, 2013; Singh & Settleman, 2010).

Kanser öncül kök hücreleri metastatik kanser hücreleridir. Başarılı bir cerrahi müdahale ile miktarlarında azalma meydana geldikten sonra tekrar eski bulunduğu bölgelere nükesedebilmektedirler (Byler, 2014; Byler & Sarkar, 2014; Chaffer vd., 2011; Chaffer & Weinberg, 2011; Sarkar vd., 2013). Bu progenitör kanser hücrelerini epigenetik ilaçlar aracılığı ile öldürmek, onların uzak bölgelere metastaz yapmalarının önüne geçilebilmesi için gereklidir. EMG boyunca birçok faktör ilaç direncinin gelişmesi



açısından önemli roller oynamaktadır. Bu faktörler tümörün metastatik derecesiyle doğru orantılıdır. Buna göre bu faktörler farklılaşma seviyesi ve EMG derecesi olarak adlandırılırlar. Örneğin ERBB2 (HER2) pozitif göğüs kanseri tümörlerinde yüksek derecede  $\beta 1$  integrinleri ifade olur ve transtuzumab gibi antikor inhibitörlerine karşı direnç gelişir (Lenisak vd., 2009). Bu buluşlar, daha önceki çalışmalardan elde edilen lösemi hücrelerine  $\beta 1$  integrinlerinin bağlanması ile onları hücre ölümünden korumalarıyla ilgili verileri desteklemektedir (Sarkar, Svoboda, de-Beaumont & Freedman, 2002). Ek olarak integrin ve reseptör tirozin kinazlar, göğüs kanseri tümör hücreleri ile iletişim kurar ve göğüs kanserinin gelişebilmesini tetikler (Carraway & Sweeney, 2006; Wendt, Smith & Schiemann, 2010).

İlaç direnci, EMG için elzem olan farklılaşma sinyalizasyonu aşamasında da gerçekleşebilir. Örneğin, kolon kanserlerinde  $\alpha\beta 1$ 'in ifade seviyesinin artması, doğrudan dönüştürücü büyüme faktörünün (TGF) ifade seviyesini düzenler. Bu durum EMG için gereklidir ve kanser hücreleri için ilaçlara karşı yaşama sinyali oluşarak direnç gelişir. İntegrin  $\alpha\beta 1$ , stromal hücre adhezyon molekülleri ile bu gibi sinyalleri oluşturmak için ilişki kurar (Bates & Mercurio, 2005). Benzer bir durum da memeli kanserlerinde TGF $\beta$ 'nin aracılık ettiği EMG'yi düzenleyen  $\beta 3$  integrin ve src arasında görülür (Galliher & Schiemann, 2006). İntegrin  $\beta 1$ 'in ligasyonu akciğer kanserlerinde hücre bölünmesini ve FAK kinazın aracılık ettiği sağ kalım sinyalinin oluşmasını sağlar (Shibue & Weinberg, 2009). Vasküler endotelial büyüme faktörü ve Flt-1'in sağladığı otokrin sinyal, kanserin sağ kalımına destek olur (Bates & Mercurio, 2005). Ekstrasellüler matriks ve stromal hücrelerin hücre adhezyon reseptörleri ile ilişki kuran selektin ve diğer hücre adhezyon reseptörleri de EMG'ye ve hücre sağ kalımına katkıda bulunur (Bendas & Borsig, 2012; Desgrosellier & Cheresch, 2010; Laubli & Borsig, 2010; Paschos, Canovas & Bird, 2009; Witz, 2008) (Şekil 2.9.).



**Şekil 2.9.** Kanser hücrelerinin ilaca dirençli hale gelmesi (Housman vd.; 2014).

EMG boyunca meydana gelen farklılaşma işlemi kanser hücrelerini daha da metastatik hale getirir, bunun akabinde hücre morfolojisinde ve hücre iskeletinde farklılaşmalar meydana gelir (Barkan, 2008). Reseptör tirozin kinaz tarafından indüklenen B-Raf aşağı yönde sinyal yolağında görev alan bir aracı kinazdır. Melanoma hücreleri fibroblast hücreleri ile birlikte kültüre edildiğinde B-Raf inhibitörü ilaçlarına karşı direnç geliştiği gözlemlenmiştir (Staussman vd., 2012). Bu durum stromal hücrelerin ilaç direnci oluşturmadaki rolüne açıklık getirmektedir. Bütün bunlar in vivo hayvan modellerinde denenilen birçok ilacın, hücre kültürüne göre neden başarısız olduğunu açıklamaktadır.

EMG ve kanser metastazı birçok farklı değişkene bağlıdır. Metastatik kanser hücreleri çoğunlukla heterojen yapıda buldukları için hücre farklılaşması tek bir formdan meydana gelmez. Bu durum bazı hastaların diğerlerine göre ilaca neden daha iyi yanıt verdiklerini açıklamaktadır.

### 2.1.7. Epigenetik

Kanser tedavisinde direncin gelişmesindeki önemli mekanizmalardan biri de karsinogenezden doğrudan etkilenen epigenetik modifikasyonlardır. Asetilasyon ve metilasyon, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunda görev alan iki ana epigenetik değişimin temel unsurlarıdır. DNA metilasyonu, genellikle genlerin promoter bölgelerinin başlangıç kısımlarında bulunan CpG adacıkları olarak bilinen CG-

dinükleotidlerine metil gruplarının bağlanması ile oluşur. Bununla birlikte genomun diğer kısımlarında da metilasyon meydana gelir. Metilasyondan farklı olarak histon modifikasyonları kromatin konformasyonlarındaki alternatiflerden oluşur. Örneğin histon asetilasyonu kromatinin açılmasını sağlarken deasetilasyonu paketlenmesini sağlar. Bu mekanizma genlerin ifadesine bağlı bir biçimde evrensel olarak düzenlenir ve kanserlerde bu normal düzenlenme mekanizması hasara uğrar. Örneğin kanserli hücrelerde hipermetilasyon olmasına rağmen tümör baskılayıcı genleri sürekli uyku halinde iken onkogenler aşırı ifade olurlar. Bununla birlikte bu epigenetik bozulmalar sürekli geri dönüşüm halindedir ve bazen bu bozulma araştırmacılara ilaç direnci mekanizmasını araştırabilmeleri açısından fırsat sunmaktadır.

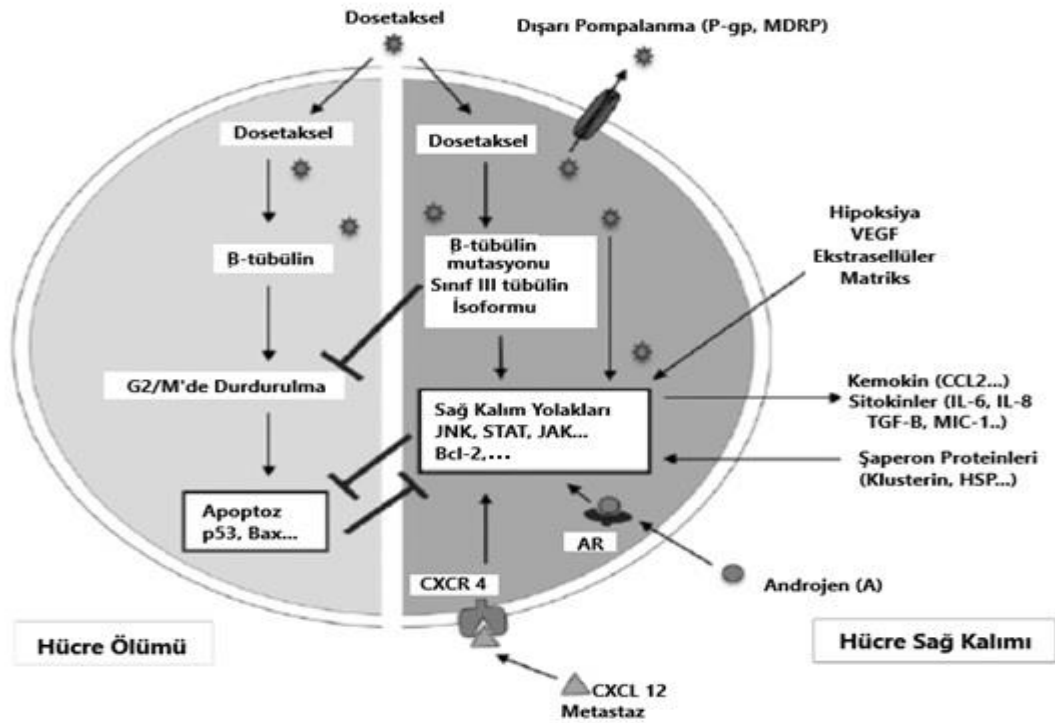
Alternatif epigenetik düzenlenmelerle ilgili yapılan çalışmalardan birinde histon metilasyon ve asetilasyonlarının ilaca karşı direnç geliştirilmesiyle ilişkisi açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmada MDR1 geninin promotor bölgesinin hipermetilasyonuna bağlı olarak transkripsiyonel baskılanmanın meydana geldiği ve kromatinin yapısal değişime uğradığı tespit edilmiştir (Baker & El-Osta, 2003). Kantharidis'te yaptığı bir çalışmada, MDR1 promotor bölgesi demetilasyonunu çoklu ilaç direnciyle güçlü şekilde ilişkilendirilmiştir (Kantharidis, 1997).

## **2.2. Doksetal ve Mitoksantronun, Kanser Hücrelerinde Çoklu İlaç Direnci Gelişmesinde Moleküler Etkileri**

### **2.2.1. Prostat Kanser Hücrelerinde Doksetale Karşı Direnç Gelişmesi**

Metastatik prostat kanserlerine uygulanan ilk tedavi yöntemi genellikle androjen hormonundan yoksun bırakmadır. Ancak bu tedavi sonucunda kısırlık oluşturan dirençli prostat kanseri (CRPC) meydana gelebilmektedir. Metastatik CRPC (mCRPC) hastalığının tedavisinde ise doksetal denilen ve kanser hücrelerinde mikrotübüllerin sabit hale gelmesini sağlayarak sitotoksik aktivite gösteren ilaç kullanılmaktadır (Cortes & Pazdur, 1995). Doksetale karşı direnç gelişmesi, tedavi uygulanan hastaların hemen hemen yarısında görülen önemli bir problem olmakla birlikte prostat kanseri ile mücadelede uygulanan tedavi yöntemlerinin sınırlı olması sebebi ile oluşan direnci kırmak bu hastalar için birinci derecede önem arz etmektedir (Petrylak vd., 2004; Tannock vd., 2004). Mikrotübüller filament polimerleridir.  $\alpha$ - ve  $\beta$ -tübülün

heterodimerlerinden oluşurlar. Mikrotübüller hücre bölünmesinde kritik rol oynarlar ve bunların dosetaksel için temel hedef oldukları düşünülmektedir. Mitoz boyunca, mikrotübül polimerleri düzenli bir şekilde polimerize ve depolimerize olarak kromozomların birbirinden ayrılmasını sağlarlar. Dosetaksel  $\beta$ -tubulin'e bağlanarak mikrotübül yapısını sabit hale getirir ve bu sayede mitotik iğ cihazının mekanizmasını bozar. Dosetakselin tetiklediği sitotoksik etkiyle hücreler mitoz aşamasından çıkamaz ve bunun sonucunda apoptoz meydana gelir. Dosetakselle karşı oluşan direncin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak direncin meydana gelmesindeki etkenlerden bazıları; hücre içine ilaç alımını sınırlandırıcı antagonist mekanizmalar, taksanların sitotoksik etkilerine karşı alternatif büyüme ve apoptozdan kaçış yollarının oluşturulması mekanizmalarıdır (Galletti, Magnani, Renzulli & Botta, 2007; Seruga, Ocana & Tannock, 2011). Bu mekanizmalardan bir kısmı aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir (Şekil 2.10.) (Magadoux, Isambert, Plenchette, Jeannin & Laurens, 2014) .



**Şekil 2.10.** Hücre ölümü ve dosetaksel direnç yolları.

Prostat kanseriyle ilgili klinik verilerden elde edilen bilgiye göre normal prostatta P-gp çok az ifade olur (Fojo vd., 1987; Kawai vd., 2000). Fakat tümör epitel hücrelerinde

P-gp gen ifadesi artar ve bu durum tümörün kaçınıcı aşamada olduğuyla ilişkilendirilebilir (Bhangal vd., 2000). Tedavi görmüş prostatektomi modellerinde P-gp geninin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Homma vd., 2007; Sullivan vd., 1998). P-gp aynı zamanda birincil prostat kanseri hücre kültürlerinde ifade olur ve kemoterapiye karşı dirençle ilişkilendirilmektedir (Sanchez vd., 2009). Klinik verilere göre dosetaksel ile tedavi görmüş prostat kanserli hastalarda MDR1/ABCB1 genetik çeşitliliği saptanmıştır (Sissung vd., 2008).

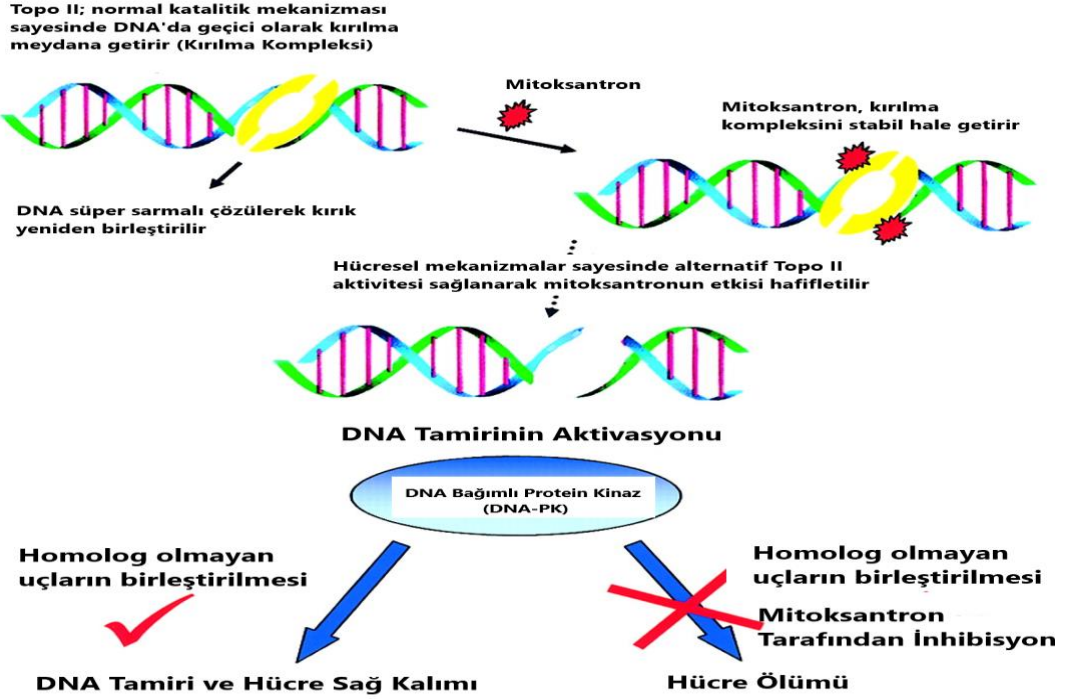
Yapılan çalışmalarda MRP1'in, P-gp'ye göre prostat kanseri örneklerinde ve hücre hatlarında daha çok ifade olduğu tespit edilmiştir (Beabes vd., 2000; Van Brussel vd., 2001; Van Brussel J.P., Jan van Steenbrugge G.J., Romijn J.C., Schroder F.H. & Mickisch G.H., 1999). Zalberg ve arkadaşlarının DU-145 ve PC3 hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarda MDR fenotipinin tetiklediği MRP1'in ifade seviyesi artarken bu artış P-gp'de saptanamamıştır (Zalberg vd., 2000). MRP1 ifadesi aynı zamanda ileri derecede prostat kanseri ile de ilişkilendirilmiştir (Bhangal vd., 2000; Sullivan G.F. vd., 1998; Van Brussel vd., 2001). BCRP/ABCG2'nin serin/ threonin kinaz Pim-1 tarafından fosforilasyonunun prostat kanseri hücre hatlarında dosetaksele karşı direnç oluşmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Xie vd., 2008). İki farklı çalışma grubu tarafından BCRP/ABCG2'nin, tespit edilmek istenen prostat kök hücre hattının varlığını belirlemede evrensel kök hücre belirteci olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Ding, Wu & Jiang, 2010; Mathew vd., 2009). MDR fenotipi olarak bilinen BCRP/ABCG2 kök hücrelerde kemoterapiye karşı direnç oluşturulmasıyla doğru orantılı olarak ilişkilendirilmiştir. İki farklı çalışmada MRP4/ MOATB/ ABCC4 prostat dokularında yüksek seviyede ifade olduğu ve genellikle prostat kanserinde kemoterapiye karşı ilaç direnci gelişmesinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Lee, Klein-Szanto & Kruh, 2000; Lee, Belinsky, Bell, Testa & Kruh, 1999). Prostatta ABCC4 RNA'sının ifadesinin androjen seviyesinin artması ile arttığı ve androjen seviyesinin azalması ile baskılandığı tespit edilmiştir (Cai, Omwancha, Hsieh & Shemshedini, 2007; Ho vd., 2008). Ancak Maher ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre; androjen seviyesi ile ilgili bu özelliğin böbrekte tam tersi olduğu tespit edilmiştir (Maher, Cheng, Tanaka, Scheffer & Klaasen; 2006). MRP4/ABCC4'ün promoter bölgesinin teşvik edilmesiyle bu genin ifade seviyesindeki artışın, testosteron veya anti androjen seviyelerini etkilemediği bildirilmiştir (Ho vd., 2008). Yapılan çalışmalarda ABCC4'ün ifadesi; kamptoteşinler,

siklofosfamid, topotekan, metotreksat ve nükleozid analogları gibi kemoterapik ajanlara karşı hassasiyet göstermemiş, fakat aynı çalışmalarda bu durumun dozetaksel için geçerli olmadığı tespit edilmiştir (Chen vd., 2002; Leggas vd., 2004, Tian vd., 2005).

### **2.2.2. Kanser Hücrelerinde Mitoksantrona Karşı Direnç Geliştirilmesi**

Kötü huylu tümörlerde uygun antikanser ajanı kombinasyonlarının kullanılması tedavi geliştirilmesi açısından çok büyük önem arz etmektedir. Bu girişimlere rağmen, klinik kanser müdahalelerinde kanser hücrelerinin, kullanılan sitotoksik ilaçlarla yapısal ve fonksiyonel bileşik oluşturarak bu ilaçların etkilerinin azalması karşılaşılan en büyük problemlerden biridir (Skatrud, 2002). Daha iyi bir açıklamayla çoklu ilaç direnci (MDR) fenotipinin moleküler temeli bir ATP bağımlı taşıyıcı olan P-gp'nin (ABCB1) ifade seviyesinin artmasına bağlıdır (Ambudkar, Kim & Sauna 2006; Ambudkar, Kimchi-Sarfaty, Sauna & Gottesman, 2003; Leslie, Deeley & Cole, 2005). Yabancıl tip hücelere göre, P-gp kodlayan insan MDR1 geni transfekte edilmiş hücreler antikanser ilaçlarına daha dirençlidir (Gottesman & Pastan, 1993). Transfekte edilmiş bu hücreler, P-gp aracılığı ile sitotoksik ilaçları hücrelerin dışına pompalayarak hücre içindeki ilaç birikimini ve dolayısıyla etkilerini azaltırlar. Mitoksantronun bir çeşit sentetik antrasenedion olduğu ve birçok çeşit kanser için kemoterapik ajan olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Harris & Reese, 2001; Powless, 1997; Rigacci vd., 2003). Mitoksantronun antikanser etkisini hücrelerde çekirdek DNA'sına bağlanarak, onun DNA topoizomeraz II aktivitesini inhibe ederek gösterdiği ve buna ek olarak sitozolde mevcut olan metabolitler üzerinde anti neoplastik rol oynadığı belirtilmiştir (Vibet vd., 2007). İnsan lenfoblast K-562 hücrelerinde mitoksantronun hücre içinde birikmesinin azalmasına bağlı olarak P-gp'nin aşırı ifade olduğu bildirilmiştir (Fukushima vd., 2000). Bununla beraber kanser hücreleri alternatif topoizomeraz II aktivitesiyle P-gp/MDR1 tarafından mitoksantronu hücre dışına pompalayarak etkisini azaltırlar (Errington vd., 1999; Harker vd., 1995a; Harker, Slade, Parr & Holguin, 1995b; Harker, Slade, Drake & Parr, 1991; Zhou vd., 1999) (Şekil 2.12.).

## Mitoksantron'un DNA Topoizomeraz II Üzerindeki Etkisi



**Şekil 2.11.** Mitoksantronun DNA Topoizomeraz II'yi inhibe etmesi ve kanser hücrelerinin alternatif topoizomeraz aktivitesi gerçekleştirerek hücre sağ kalımı.

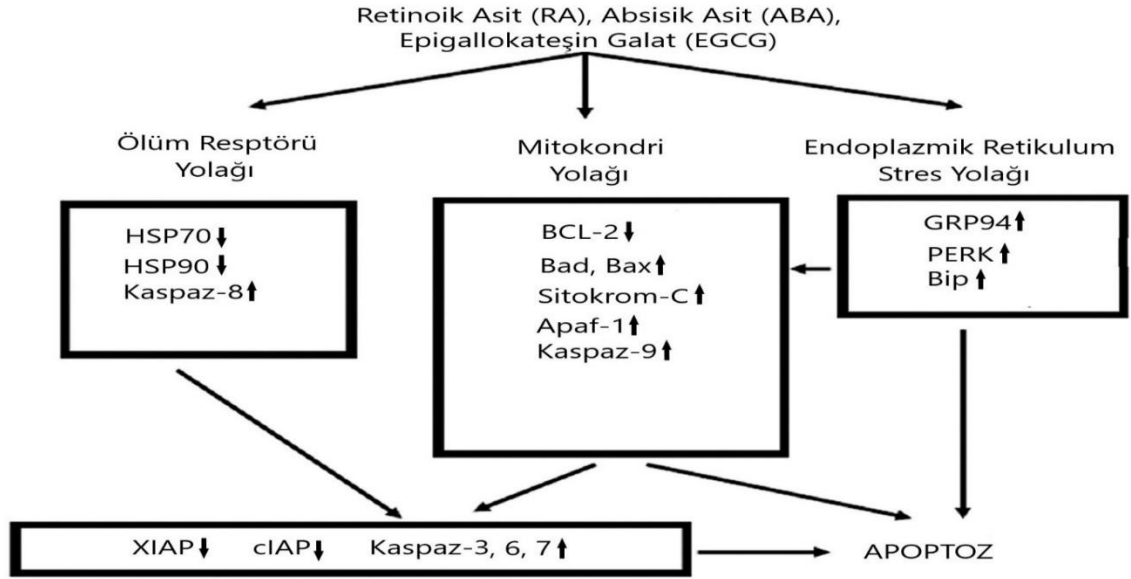
ABC yarı taşıyıcısı olan BCRP/MXR (ABCG2)'nin de mitoksantronun etkilerini azaltması üzerine veriler elde edilmiştir (Allen, Brinkhuis, Wijnholds ve Schinkel, 1999; Brangi vd., 1999; Doyle vd., 1998; Maliepaard vd., 1999; Ross vd., 1999). Bu veriler kadar net olmasa da; mitoksantron direnci, MRP1 (ABCC1) aşırı ifadesiyle de zayıf ölçüde ilişkilendirilmiştir (Breuning vd., 1995; Cole vd., 1994; Mirski, Gerlach ve Cole, 1987; Schneider, Horton, Yang, Nakagawa ve Cowan, 1994). Etopozid ile karşılaştırıldığında, MCF7 göğüs kanseri hücre hattında mitoksantrona karşı 6-10 kat çapraz direnç gelişir (Morrow, Smitherman, Diah, Schneider ve Townsend, 1998; Schneider vd., 1994).

## **2.3. Kanser Hücrelerinde Genel Sorun Olan Çoklu İlaç Direnci İle Mücadelede Alternatif Uygulamalar**

### **2.3.1. Absisik Asit (ABA)'in Kanser İle Mücadelede Etkisi**

Absisik asit (ABA) iyi bilinen bir bitki hormonudur. Hücre gelişimi ve strese yanıtta önemli rolleri vardır (Wasilewska, Vlad & Sirichandra, 2008). ABA kendisi gibi karotinoitten elde edilen retinoik asit (RA) ile yapısal olarak son derece benzerlik göstermektedir (Moise, Lintig & Palczewski, 2005). Yapılan en son çalışmalar RA sinyal yolağının glioma patogenezindeki önemini göstermiştir (Barbus, Tews & Karra, 2011; Campos, Centner & Bermejo, 2011). Retinoik asidin toksik etkilerinden ve ona karşı direnç geliştirilebileceğinden dolayı daha yeni anti kanser ajanlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Freemantle, Dragnev & Dmitrovsky, 2006; Lo-Coco, Avvisati & Vignetti, 2013). Zhou ve arkadaşlarının glioblastoma hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda; ABA'nın retinoik asit ile benzer anti kanser aktivitesi gösterip yan etkilerinin daha aza indirgenebileceğini belirtmişlerdir (Zhou vd., 2015). Şekil 2.15.'te retinoik asit, ABA ve epigallokateşin galatın; ölüm resptörü, mitokondri, ER stresi yolaklarında mevcut olan genlerin ifadeleri üzerindeki baskılayıcı ve teşvik edici etkileri gösterilmiştir (Wu vd., 2009).





**Şekil 2.12.** İnsan adrenal kanseri NCI-H295’de, retinoik asit, absisik asit, epigallokateşin galat gibi anti kanser ajanlarının indüklediği sinyal yolaklarında yer alan genlerin ifadelerinde meydana gelen değişimler.

Dr. Virginia Livingston’un 1976’da US patentli bir çalışmasında ABA’nın bir anti kanser ajanı olduğu belirtilmiştir (Livingston, 1976 (patent no: 3958025)). Araştırmacı ABA’nın, insan koryonik gonadotropin (hCG)’ini yüksüz hale getirdiğini belirtmiştir. hCG negatif yüklü bir glikoproteindir ve kanser hücrelerini çevreleyerek onları immün yanıtı karşı korur. Tan ve ekibi (2006); ABA’nın, tümör hücrelerini, hücre döngüsünü S fazında durdurarak hücre bölünmesini ve farklılaşmasını engellediğini ve aynı zamanda kanser hücrelerinin tekrar normal hücrelere dönmesini sağladığını rapor etmişlerdir (Tan vd., 2006 (Patent No: 1,748,674A)). Bununla birlikte Tan ve arkadaşları birçok farklı kanser hücresinde ABA’nın apoptozu tetiklediğini ve anjiyogenezi inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bunlara ek olarak trans retinollerle birlikte aynı anda ABA’nın sinerjistik etkisi; fare lösemi L178Y hücrelerinin bölünmesinin inhibisyonuyla da gösterilmiştir (Suzuki, Ezure & Ishida, 1998). İnsan endoservikal adenokarsionma SMMC-7221 hücreleri (Ma, Wu, Lu, Chu & Guo, 2006) ve tüsüz farelere transplante edilen insan hepatokarsinoma hücreleri üzerinde yapılan ABA uygulamalarıyla da hücre bölünmesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir (Lu vd., 2007). Hücre bölünmesinin inhibisyonu; ABA’nın 4 µM veya daha yüksek konsantrasyonuyla gerçekleştirilmiştir. Bu inhibisyonun etkilerini arttırmak için konsantrasyonla birlikte uygulama zamanını

arttırmak gerektiği belirtilmiştir (Lu vd., 2007). ABA, kanser hücrelerini hücre döngüsünün G0/G1 fazında tutmaktadır. Ma ve arkadaşları da ABA uygulandıktan sonra, SMMC-7221 hücrelerinin tekrar sağlıklı hücelere dönüştüklerini belirtmişlerdir (Ma vd., 2006). ABA; mtP53'ün, Ki67'nin, siklin D gen ifadelerini inhibe ederek hücre döngüsünü düzenlediği ve bu sayede bölünmenin baskılanmasına yardımcı olduğu (Lu vd., 2006), aynı zamanda kaspaz 3 mRNA'sının ifadesinin artmasını teşvik ederek apoptozu tetikleyebildiği belirtilmiştir (Zhao vd., 2008).

Kimyasal proteomiks yaklaşımlara göre ABA'nın sadece bitki dokularına bağlandığı varsayılmaktaydı ancak günümüzde ABA'nın memeli sistemlerinde de fonksiyonu ve mekanizması aydınlatılmış; HSP70 ailesine bağlanabildiği ortaya çıkarılmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda kanser hücrelerine, ABA'nın farklı dozları uygulanarak hücre bölünmesi ve antiapoptotik etkilerin baskılanabileceği düşünülmektedir (Galka, 2009; Kharenko, Boyd, Nelson, Abrams & Loewen, 2011; Nyangulu vd., 2005).

### **2.3.2. 17-N,N-dimetilaminoetilamino-17-demetoksi geldanamisin (17-DMAG)'in Çoklu İlaç Direnci Gelişmiş Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Etkisi**

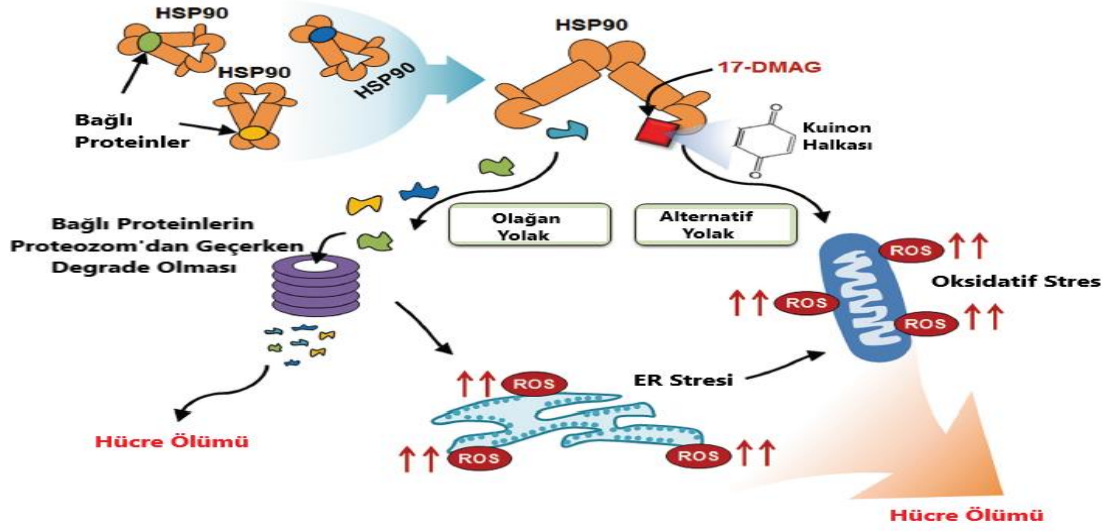
Isı şoku 90 (HSP90) inhibitörlerinin kullanılması tümör hücrelerini apoptozla götürmek için odak haline gelen yeni uygulamalardan biridir. HSP90, ATP bağımlıdır ve proteinlerin katlanmasından sorumlu moleküler şaperondur. Özofagusta, akciğerde, göğüste ve pankreasta meydana gelen katı tümörlerde HSP90 ifadesinin arttığı rapor edilmiştir (Shirota vd., 2015). Birçok kanser çeşidi üzerinde yapılan çalışmalar; HSP90'ın yüksek seviyelerdeki ifadesiyle, kanserlerin klinikopatolojik karakteristik özellikleri ve prognozları arasında ilişki olduğunu göstermiştir (Chen vd., 2014; Pick vd., 2007; Song vd., 2010). HSP90 bağımlı proteinlerin içinde çok sayıda onkogenik protein olduğundan, özgül inhibitörlerle HSP90'ı hedef alarak antikanser stratejileri geliştirilebileceği ümit edilmektedir (Neckers, L. & Neckers, K., 2002). Bununla birlikte, diğer kemoteropatik gruplara göre HSP inhibitörlerinin birçok avantajı vardır. Bu inhibitörler birçok onkoproteini hedef almaktadır. Ayrıca bu inhibitörler; tümör hücrelerini, kemoteropatik ilaçlara karşı savunmasız hale getirirler (Workman, Burrows, Neckers & Rosen, 2007). HSP90 inhibitörleri ile ilgili yapılan çalışmalarda; melanoma, akut miyeloid lösemi, kısırlığa neden olan dirençli prostat kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri ve

çoklu miyeloma gibi birçok kanser türü üzerinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Jhaveri vd., 2012).

Geldanamisin (GA)'in birçok türevi, HSP90 için inhibitör olma özelliğine sahiptir. Bu türevlerden en iyi bilenenleri; toksik etkisi az olan, suda çözünebilen ve oral yoldan alınması mümkün olan 17-alil amino-17-demetoksi geldanamisin (17-AAG) ve 17-N,N-dimetilaminoetilamino-17-demetoksi geldanamisin (17-DMAG)'dir. Oral yoldan alınması açısından 17-DMAG, 17-AAG'ye göre daha fazla avantaj taşımaktadır. Bu avantajlar; daha az hepatotoksik olması, daha etkili olması, daha kısa sürede metabolize olması ve plazmada yarılanma ömrünün daha uzun olması şeklinde sıralanabilir (Eisman vd., 2005; Jhaveri vd., 2012). 17-DMAG'ın, bir faz I denemesinde; akut miyeloid lösemi (tedaviye kısmi yanıt), kısırlığa neden olan dirençli prostat kanseri (tedaviye tam yanıt), melanoma (tedaviye kısmi yanıt), böbrek kanseri ve kıkırdak doku kanseri (hastalığın stabilitesi) gibi birçok kanser vakasına karşı klinik önemi belirtilmiştir (Pacey vd., 2011).

17-DMAG, ATP'ye bağlanma konusunda HSP90 ile rekabet halindedir. Bu sayede HSP90'ı inhibe eder (Stebbins vd., 1997). HSP90'ın 17-DMAG tarafından bu şekilde inhibe edilmesiyle, HSP90'a bağımlı proteinlerin doğru katlanamaması gibi birçok hücrel aktivite gerçekleşmeyeceğinden dolayı çoğunluk ile hücrelerde apoptoz meydana gelir (Burrows, Zhang & Kamal, 2004). HSP90'a bağımlı yapısı bozulmuş onkoproteinlerin fonksiyonel yapılarını kazanmalarını engellediğinden dolayı, GA ve türevleri reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olarak sitotoksik etki gösterirler. Bu mekanizmayla ilgili iki farklı açıklama mevcuttur (Dikalov, Landmesser & Harrison, 2002; Sreedhar vd., 2003). Birincisi, GA türevleri flavin içeren redüktazlar ve askorbatlar ile reaksiyona girerek reaktif oksijen radikalleri oluşturan kuinon grupları meydana getirirler. Vücutta indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid/nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD[P]H), kuinonu elektron kaynağı olarak kullanır. Bu sayede flavoenzimler tarafından katalizlenen kuinon bir veya iki elektron indirgenerek semikuinon veya hidrokuinona dönüşür (Deller, Macheroux & Sollner, 2008). Semikuinon/hidrokuinon radikali, oksijeni (O<sub>2</sub>) süperoksite indirgeyerek hücrel oksidatif hasarı teşvik eder (Beckman J., Beckman T., Chen, Marshall & Freeman, 1990; Dedon & Tannenbaum, 2004; Goldstein, Lind & Merenyi, 2005; Radi, 20004). İkincisi ER stresinden kaynaklanan mitokondriyal oksidatif stres ürünlerinin neden olduğu

HSP90 inhibisyonudur. Bu durumda artan ER stresi ile birlikte, ER’de katlanmamış proteinler birikir. Artan ER stresi mitokondrinin homeostazını bozar ve bu şekilde mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olur (Taiyab, Sreedhar & Rao, 2009). Bütün bu durumlar kanser hücrelerinde apoptozu tetikler (Şekil 2.16.).



Şekil 2.13. Kanser hücrelerine karşı 17-DMAG’ın kuinon’u indirgeyerek reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi (Kim vd., 2017).

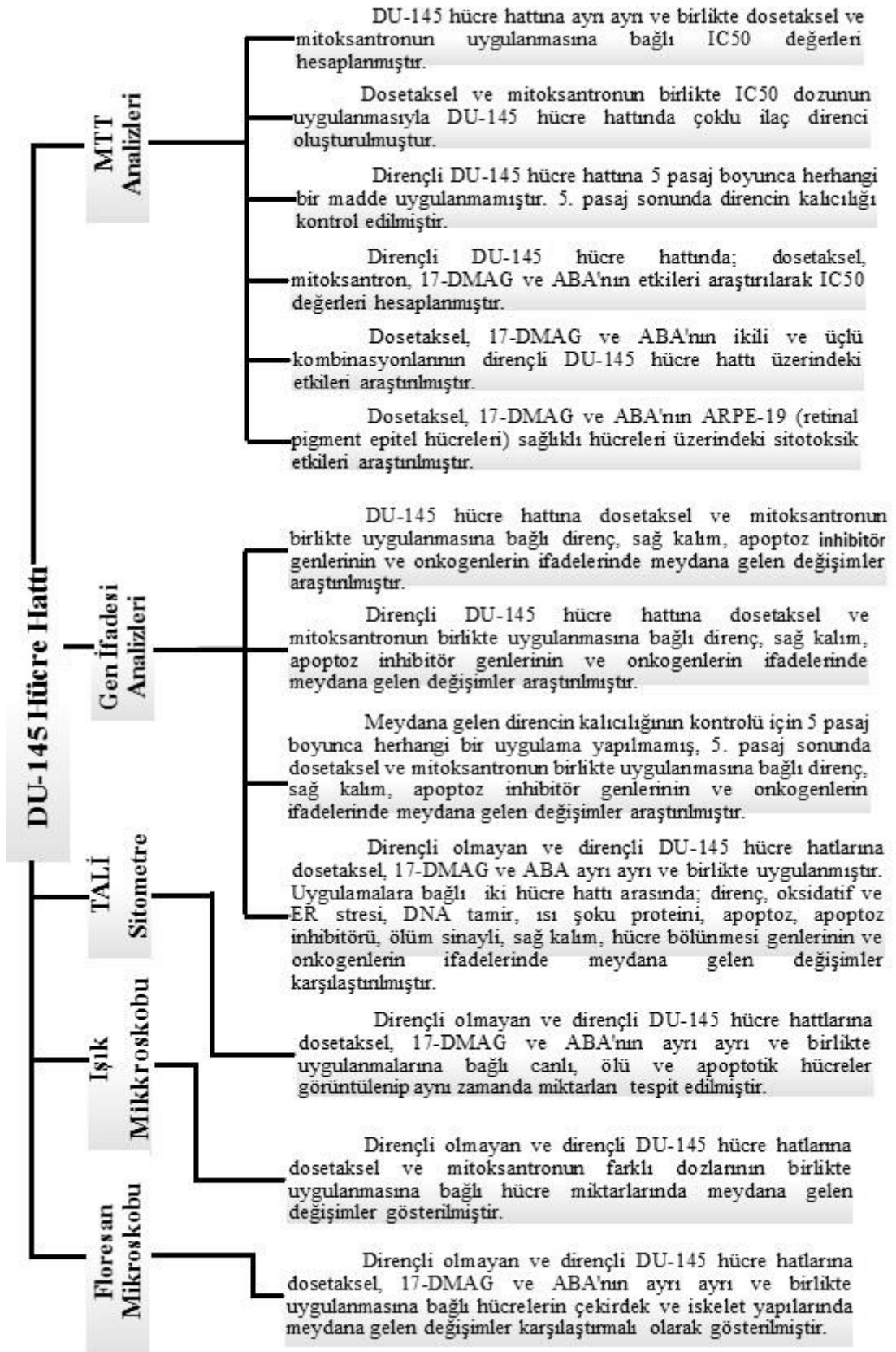
## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Çalışmaya Genel Bakış ve Takip Edilen Basamaklar

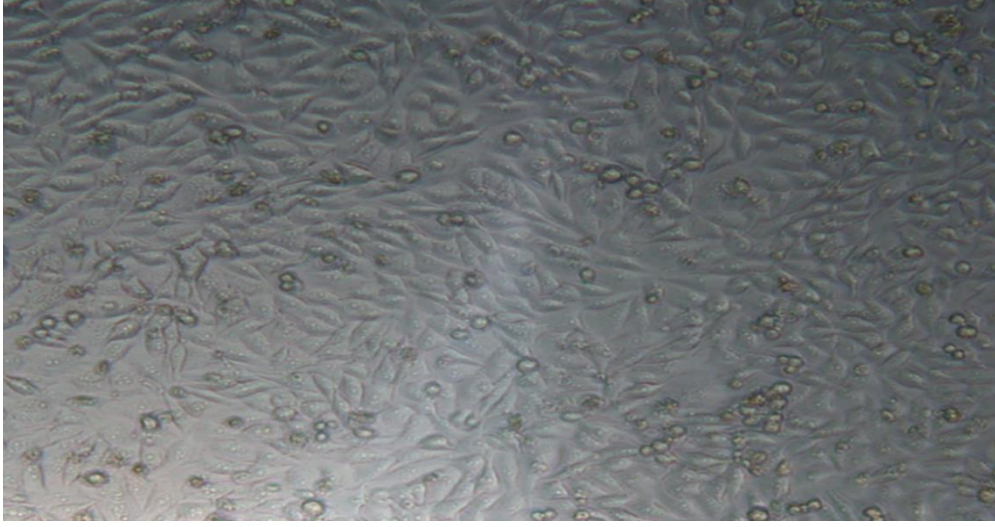
Çalışmada uygulanan maddelerin sitotoksik etkilerine bağlı olarak hücrelerin canlılık miktarını göstermek için MTT (3,(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) analizleri ve ışık mikroskobu görüntülemesi, gen ifadelerinde meydana gelen değişimleri göstermek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) analizleri, canlı-ölü ve apoptotik hücreleri hem göstermek hemde miktarlarını tespit etmek için TALİ görüntü temelli sitometre analizi ve uygulanan maddelere karşı hücrelerin membran ve çekirdek yapılarında meydana gelen bozulmaları göstermek için floresan mikroskop görüntülemesi yapılmıştır. Bu çalışmalar için takip edilen basamaklar Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada yapılan analizler ve takip edilen basamaklar.

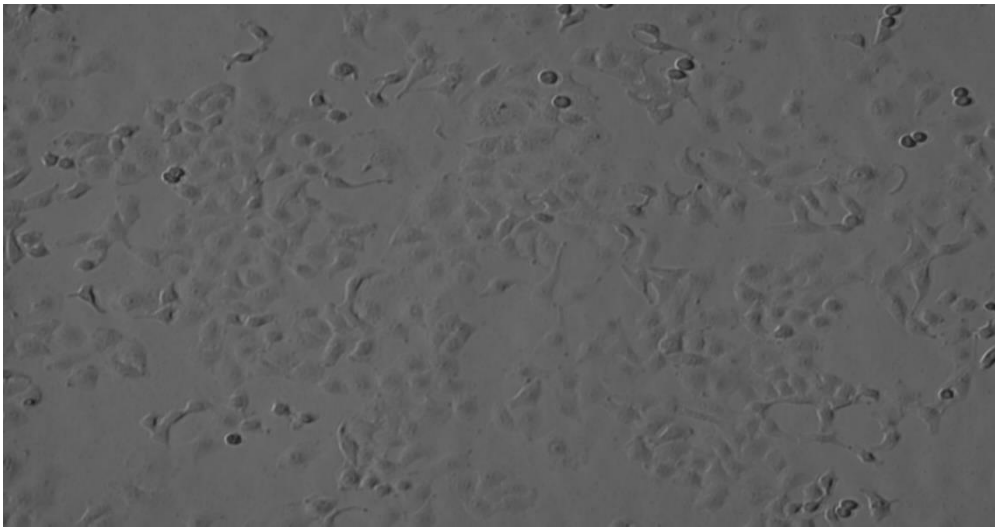


### 3.2. Kullanılan Hücre Hatları

Prostat kanseri (DU-145; DU 145 ATCC ® HTB-81™) hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınmış, denemelerin karşılaştırılması amacıyla kullanılan sağlıklı hücre hattı olarak insan retinal pigment epitel hücreleri (ARPE-19 ATCC ® CRL-2302™) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından tedarik edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücrelerin mikroskopik görüntüleri Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de verilmiştir.



**Şekil 3.1.** DU-145 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X).



**Şekil 3.2.** ARPE-19 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X).

Kullanılan hücre hatlarına ait genel bilgiler Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

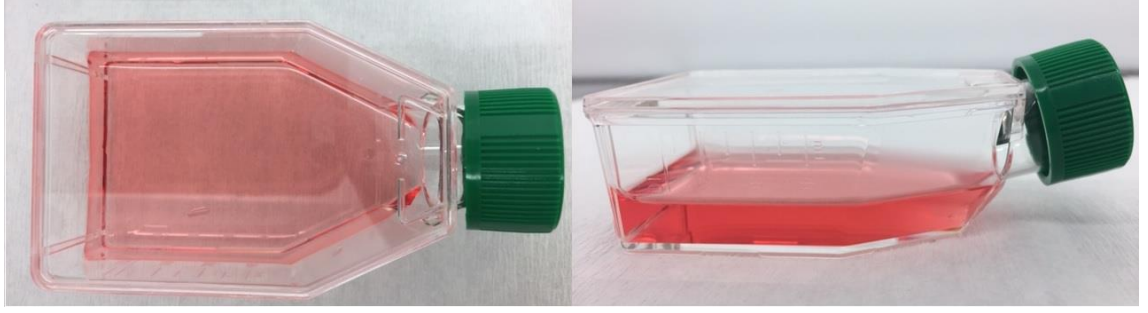
**Çizelge 3.2.** ARPE-19 ve DU-145 hücre hatları hakkında genel bilgiler.

	<b>ARPE-19</b>	<b>DU-145</b>
<b>Organizma</b>	İnsan	İnsan
<b>Doku</b>	Göz Retinal Pigment Epitel; Retina	Prostat
<b>Morfoloji</b>	Epitel	Epitel
<b>Kültür Özellikleri</b>	Yapışkan	Yapışkan
<b>Hastalık- Sağlık Durumu</b>	Sağlıklı	Kanser

### **3.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması**

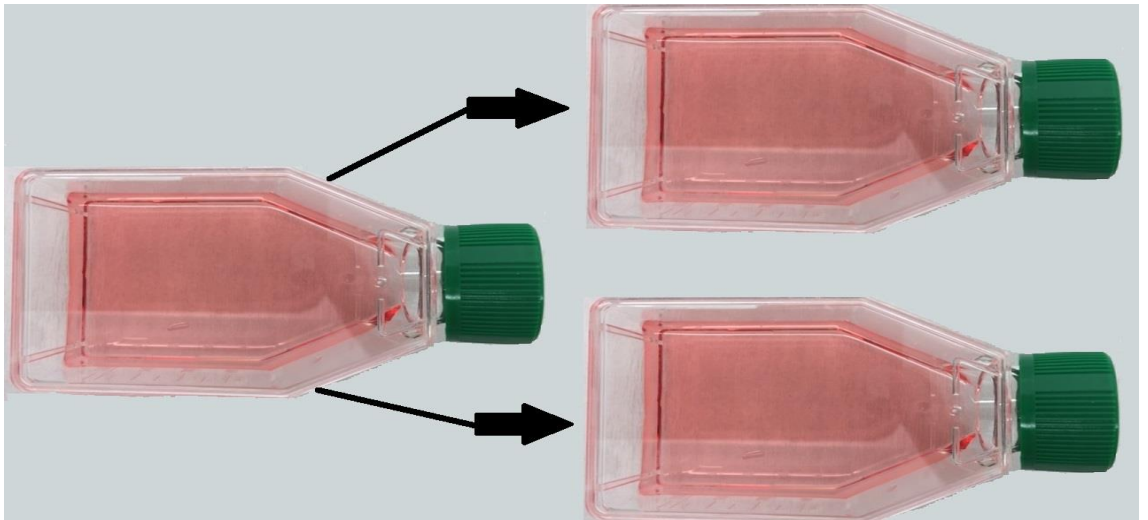
Hücreler; steril hücre kültürü odasında mevcut olan, laminar kabin (Heraeus HeraGuard HPH9) içinde kültüre edilmiştir. Hücreleri kültürü için; “Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham”, %5 fetal sığır serumu (FBS; SIGMA-ALDRICH), %1 L-Glutamin (Thermo-Fisher), hücreleri bakteriyel kontaminasyona karşı korumak için 100 IU/ml penisilin-streptomisin (Pen-Strep; Thermo-Fisher) antibiyotik ve 100X antibiyotik-antimikotik (Gibco) kullanılmıştır. Hazırlanan karışımdan, herbir 25 cm<sup>3</sup>'lük flaska (NEST 25) 4 ml besiyeri olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır (Şekil 3.3.).





**Şekil 3.3.** Besiyeri-hücre karışımının 25 cm<sup>3</sup>'lük flaska ekilmesi.

Flasklara ekilen hücreler 37°C de % 95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (Hera Cell) kültüre alınmıştır. Hücreler, flaskın iç taban yüzeyine tutunup çoğalmalarını kontrol etmek amacıyla invert ışık mikroskopuyla (Eclipse TS100; Nikon) gün aşırı takip edilmiştir. Flask iç yüzey tabanına yapışan hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla 48 saat aralıklarla pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde, flask içindeki besi yeri steril kabin içinde uzaklaştırılarak hücrelere daha önceden 37°C sıcaklığa getirilmiş tripsin-EDTA (MULTICELL 352-542-EL) uygulanmış ve 5 dakika beklenilerek tabana tutunmuş hücrelerin tabandan ayrılması sağlanmıştır. Hücrelerin tabandan ayrıldığı mikroskop aracılığı ile kontrol edildikten sonra hücre-tripsin-EDTA karışımı 15 ml hacmindeki santrifüj tüplerine alınarak 2500 g hızda 2,5 dakika santrifüj (CENTURION SCIENTIFIC) edilmiş ve tüpün dibinde kalan hücreler 4 ml yeni besiyeri ile resüspanse edilerek 25 cm<sup>3</sup> hacimli flasklara ekilmiştir (Şekil 3.4.).



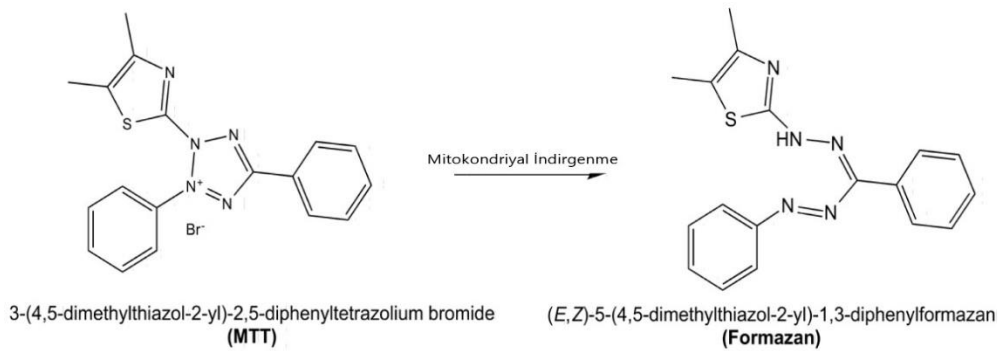
**Şekil 3. 4.** Flasklardaki hücrelerin pasajlanması.

Hücrelerin dondurulması işlemi için yeterli miktarda hücre tripsinize edildikten sonra santrifüj edilerek tripsin uzaklaştırılmış ve %5 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (MERCK 67-68-15) içeren 1,5 ml'lik hücre-besiyeri karışımı ile suspanse edilerek -80°C (Wis; Daihan Scientific) derin dondurucuya alınmıştır. Dondurulan hücreler tekrar kullanılacağı zaman 37°C'ye gelmesi için etüvde bekletilmiş, istenilen sıcaklığa geldikten sonra toplam hacim 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 2500 g'de 2,5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazda mevcut olan DMSO'lu besiyeri uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan hücre pelleti yeni besiyeri ile resüspanse edilerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

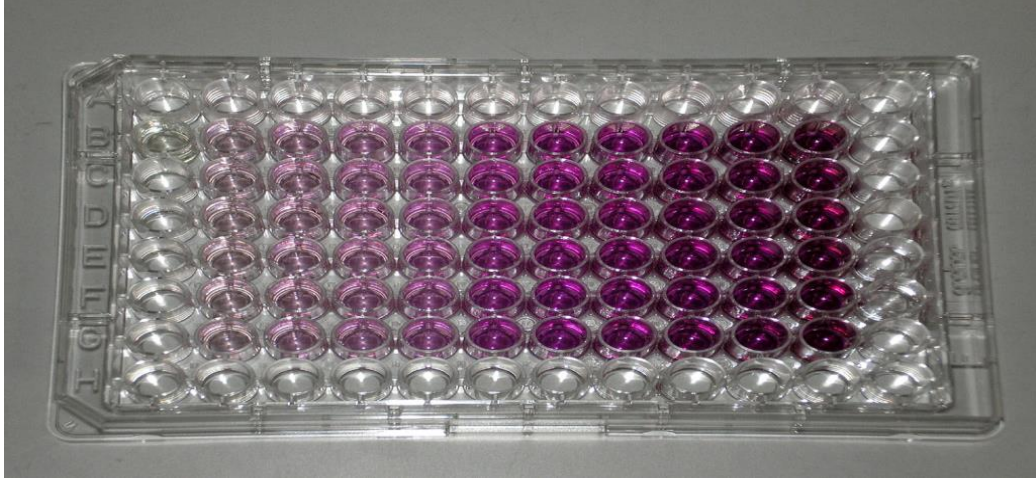
### 3.3. MTT Yöntemi ile Hücre Hatlarına Uygulanacak Madde Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

DU-145 ve ARPE-19 hücre hatlarına uygulanacak dosetaksel, mitoksantron, absisik asit (ABA) ve 17-DMAG maddelerinin konsantrasyon ve uygulama sürelerinin belirlenmesi amacıyla MTT analizleri yapılmıştır.

MTT analizi; hücrelerin metabolik aktivitelerini kolorometrik olarak ölçmeye yarayan bir metottur. Bu metotta NAD(P)H bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri aracılığı ile hayatta kalan hücrelerin varlığı gösterilmektedir. Oksidoredüktaz enzimleri, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidi, onun çözünmeyen formu olan formazana indirger. İndirgenen formazan, DMSO eşliğinde canlı hücrelerin miktarlarına göre pembe ile mor renklerin farklı tonlarını almalarına neden olurken, tüm hücrelerin ölümüne neden olacak maddeler uygulandığında ortam herhangi bir renk almadan şeffaf görünüm kazanmaktadır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. MTT'nin formazana indirgenmesi (Mosmann, 1983).



**Şekil 3.6.** 96'lık plakanın MTT analizi örneği.

Uygulanan maddelere göre elde edilen MTT analizlerinin sayısal olarak değerlendirilebilmesi için; 96'lık plakalardaki herbir kuyuya 5 mg/ml konsantrasyonda 20 µl MTT solüsyonu uygulanmıştır. Plakalar 37°C de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 2 ila 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerinde bulunan sıvı faz mikropipet yardımıyla, hücreleri plakanın dibinden almayacak şekilde dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Plakaların kuyularının tamamına 180 µl DMSO uygulanmış ve daha sonra spektrofotometre cihazında 492 nm dalga boylarında absorbans belirlenerek hücrelerin yüzde canlılık miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.6.). Aynı zamanda elde edilen verilerin SPSS Probit analizleriyle sağlaması yapılmıştır.

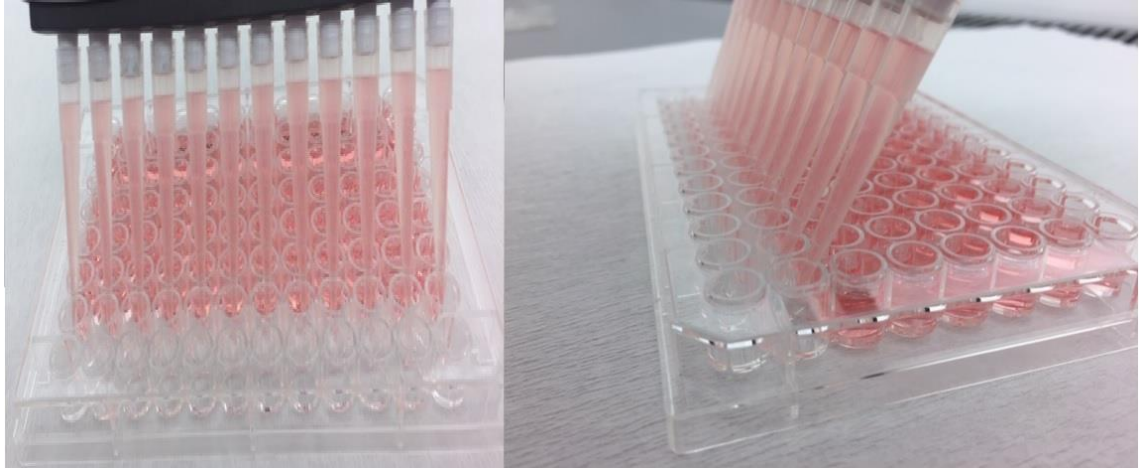
Elde edilen absorbans değerlerine göre plakalardaki yukardan aşağı her bir sıradaki kontrol ve maddenin farklı dozları uygulanan hücrelerin bulunduğu kuyucukların absorbans değerleri alınarak canlılık miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Hücre Canlılığı: } (\text{İlaç uygulaması yapılan kuyucukların absorbans değeri} / \text{Kontrol kuyucukların absorbans değeri}) * 100 \quad (3.1.).$$

Çalışmada kullanılan ilaçların her biri için yapılan MTT analizleri aşağıda ayrıntıları ile açıklanmıştır.

Çalışmamızda DU-145 hücre hattında çoklu ilaç direnci meydana getirmek için ilk olarak prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanlar olan dosetaksel ve

mitoksantronun seri sulandırım ile hazırlanmış farklı dozları DU-145 hücrelerine ayrı ayrı ve birlikte 24, 48 ve 72 saatlik farklı zaman dilimlerinde uygulanarak, bu hücrelerin yarısının hayatta kaldığı doz olan en yüksek inhibitör konsantrasyonunun yarısı (IC50) MTT analizi aracılığı ile hesaplanmıştır. IC50 değerinin hesaplanabilmesi için DU-145 hücre hattı, toplamda 9 adet 96 kuyucuklu şeffaf spektrofotometrik plakalara ekilmiştir. Bunun için her bir kuyucukta yaklaşık olarak  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde  $180 \mu\text{l}$ 'lik hacimlerde besiyeri-hücre karışımı eşit olarak ekilmiştir (Şekil 3.7.).

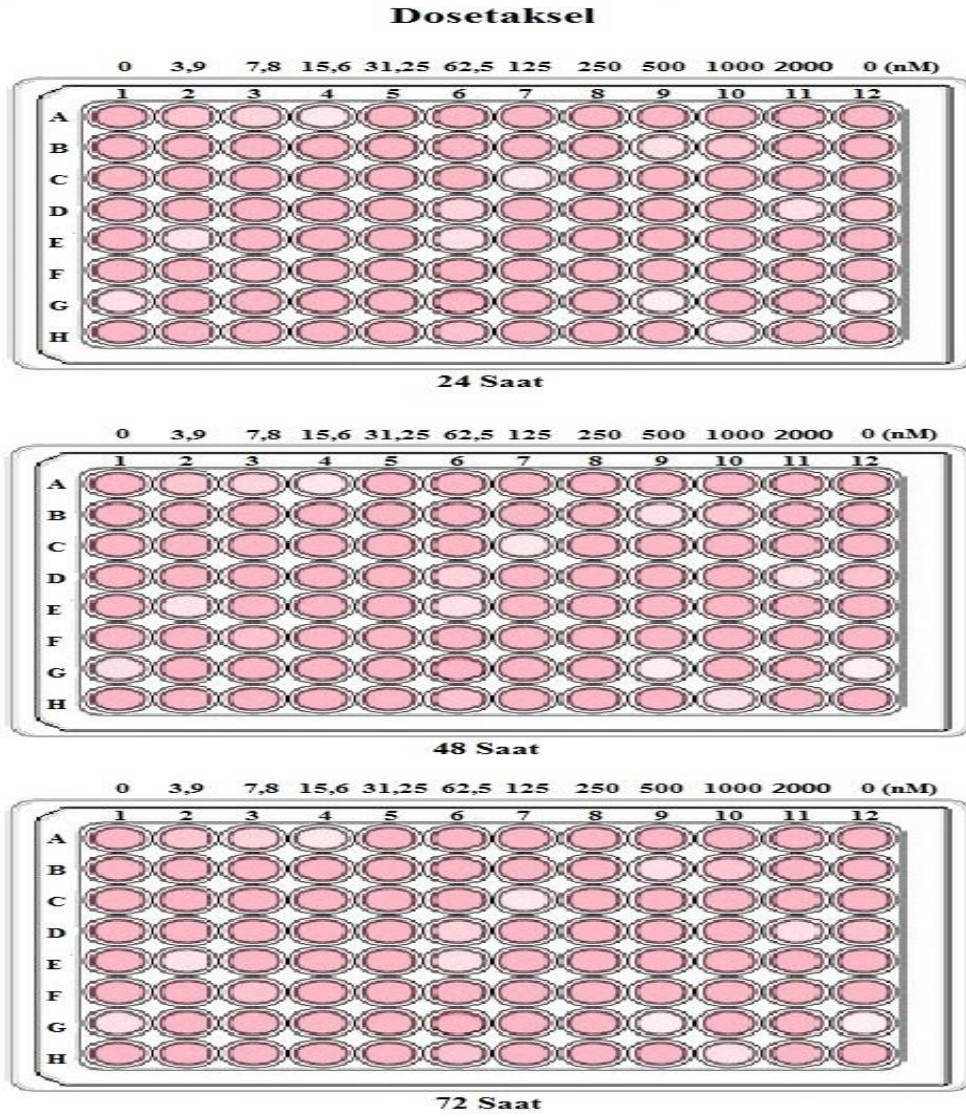


**Şekil 3.7.** Hücre-besiyeri karışımının 96'lık plakalara ekilmesi.

Dosetaksel ve mitoksantron uygulanmadan önce hücrelerin kuyucuk iç taban yüzeylerine tutunabilmesi için 24 saat beklenilmiştir. Hücreler taban yüzey alanına tutunduktan sonra DU-145 hücreleri üzerindeki etkin IC50 değerlerinin hesaplanması için dosetaksel ve mitoksantron aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

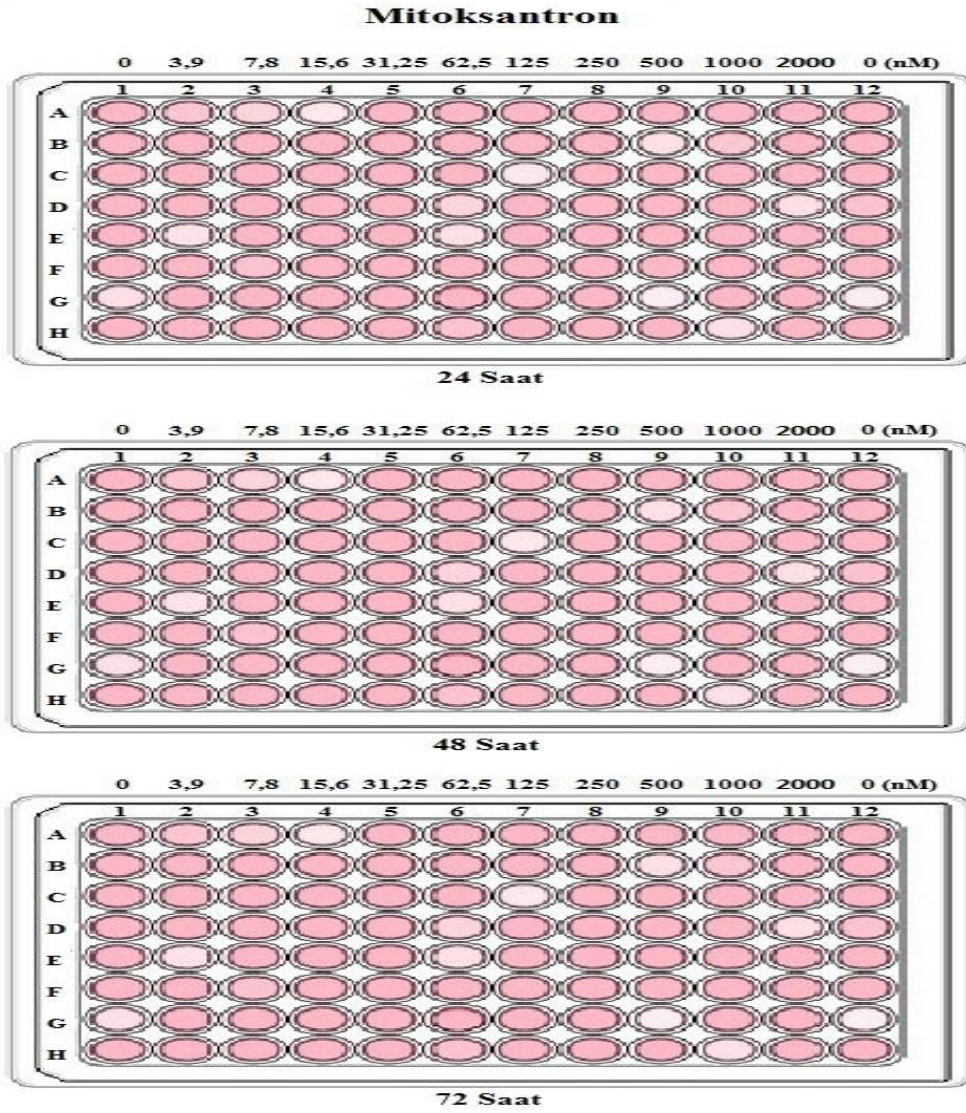
**Dosetaksel (Taxotere; Sanofi aventis)** %10 etanol, %10 fosfat tampon tuzu (PBS) ve %80 ultra saf su karışımı içinde çözülmüştür. 3 adet 96'lık plakanın kuyucuklarına aynı şekilde sırasıyla; 3,9 nM, 7,8 nM, 15,6 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1  $\mu\text{M}$  ve 2  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 20  $\mu\text{l}$  dosetaksel uygulanmıştır. Uygulamayı takiben 24, 48 ve 72. saatlerde MTT analizleri yapılmıştır (Şekil 3.8.).





**Şekil 3.8.** DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat dosetaksel uygulanması.

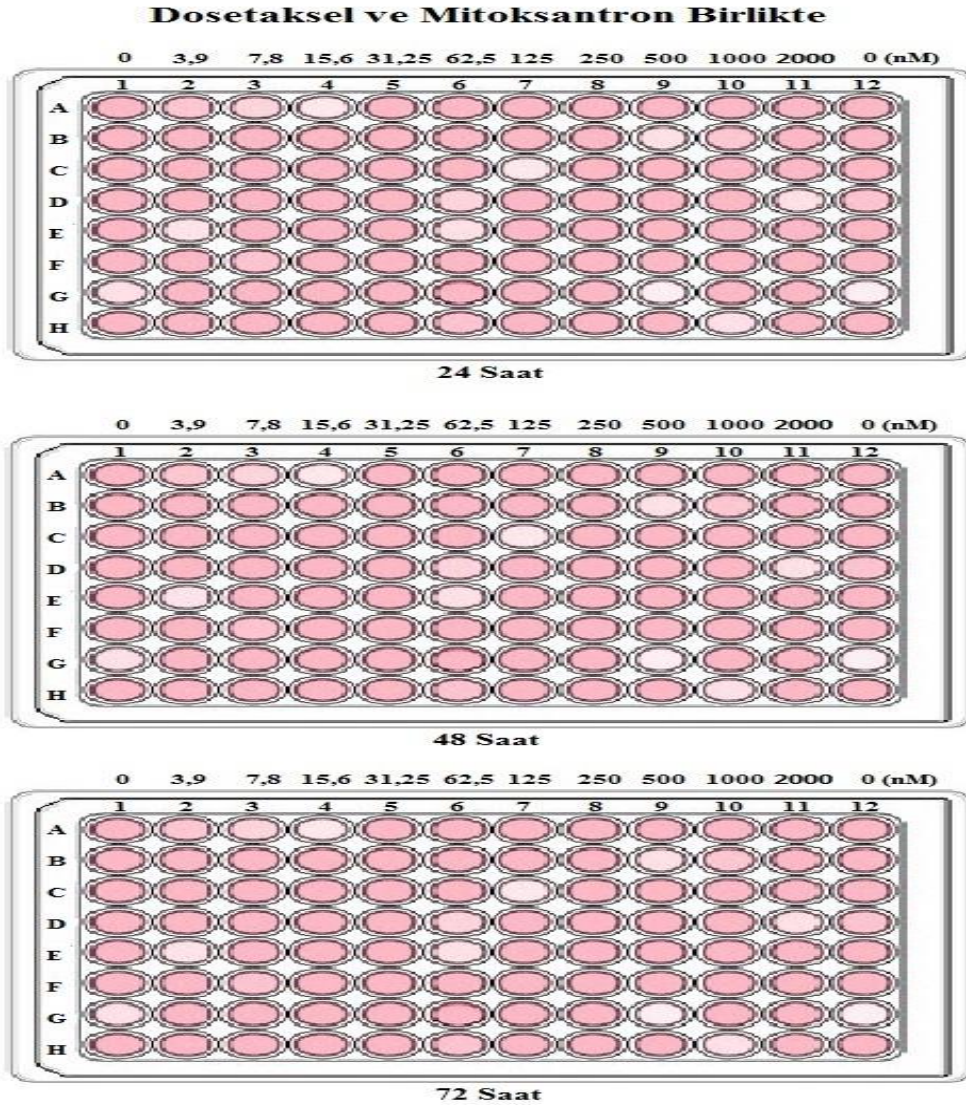
**Mitoksantron (Mitoxantrone; Koçak Farma)** %10 etanol, %10 fosfat tampon tuzu (PBS) ve %80 ultra saf su karışımı içinde çözülmüştür. 3 adet 96'lık plakanın kuyucuklarına aynı şekilde sırasıyla; 3,9 nM, 7,8 nM, 15,6 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM ve 2 µM konsantrasyonlarda 20 µl mitoksantron uygulanmıştır. Uygulamayı takiben 24, 48, ve 72. saatlerde MTT analizleri yapılmıştır (Şekil 3.9.).



**Şekil 3.9.** DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat mitoksantron uygulanması.

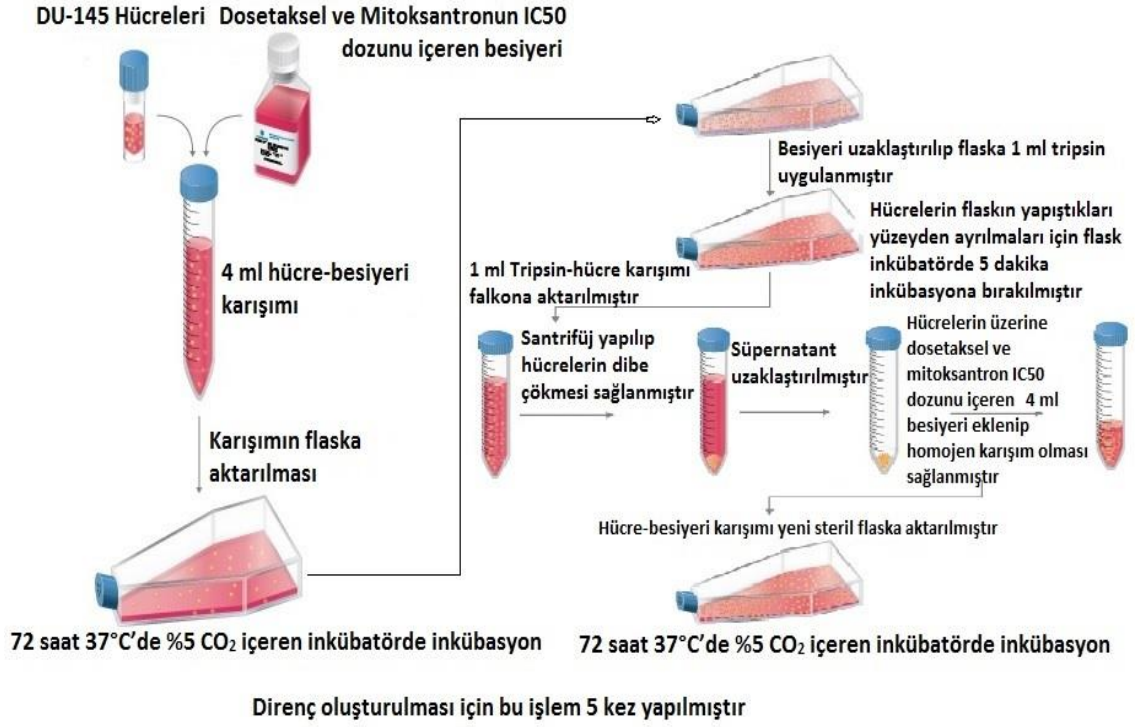
**Dosetaksel ve Mitoksantron Kombinasyonunda** her iki kanser ilacı da %10 etanol, %10 fosfat tampon tuzu (PBS) ve %80 ultra saf su karışımı içinde çözülmüştür. 2 adet 96'lık plakanın kuyularına dosetaksel ile mitoksantron birlikte; 3,9 nM, 7,8 nM, 15,6 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM ve 2 µM konsantrasyonlarda (her bir ilacın konsantrasyonu ayrı ayrı belirtilen miktarlarda olacak şekilde) her bir kuyucuğa 20 µl hacimde uygulanmıştır. Uygulamayı takiben 24, 48 ve 72. saatlerde MTT analizleri yapılmıştır (Şekil 3.10).





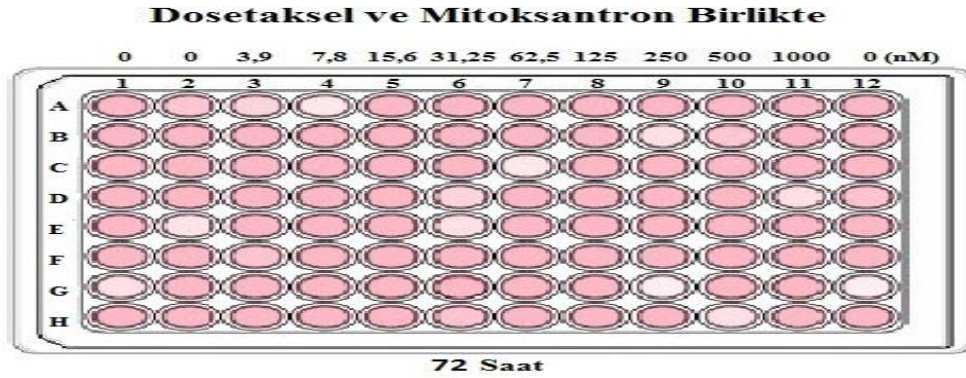
**Şekil 3.10.** DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanması.

Yapılan analizler sonucunda en uygun IC<sub>50</sub> değeri dosetaksel ve mitoksantronun birlikte 72 saat uygulanmasıyla (sonuçlar kısmında detaylar verilmiştir) elde edilmiştir. İkinci aşamada bulunan IC<sub>50</sub> değeri; her pasaj için 72 saat süreyle DU-145 hücrelerine 5 pasaj uygulanarak, hücrelerin uygulanan ilaçlara karşı çoklu ilaç direnci geliştirmesi teşvik edilmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11.** DU-145 hücre hattında direnç oluşturulması.

DU-145 hücrelerinde çoklu ilaç direnci meydana gelip gelmediğini kontrol etmek için Şekil 3.11.'deki işlemler 5 kez yapıldıktan sonra hücreler doksetaksel ve mitoksantron içermeyen 180 µl besiyeri ile birlikte 96'luk plakaya ekilmiştir. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde 24 saat inkübasyondan sonra hücrelerin plakanın çukurlarına yapıştıkları kontrol edilmiş ve MTT analizi yapılmak üzere 20 µl 3,9-1000 nM doksetaksel-mitoksantron uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.12.).

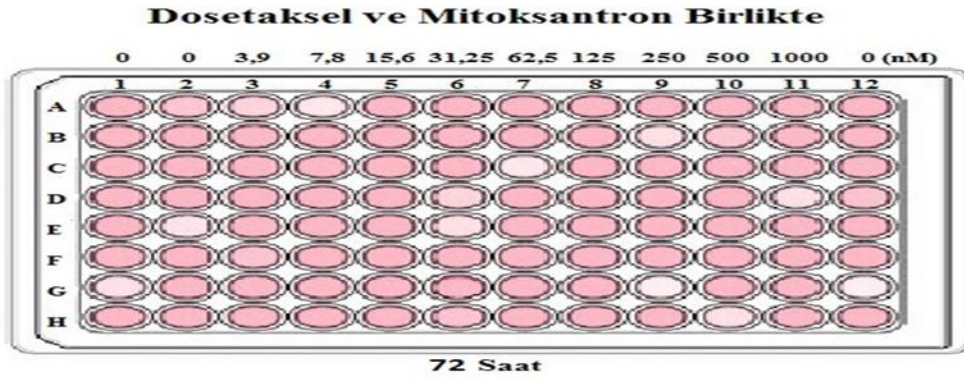


**Şekil 3.12.** DU-145 hücre hattının dirençli hale geldiğinin kontrol edilmesi.



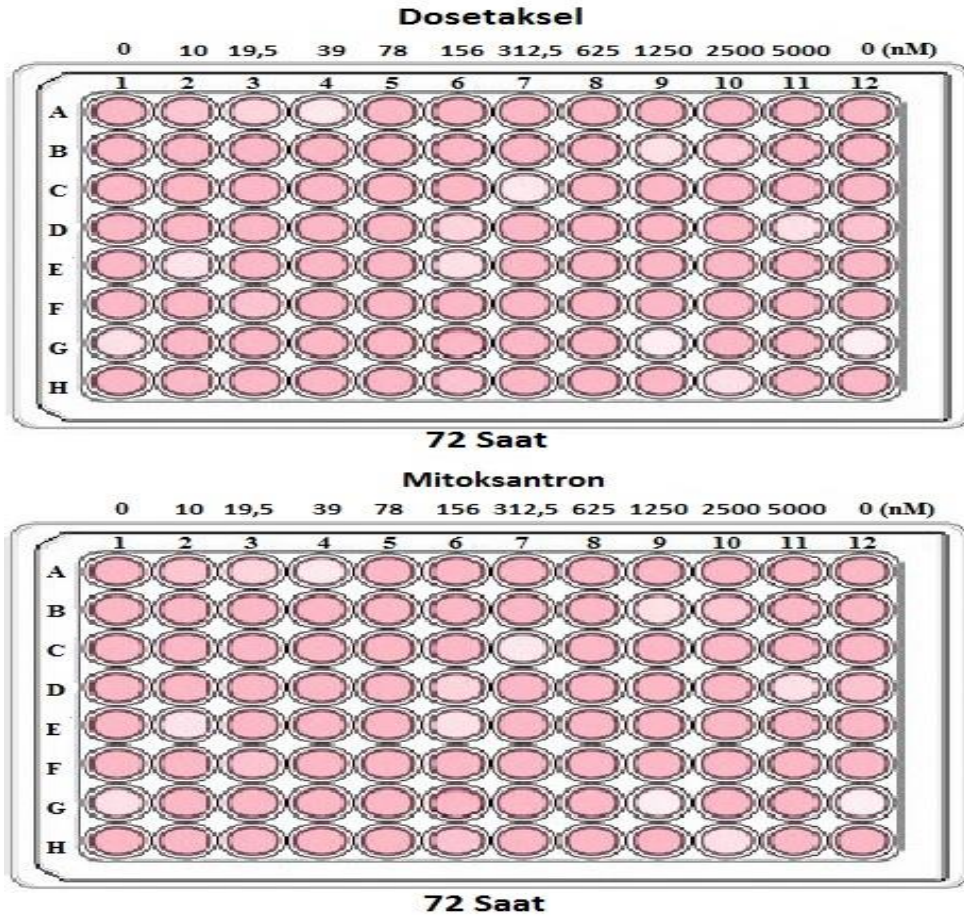
Uygulamadan elde edilen IC50 dozunun, direnç geliştirilmemiş DU-145 hücrelerinden elde edilen IC50 dozuyla karşılaştırılması sonucunda artışın anlamlı olduğu sonucuna varılmış (sonuçlar kısmında açıklanmıştır) ve bu anlamlı artış çoklu ilaç direnciyle ilişkilendirilmiştir.

DU-145 hücrelerinde oluşturulan direncin korunmasını garanti altına almak çalışmanın bundan sonraki basamakları açısından son derece önemli olduğu için; direnç oluşturulmuş DU-145 hücre hatları herhangi bir madde uygulanmadan 5 kez pasajlanmıştır. 5. pasaj sonunda dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasıyla yapılan MTT analizleri sonucunda direncin korunduğu ispatlanmıştır (sonuçlar kısmında belirtilmiştir) (Şekil 3.13.).



**Şekil 3.13.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamış, 5. Pasaj sonunda dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı yapılan MTT analiziyle direncin korunduğunun ispatlanması.

Direnç gelişiminden sorumlu olan dosetaksel ve mitoksantronun bu aşamadan sonra ayrı ayrı etkileri dirençli olmayan DU-145 hücre hattındaki ile aynı olamayacağından dolayı bu kemoterapik ajanların 0,39-200 nM'lık dozlarının direnç oluşturulmuş DU-145 hücrelerinde 72 saatlik etkileri MTT analizleri aracılığı ile araştırılmıştır (sonuçlar kısmında elde edilen IC50 dozları belirtilmiştir) (Şek 3.14.).

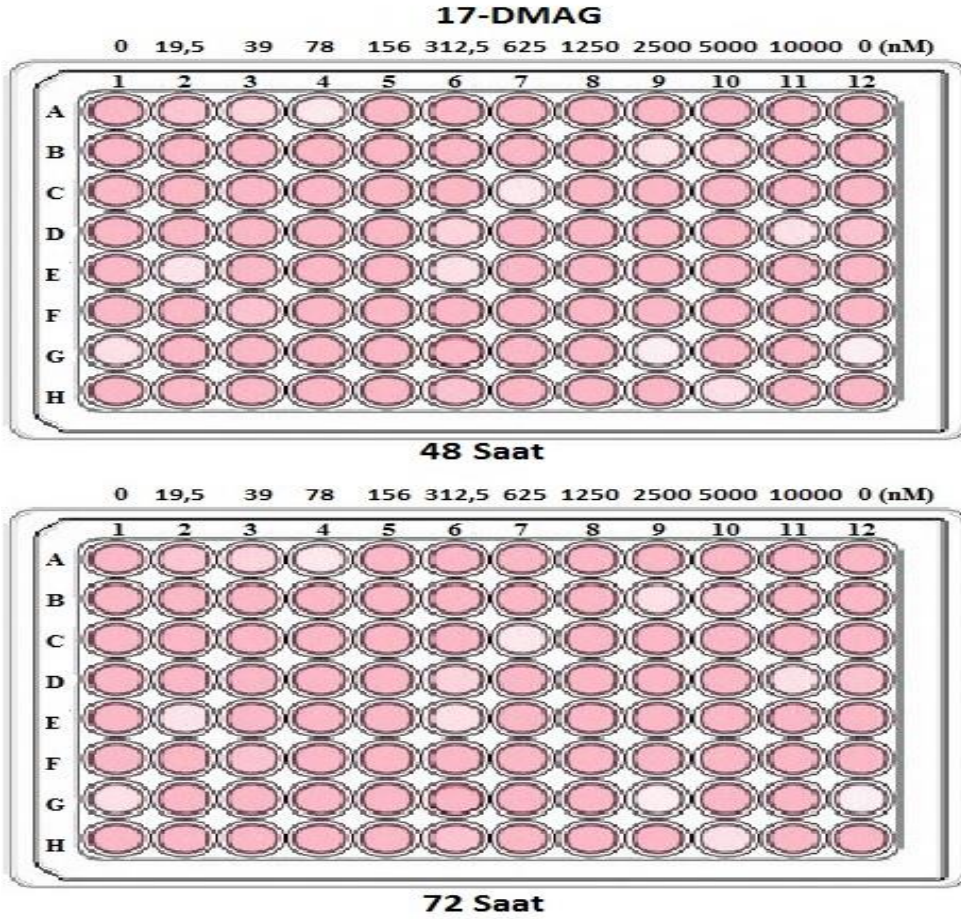


**Şekil 3.14.** Dirençli DU-145 hücre hattında dosetaksel ve mitoksantronun IC50 dozlarının belirlenmesi MTT analizleriyle belirlenmesi.

Çalışmanın amacı çoklu ilaç direnci oluşturulmuş DU-145 hücreleri üzerinde 17-DMAG ve ABA'nın etkilerini göstermektir. Aynı zamanda dosetaksel prostat kanseri tedavisinde kullanılan en önemli kemoteropatik ajanlardan biridir. Mitoksantron da prostat kanseri tedavisinde kullanılmasına karşın dosetaksele göre çok daha sitotoksik olduğundan direnç geliştirme aşamasından sonra kullanılmamıştır. Dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın ayrı ayrı ve birlikte dirençli DU-145 hücre hatları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bunun için:

**17-DMAG** [17-dimethylamino-ethylamino-17-demethoxygeldanamycin (Sigma-Aldrich)] ultra saf suda çözülmüştür. 2 adet 96'lık plakaya, her bir kuyucuğa 180 µl  $10^5$  hücre olacak şekilde çoklu ilaç dirençli DU-145 hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin kuyucukların tabanına yapıştıkları kontrol edildikten sonra seri sulandırım yöntemi ile

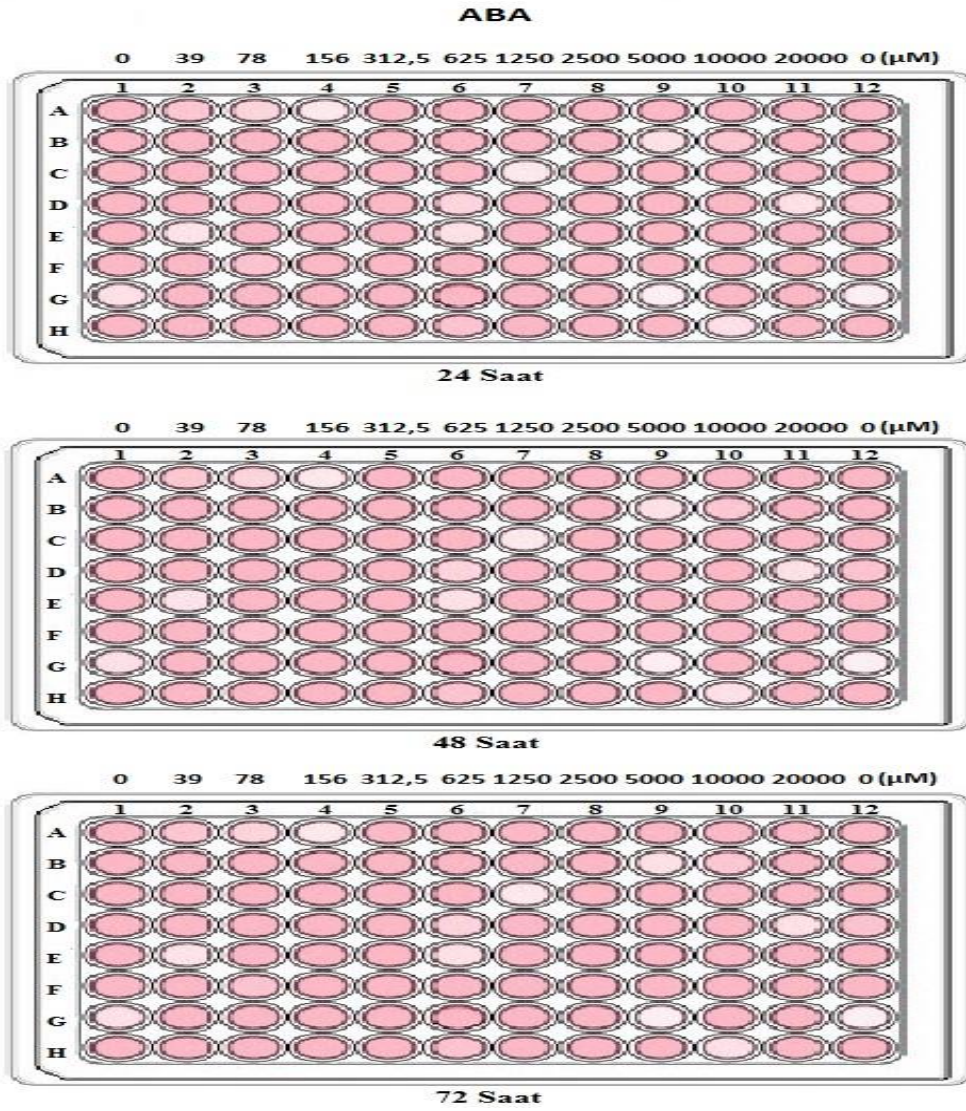
19,5 nM-, 39 nM, 78 nM, 156 nM, 312,5 nM, 625 nM, 1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M konsantrasyonlarında 20  $\mu$ l hacminde 17-DMAG uygulanmıştır. 17-DMAG uygulaması yapıldıktan 48 ve 72 saat sonra MTT analizleri aracılığı ile IC50 dozları hesaplanmıştır (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. 17-DMAG'ın dirençli DU-145 hücre hattı için IC50 dozunun hesaplanması.

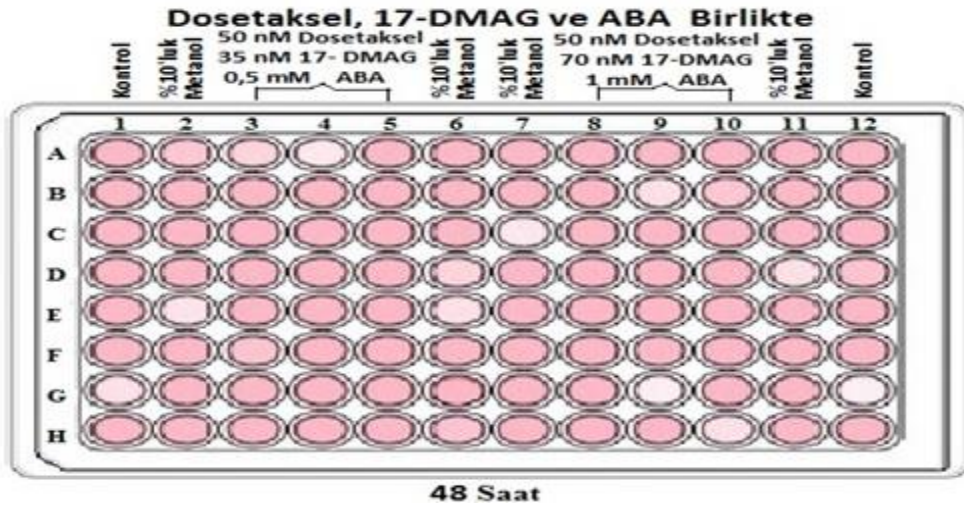
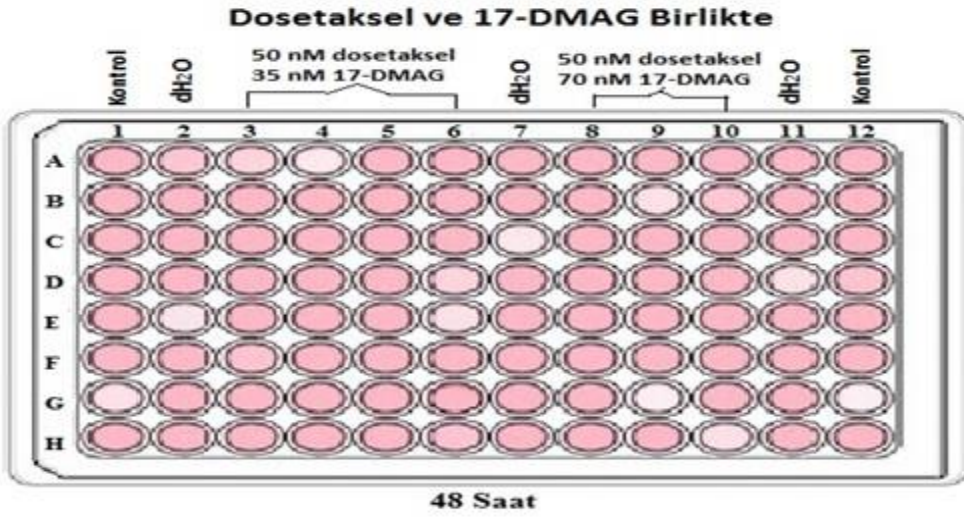
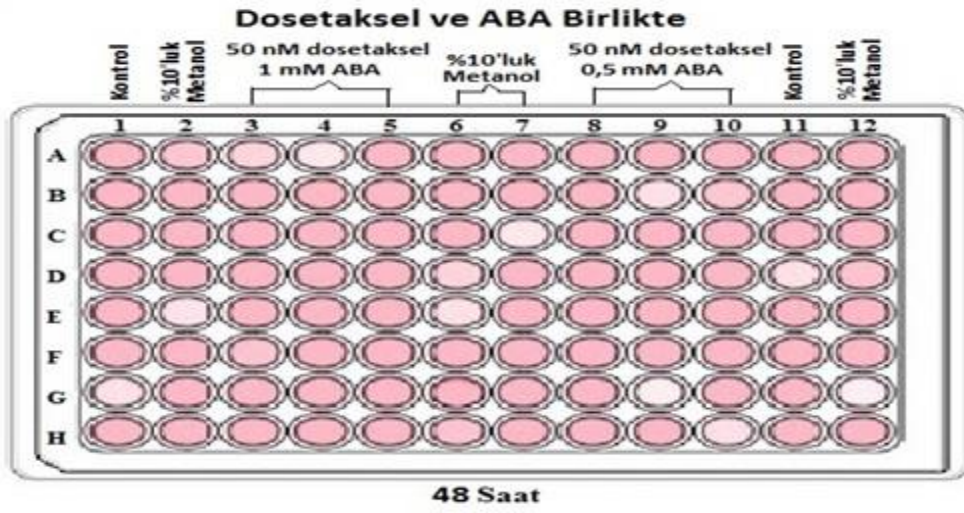
**Absisik Asit [(+)-Abscisic Acid (Sigma-Aldirch)]** %10 metanol ve %90 ultra saf su karışımı içinde çözülmüştür. 3 adet 96'lık plakaya dirençli DU-145 hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin, plakaların kuyucuklarının tabanına yapıştıkları kontrol edildikten sonra seri sulandırım yöntemi ile 39  $\mu$ M, 78  $\mu$ M, 156  $\mu$ M, 312,5  $\mu$ M, 625  $\mu$ M, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM konsantrasyonlarında her bir kuyucuğa 20  $\mu$ l olacak şekilde ABA uygulanmıştır. 24, 48 saat ve 72 saat sonra MTT analizleri yapılmıştır (Şekil 3.16).





**Şekil 3.16.** ABA'nın dirençli DU-145 hücre hattına uygulanıp MTT analizi yapılması.

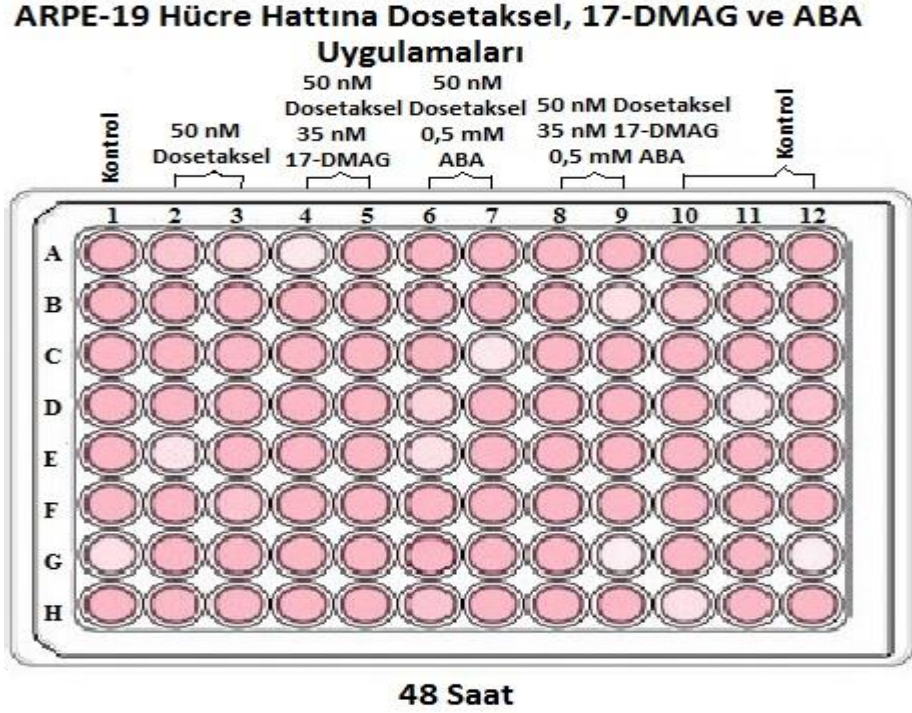
Bu aşamadan sonra dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın ikili ve üçlü uygulamalarına bağlı dirençli DU-145 hücre hattı üzerindeki kemoterapik etkileri MTT analizleri yapılarak araştırılmıştır (Şekil 3.17).



**Şekil 3.17.** Dirençli DU-145 hücre hattına dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın ikili ve üçlü kombinasyonlar şeklinde uygulanması.



Son olarak dosetaksel, ABA ve 17-DMAG'ın ayrı ayrı ve birlikte etkin dozlarının sağlıklı hücreler üzerindeki etkilerini araştırmak için ARPE-19 hücre hattına uygulanarak MTT analizleri yapılmıştır (Şekil 3.18.).



**Şekil 3.18.** Dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın etkin dozlarının ARPE-19 hücre hattına uygulanması.

MTT analizlerinden elde edilen verilere göre bu maddelerin sinerjistik (birbirinin etkisini arttıran)/antagonistik (birbirinin etkisini azaltan) veya aditif (birbirini etkilemeyen) etkileri aşağıda verilen istatistiksel yöntemlere göre araştırılmıştır (A; 17-DMAG, B; ABA, AB; Her ikisinin birlikte uygulanması):

**a) İlaç Etkileşimlerinin Katsayısı (CDI: Coefficient of the interactions)**

Bu yöntemle göre madde uygulaması yapılmayan kontrol grubunun canlılık miktarı 100 olarak kabul edilmekte ve bu sayı 100'e bölünüp 1 sabit sayısı elde edilmektedir. Her iki maddenin de birlikte etkin dozunun uygulanmasına bağlı canlılık

miktarı da 100'e bölünür ve elde edilen değer 1 sabit sayısından çıkarılıp  $E_{AB}$  olarak ifade edilmektedir.  $E_A$ ; A maddesinin tek başına,  $E_B$ ; B maddesinin tek başına etkin dozunun uygulanmasına bağlı canlı kalan hücre miktarının 100'e bölümünden elde edilen değer 1'den çıkarılmasından kalan değeri belirtmektedir. CDI değerinin hesaplanmasında aşağıdaki denklemden yararlanılmaktadır:

$$CDI = E_{AB} / (E_A \times E_B) \quad (3.2.).$$

Denklemden elde edilen CDI değeri 1 değerinden büyükse uygulanan iki madde arasında antagonistik ilişki var demektir. 1 değerine eşitse aditif ilişki (iki maddenin birbirinin tesirini azaltma veya arttırma özelliği yok), 1'den küçük ise sinerjistik ilişkili (iki madde birlikte uygulandığı zaman tek tek uygulanmalarına göre daha etkili) var demektir. Eğer elde edilen değer 0,7'den daha küçükse belirgin bir şekilde sinerjistik ilişki var demektir (Chao & Zhen, 1989; Wan vd., 2008).

#### **b) BLISS Kombinasyon İndeksi (CI):**

Bu yöntemde iki maddenin ayrı ayrı etkin dozlarının meydana getirdiği yüzde ölüm miktarı ondalık sayı olarak yazılarak toplanmaktadır (Örneğin A maddesinin 100 nM'ı, DU-145 hücrelerinin %45'ini öldürüyorsa  $E_A = 0,45$  şeklinde yazılmaktadır). Her iki maddenin etkin dozlarının toplamı, etkin dozlarının çarpımından çıkarılmaktadır. Elde edilen değer iki maddenin etkin dozlarının birlikte uygulanması neticesinde meydana gelen ölüm miktarının yüzdesel değerinin virgüllü yazılışına bölünür (Örneğin A maddesinin 100 nM'ı ile B maddesinin 200 nM'ı birlikte uygulandığı zaman DU-145 hücrelerinin %60'ını öldürüyorsa  $E_{AB} = 0,6$  şeklinde yazılmaktadır). Buna göre BLISS (CI) değeri şu şekilde hesaplanmaktadır:

$$BLISS (CI) = [(E_A + E_B) - (E_A \times E_B)] / E_{AB} \quad (3.3.).$$

Denklemden elde edilen CDI değeri 1 değerinden büyükse uygulanan iki madde arasında antagonistik ilişki, 1 değerine eşitse aditif ilişki, 1'den küçük ise sinerjistik ilişki var demektir (Bliss, 1939; Berenbaum, 1989; Greco vd., 1995; Geary, 2013).

#### **c) En Yüksek Etkiye Sahip Tek Ajanın Birlikte Etkiye Oranı (HSA: Highest Singel Agent)**

Bu denklikte iki maddenin ayrı ayrı kullanılmasına bağı uygulama yapılacak hücre hattı üzerindeki ölüm etkisi daha yüksek olanın, iki maddenin birlikte kullanılmasına bağı ölüm etkisine oranı hesaplanmaktadır. A maddesinin ölüm etkisi  $E_A$ , B maddesinin ölüm etkisi  $E_B$ , iki maddenin birlikte uygulanmasına bağı ölüm etkisi  $E_{AB}$  olarak ifade edilirse denklem şu şekilde kurulur:

$$HSA = E_A / E_{AB} \text{ veya } HSA = E_B / E_{AB} \text{ (Hangi maddenin ölüm etkisi daha yüksekse) (3.4.).}$$

Buna göre elde edilen sonuç 1'den yüksek ise antagonistik ilişki, 1'e eşitse aditif etki, 1'den küçük ise sinerjistik ilişki olduğu anlaşılmaktadır (Lehar vd., 2007; Berenbaum 1989; Geary 2013).

### 3.5. RNA İzolasyonu

Çalışmamızda kontrol ve madde uygulaması yapılan hücrelerde gen ifadelerinin belirlenmesi için öncelikle RNA izolasyonu kit (Ambion life Technologies; Invitrogen) kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyonu için kit içerisinde bulunan ve aşağıda verilen protokol takip edilmiştir:

- herbir flasttaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine %1 merkaptotanol içeren 700 µl lizis tamponu 10 dakika süre ile uygulanmıştır.
- Lizis tamponu ve hücre membranı parçalanmış hücrelerden oluşan sıvı karışım mikropipet yardımıyla alınarak 1,5ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Karışımın üzerine 700 µl %70'lik etanol eklenerek 5-10 saniye vortekslenmiştir.
- 1,4 ml'lik karışım, tek seferde 700 µl olmak üzere, 2 kez kit içinde mevcut olan filtreli kolonlu tüplere aktararak 15 saniye 12000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda filtreli kolon ile tüp birbirinden ayrılarak, tüpte biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Kolonun filtre üst yüzeyine, kit içinde bulunan yıkama tamponu 1'den 700 µl ilave edilerek 15 saniye 12000 g'de santrifüj edilmiş, tüpte biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Kolon üzerine yıkama tamponu 2'den 500 µl eklenip 15 saniye 12000 g'de santrifüj edilmiş, tüpte biriken sıvı uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 2 kez yapılmıştır.
- Kolonda mevcut olan membranın kuruması için 2-3 dakika 12000 g'de santrifüj yapılmıştır. Altteki toplama tüpü atılarak yerine steril 1,5 ml'lik kapaklı toplama tüpü konulmuştur.



- Kolonda bulunan membranın ortasına DNaz-RNaz içermeyen sudan 50 µl pipetlenerek 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 2.30 dakika 12000 g'de santrifüj yapılarak RNA moleküllerinin temiz tüpte toplanması sağlanmış, RNA miktarı ve saflığı nanodrop cihazında (NaNoQ OPTIZEN) belirlenmiştir.

### 3.6. cDNA Elde Edilmesi

Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) analizleri yapılacak genlerin mRNA seviyelerindeki değişimleri araştırmak amacıyla ters transkripsiyon aktivitesine bağlı olarak mRNA'lar cDNA'ya High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kiti (Invitrogen; USA) kullanılarak çevrilmiştir. RNA'dan cDNA elde edilmesi işlemi kit içindeki kimyasallar ve kullanılan miktar Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** cDNA sentezinde kullanılan maddeler ve miktarları.

Madde	Hacim (1 Reaksiyon İçin)
Toplam RNA	10 µl
10 X RT Buffer (Tampon)	2 µl
25 X dNTP Karışımı (100mM)	0,8 µl
10 X RT Random Primer (Rastgele Hekzamer)	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (Ters Transkriptaz)	1 µl
Nuclease Free Water (Nukleaz İçermeyen Su)	4,2 µl
	<b>Toplam 20 µl</b>

RNA'dan cDNA'ya çevirme işleminin polimeraz zincir reaksiyon metodu Çizelge 3.4.'te görülmektedir. PZR işlemi ProFlex PCR System (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.4.** RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi için uygulanan PZR metodu.

1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
1 Döngü	40 Döngü	1 Döngü	Cihazda Muhafaza
25°C	37°C	85°C	4°C
10 Dakika	3 Dakika	5 Dakika	∞

### 3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

DU-145 hücrelerinde çoklu ilaç direnci geliştirme aşaması; direnç meydana gelip gelmediğini ve eğer direnç meydana gelmişse kanser hücrelerinin bu dirence ne şekilde

tepki verdiğini göstermek maksadıyla çoklu ilaç direnci, onkogenler, sağ kalım ve apoptoz inhibitör proteini genlerinin ifade seviyelerindeki değişimleri gösterilmiştir. Bu aşamada elde edilen verilerden çoklu ilaç direnci oluşturulduğu anlaşılmıştır. Çoklu ilaç direnci oluşturulduktan sonra; çoklu ilaç direnci, oksidatif ve ER stresi, ısı şoku ailesi, DNA tamir mekanizması, apoptoz ve diğer ölüm sinyali yolağı, onkogen, proliferasyon, sağ kalım ve apoptoz inhibitör genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bu genlerin ifadelerinde meydana gelen değişimleri araştırmak için kullanılan primerler ve baz dizileri izelge 3.5.- izelge 3.11.’de verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Endojen (kontrol) genlerin primer baz dizileri.

<b>Endojen (Kontrol) Genler</b>	
<b>Genlerin Primer Kodları</b>	<b>Baz Dizileri</b>
<b>B-Aktin</b>	F: CCTCTGAACCCTAAGGCCAAC R: TGCCACAGGATTCCATACCC
<b>18S</b>	F: GAGGATGAGGTGGAACGTGT R: GGACCTGGCTGTATTTCCA

**Çizelge 3.6.** Çoklu ilaç direnci genlerinin primer baz dizileri.

<b>Çoklu İlaç Direnci Genleri</b>	
<b>Genlerin Primer Kodları</b>	<b>Baz Dizileri</b>
<b>ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi C Üyesi 1 (ABCC1/ MRP1)</b>	F: ATCGTTCTGTTTGCTGCCCT R: GTCTCTGAATACTCCTTGAGCCT
<b>ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi C Üyesi 2 (ABCC2)</b>	F: TGCACAAGCAACTGCTGAAC R: AGGCAGGGTGTCCATCCACT
<b>ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi G Üyesi 2 (ABCG2/ BCRP)</b>	F: GGTGCCATTTACTTTGGGC R: ACAAAGAGTTCCACGGCTGA
<b>Glutasyon S-Transferaz (GST)</b>	F: TTCTTACTGGTCCTCACATCTC R: TCACCGGATCATGGCCAGCA
<b>Çoklu İlaç Direnciyle İlişkili Protein 1 (GSX/ MRP)</b>	F: TGCCTTGGGATTTTTGCTGTG R: CGATCCCTTGTGAAATGCC
<b>Çoklu İlaç Direnciyle İlişkili Protein 2 (MRP2)</b>	F: CTGCCTCTTCAGAATCTTAG R: CCCAAGTTGCAGGCTGGCC
<b>Çoklu İlaç Direnciyle İlişkili Protein 3 (MRP3)</b>	F: GATACGCTCACCACAGTCC R: CAGTTGCCGTGATATGGCTG
<b>Çoklu İlaç Direnciyle İlişkili Protein 4 (MRP4)</b>	F: CCTATGCCACGGTGCTGAC R: TGGCACATGGCTACTCGTAAC
<b>Çoklu İlaç Direnci Pompa Taşıyıcısı ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi Üyesi 2 (MXR1)</b>	F: GATCTCTCACCCTGGGGCTTGTTG R: TGTGCAACAGTGTGATGGCAAGGGA
<b>Büyük Çatı Proteini (MVP/ LRP)</b>	F: TCTAAAGGCGCTGCTTGATTT R: GTCCCTCGAAAAGCCACTCA
<b>ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi G Üyesi 2 (P-gP/ MDR1)</b>	F: TGCTGGAGCGGTTCTACG R: ATAGGCAATGTTCTCAGCAATG

**Çizelge 3.7.** Apoptoz ve diğer ölüm sinyali genlerinin primer baz dizileri.

<b>Apoptoz ve Diğer Ölüm Sinyali Yolağı Genleri</b>	
<b>Genlerin Primer Kodları</b>	<b>Baz Dizileri</b>
<b>BCL-2 ile ilişkili X apoptoz düzenleyici protein (Bax)</b>	F: ATGGACGGGTCCGGGGAG R: TCAGCCCATCTTCTTCCA
<b>BH3 Ölüm Agonist Domeyni (Bid)</b>	F: CCTTGCTCCGTGATGTCTTTC R: GTAGGTGCGTAGGTTCTGGT
<b>Kaspaz 3 (Kas3)</b>	F: GTGGAATTGATGCGTGATGT R: ACAGGTCCATTTGTTCCAAAA
<b>Kaspaz 8 (Kas8)</b>	F: AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC R: GCTGCTTCTCTCTTTGCTGAA
<b>Sitokrom Oksidaz 2 (Soks2)</b>	F: CAGGATACAGCTCCACAGCA R: ATCACAGGCTTCCATTGACC
<b>Sitokrom C (Sit C)</b>	F: TTTGGATCCAATGGGTGATGTTGAG R:TTTGAATTCCTCATTAGTAGCTTTTTTGAC
<b>Çekirdek Faktörü Kappa B Alt Ünitesi (Nf-κB)</b>	F: TCCGTTATGTATGTGAAGGC R: TTTGCTGGTCCCACATAGTTGC
<b>Tümör Nekroz Faktörü Alfa (Tnf-α)</b>	F: TCAGCCTCTTCTCC R: TCAGCTTGAGGGTT
<b>Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A (p21)</b>	F: GGAAGACCATGTGGACCTGT R: GCGTTTTGGAGTGGTAGAAA
<b>Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (p27)</b>	F: GCCCTCCCCAGTCTCTCTTA R: TCAAAACTCCCAAGCACCTC
<b>Tümör Proteini 53 (p53)</b>	F: CACGAGCGCTGCTCAGATAGC R: ACAGGCACAAACACACGCACAAA

**Çizelge 3.8.** Isı şoku proteini ailesi genlerinin primer baz dizileri.

<b>Isı Şoku Ailesi Proteini Genleri</b>	
<b>Genlerin Primer Kodları</b>	<b>Baz Dizileri</b>
<b>Isı Şoku Proteini 26 (HSP26)</b>	F: GCCCCGCAGCCCCATCTACGAG R: GAGCACGCCATCCGACGACAGC
<b>Isı Şoku Proteini 60 (HSP60)</b>	F: GTCGCGCCCCGTTAGCAC R: CATCGCGTCCCACCTTCTTCAT
<b>Isı Şoku Proteini 70 (HSP70)</b>	F: CGAGETCGACGCATTGTTTG R: GAGTGGATCCGCCGACGAGTA
<b>Isı Şoku Proteini 90 (HSP90)</b>	F: CCGGAGGTCTTTCACAGTC R: CTCTCGCGCTCCTTCTCTAC
<b>Isı Şoku Proteini Ailesi A (Hsp70) Üyesi 5 (Bip)</b>	F: CATGGTTCTACTAATGAAAGG R: GCTGGTACAGTAACAAC
<b>Isı Şoku Protein 90 Beta Ailesi Üyesi 1 (GRP94)</b>	F: AATAGAAAGAATGCTTCGCC R: TCTTCAGGCTCTTCTTCTGG

**Çizelge 3.9.** Oksidatif ve endoplazmik retikulum stresi genlerinin primer baz dizileri.

<b>Oksidatif ve Endoplazmik Retikulum Stresi Genleri</b>	
<b>Genlerin Primer Kodları</b>	<b>Baz Dizileri</b>
<b>Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4 (ATF4)</b>	F: ATGGCCGGCTATGGATGAT R: CGAAGTCAAACCTCTTTCAGATCCATT
<b>DNA Hasarının Tetiklediği Transkript 1 (CHOP)</b>	F: CTGCCTTTCACCTTGGAGAC R: CGTTTCCTGGGGATGAGATA
<b>Endoplazmik Retikulum Yıkım Arttırıcı Alfa- Mannozydaz Benzeri Protein 1 (EDEM)</b>	F: CAAGTGTGGGTACGCCACG R: AAAGAAGCTCTCTCCATCCGGTC
<b>Endoplazmik Retikulumdan Nükleusa Sinyal 1 Proteini (Ire1-<math>\alpha</math>)</b>	F: TGGGTAAAAAGCAGGACATCTGG R: GCATAGTCAAAGTAGGTGGCATTCC
<b>Ökaryotik Translasyon Başlatıcı Faktör 2 Alfa Kinaz (PERK)</b>	F: ATCCCCCATGGAACGACCTG R: ACCCGCCAGGGACAAAATG
<b>Katalaz (KAT)</b>	F: TACGAGCAGGCCAAGAAGTT R: ACCTTGTACGGGCAGTTCAC
<b>Bakır Çinko Süper Oksid Dismutaz (CuZn-SOD)</b>	F: GTTCGGTGACAACACCATG R: GGAGTCGGTGATGTTGACCT
<b>Manganez Süper Oksid Dismutaz (Mn-SOD)</b>	F: TCTGAAGAAGGCCATCGAGT R: GCAGATAGTAGGCGTGCTCC
<b>Glutasyon Sentetaz (GS)</b>	F: TGGGACCAGCAAGTAAAACC R: TCGCGAATGTAGAACTCGTG
<b>Toplam X Kutusu Bağlayıcı Proteini 1 (totalXBP1)</b>	F: TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG R: ATCCATGGGGAGATGTTCTGG
<b>İşlenmemiş Proteinlerden Sorumlu X Kutusu Bağlayıcı Proteini 1 (usXBP1)</b>	F: CAGCACTCAGACTACGTGCA R: ATCCATGGGGAGATGTTCTGG

**Çizelge 3.10.** DNA tamir mekanizması genlerinin primer baz dizileri.

<b>DNA Tamir Mekanizması Genleri</b>	
<b>Genlerin Primer Kodları</b>	<b>Baz Dizileri</b>
<b>Ekzonükleaz 1 (EXO1)</b>	F: GACCATTTCACCACCCACTTT R: TGAGACTCATCGTCACTGGACTC
<b>BRCA1 DNA Tamir Geni Proteini (XRP1)</b>	F: CCCATCTGAGAGCCGAAGT R: CGTAGGGTGAGTCCTTGCTG

**Çizelge 3.11.** Onko genler, hücre büyüme faktörü, hücre bölünmesi, sağ kalım ve apoptoz inhibitör genlerinin primer baz dizileri.

<b>Onko genler, Hücre Bölünme, Sağ Kalım ve Apoptoz İnhibitör Genleri</b>	
<b>Genlerin Primer Kodları</b>	<b>Baz Dizileri</b>
<b>Serin/ Treonin Kinaz 1 (Akt)</b>	F: ATGAGCGACGTGGCTATTGTGAAT R: GAGGCCGTCAGCCACAGTCTGGATG
<b>B- Hücreli Lemfoma 2 Ailesi Proteini (BCL-2)</b>	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R: ACAGTTCCACAAAGGCATCC
<b>Siklin D1(CD1)</b>	F: GATCAAGTGTGACCCGGACT R: TCCTCCTCTTCTCCTCCTC
<b>Hipoksiya Tetikleyici Faktör 1 Alt Ünite- Alfa (Hif 1-<math>\alpha</math>)</b>	F: AGCCAGATCTCGGCGAAGT R: CAGAGGCCTTATCAAGATGCG
<b>Nf<math>\kappa</math>B İnhibitör Alfa (IkBa)</b>	F: GATCCGCCAGGTGAAGGG R: GCAATTTCTGGCTGGTTGG
<b>Fosfoinositid 3 Kinaz (PI3K)</b>	F: GATTGGTTCTTTCTGTCTCTG R:CCACAAATATCAATTTACAACCATTG
<b>Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)</b>	F: AGGAGGGCAGAATCATCACG R: CAAGGCCACAGGGATTTTCT
<b>X Bağlantılı Apoptoz İnhibitörü (XIAP)</b>	F: TGGGGTTCAGTTTCAAGGAC R: TGCAACCAGAACCTCAAGTG

Gerçek zamanlı PZR analizlerinin yapılabilmesi için Power SYBR Green PZR Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Bu kit içinde mevcut olan sarfların her birinden kullanılan malzemelerin listesi, primerler ve cDNA miktarı Çizelge 3.12.'te görülmektedir.

Çalışmada Applied Biosystems (ABI) 7500 Fast Real-Time PCR Systems cihazı kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için cihazda standart olan protokol takip edilmiştir. Bu protokol Çizelge 3.13.'te gösterilmiştir.

**Çizelge 3.12.** Bir gerçek zamanlı PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi için kullanılan malzemeler ve miktarları.

<b>Maddeler ve Miktarları</b>	
<b>Sybr Green Master Mix</b>	10 $\mu$ l
<b>cDNA</b>	2 $\mu$ l
<b>DNase-RNase İçermeyen Su</b>	6 $\mu$ l
<b>F Primer</b>	1 $\mu$ l
<b>R Primer</b>	1 $\mu$ l
<b>Toplam Miktar</b>	20 $\mu$ l

**Çizelge 3.13.** Gerçek Zamanlı PZR protokolü.

<b>1. Basamak</b>		<b>2. Basamak</b>	
1X Döngü		48X Döngü	
	Enzim Aktivasyonu	Denatürasyon	Primerlerin Yapışması ve Zincirin Uzaması
50°C	95°C	95°C	60°C
2 Dakika	10 Dakika	15 Saniye	1 Dakika

### **3.8. Gerçek Zamanlı PZR Analizlerinin İstatistiksel Analizlerinin Yapılması**

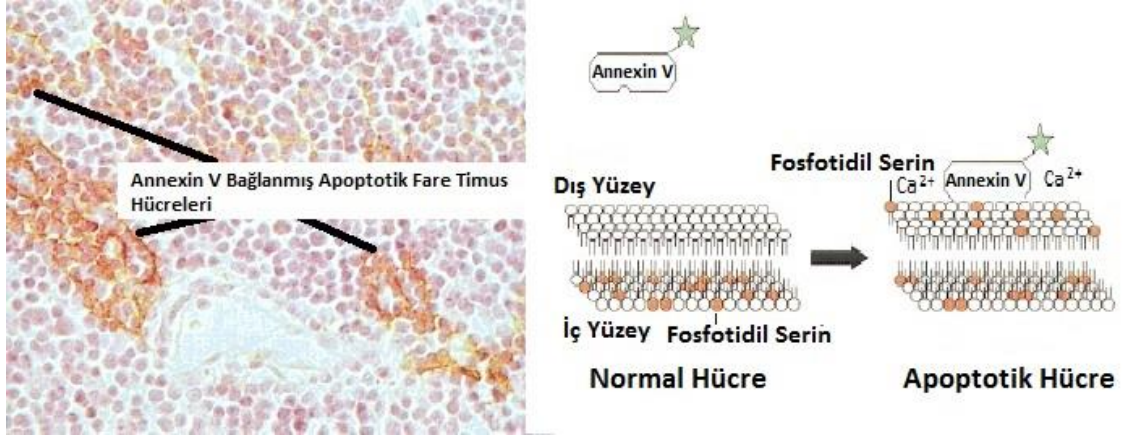
Gerçek zamanlı PZR çalışmaları sonrası elde edilen verilerin gen ifadeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$F_x = \text{Kuvvet}(2; -\Delta\Delta cT) \quad (3.5).$$

Buna göre her bir genin gerçek bağıl kantitasyon (relative quantitation: RQ) değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan bağıl kantitasyon değerleri SPSS istatistik analiz programının ANOVA (Değişkenlerin analizi), Duncan ve Tukey testleri ile değerlendirilerek genlerin ifade seviyelerindeki artış veya azalışın, uygulanan madde ile ilişkisi yorumlanmıştır.

### **3.9. TALI Görüntü Temelli Sitometre (Hücre Görüntüleme) Yöntemiyle Canlı, Ölü ve Apoptik Hücre Miktarlarının Hesaplanması**

Sadece hücre sayımı özelliği gösteren birçok sitometrik ölçüm metotlarından farklı olarak TALI görüntü temelli sitometre (TALI Image Based Cytometer; Invitrogen) aynı zamanda canlı, apoptotik ve toplam ölü hücreleri birbirinden ayırt edebilmekte ve bu hücrelerin miktara bağlı oranlarını hesaplayabilmektedir. TALI görüntü temelli sitometre yönteminde Annexin V; biyotin, FITC, Cy5'ten herhangi biri ile işaretlenmiştir. Bu sayede apoptotik hücrelere bu belirteçlerden herhangi birinin bağlanmasıyla ışımaya yaparak TALI görüntü temelli sitometre tarafından hücre sayımları yapılmaktadır. Bu durum Şekil 3.5.'te gösterilmiştir (Engeland, Nieland, Ramaekers, Schutte & Reutelingsperger, 1998).



**Şekil 3.19.** Apoptotik hücrelerde fosfotodil serinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıyla Annexin V'ye  $Ca^{2+}$  aracılığı ile bağlanması.

Diğer bir hücre ölüm ise nekrozdur ve tayini propodyum iyodid (PI) ile gerçekleşir. PI, Annexin V ile bağlanarak işaretlenir. Hücre membranının bütünlüğünden dolayı sağlıklı hücreler ve apoptotik hücreler PI ile boyanmazken nekrotik hücrelerin membranları PI'in hücre içine alınmasına olanak sağlar. Bu sayede nekrotik hücrelerin de TALI görüntü temelli sitometrede görüntülenmesine ve miktarlarının tayinine olanak sağlanır.

Çalışmada canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin miktarını belirlemek için Tali™ Apoptosis Kit-Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (ThermoFisher Scientific) kullanılmıştır. Buna göre sitometrede yeşil renk olarak görünen hücreler apoptotik hücreleri, kırmızı renk olanlar nekrotik hücreleri, gri görünenler ise canlı hücreleri göstermektedir. TALI görüntü temelli analizleri için dirençsiz DU-145 hücreleri 5 ayrı 25  $cm^3$ 'lük, dirençli DU-145 hücreleri ise 4 ayrı 25  $cm^3$ 'lük flasklara ekilmiştir. Hücrelerin, flaskların taban iç yüzey alanına tutundukları kontrol edildikten sonra hem dirençsiz hem de dirençli DU-145 hücrelerine 48 saat süreyle; 50 nM dosetaksel, 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA ve bu üç madde birlikte uygulanarak TALI görüntü temelli sitometre ile analizleri yapılmıştır.

Her bir flastaki hücrelerin analizleri aşağıdaki protokol takip edilerek yapılmıştır:



- Kontrol ve madde uygulanmış hücrelerin bulunduğu flasklardaki besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin yapıştığı flask tabanından kalkması için üzerlerine 700 µl tripsin- EDTA uygulanmış ve 5 dakika inkübe edilmiştir. Kalkan hücreler 1,5 ml'lik kapaklı toplama tüplerine alınmıştır.
- Tüpler 700 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Hücrelerin altta pellet oluşturduğu kontrol edildikten sonra üstte kalan süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.
- Kit içerisinde bulunan Annexin Bağlama Tampon (ABB) DNaz/RNaz içermeyen su ile kit protokolüne göre 5 kat seyreltilmiştir.
- Elde edilen ABB içerisinde her 100 µL'sinde 5 µL Anneksin V olacak şekilde hazırlanmış karışımdan herbir tüpteki hücrelerin üzerine 100 µl pipetlenmiş ve karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra 1500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek üstteki süpernatant uzaklaştırılmış ve dipte kalan hücrelerin üzerine 1 µL PI içeren 100 µl ABB pipetlenmiştir.
- Oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 dakika inkübasyon yapılmıştır.
- Her bir örnek, içerdikleri hücrelerin sayımının yapılması için özel TALI slaytlarının çukurlarına 25 µl yüklenerek cihazda okumaları yapılmıştır.

### **3.10. Dirençsiz ve Direnç Geliştiği Düşünülen DU-145 Hücrelerinin Sağ Kalım, Apoptoz ve Kaspaz Aktivitelerinin Floresan Mikroskopta Gösterilmesi**

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarına madde uygulandıktan sonra, uygulanan bu maddelerin hücrelerde apoptotik ve kaspaz aktivitelerini araştırmak üzere floresan mikroskobu (ZEISS Obserever Z1) kullanılarak analizleri yapılmıştır. Bunun için dirençsiz ve dirençli hücreler ayrı ayrı 5'er farklı grup oluşturmak üzere 24 kuyulu plakalara, her bir kuyuda 1 ml hacminde besiyeri olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere, kuyuların iç zemin yüzeyine tutundukları kontrol edildikten sonra; 50 nM dosetaksel, 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA ve bu üç maddenin kombinasyonu uygulanmıştır.

48 saatlik uygulamadan sonra apoptotik ve kaspaza bağlı apoptotik aktivite neticesinde hücre membranında ve çekirdeğinde meydana gelen yıkılmayı göstermek amacıyla aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- Kuyulardaki besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra plaka 3 kez PBS ile yıkanmıştır.
- Her bir kuyudaki hücrelerin üzerine 1 ml besiyeri pipetlenmiştir.
- Çekirdek yapısındaki değişimi göstermek amacıyla 5 µl Nucblue (Katalog No.: R10477), membran apoptotik aktivitesini göstermek amacıyla 3 µl etidyum bromür/akridin orange (EB/AO), kaspaza bağlı apoptotik aktiviteyi göstermek amacıyla 5 µl kaspaz 3/7 boyaları (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır.
- Boyalar uygulandıktan sonra floresan mikroskopta hücre görüntüleri alınıncaya kadar plakalar karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir.
- Besiyeri uzaklaştırılıp kuyular 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra 20X objektif kullanılarak hücre görüntüleri alınmıştır.
- Mavi renkli görüntü almak için DAPI, yeşil için FITC, kırmızı için RED filtreleri kullanılmıştır.

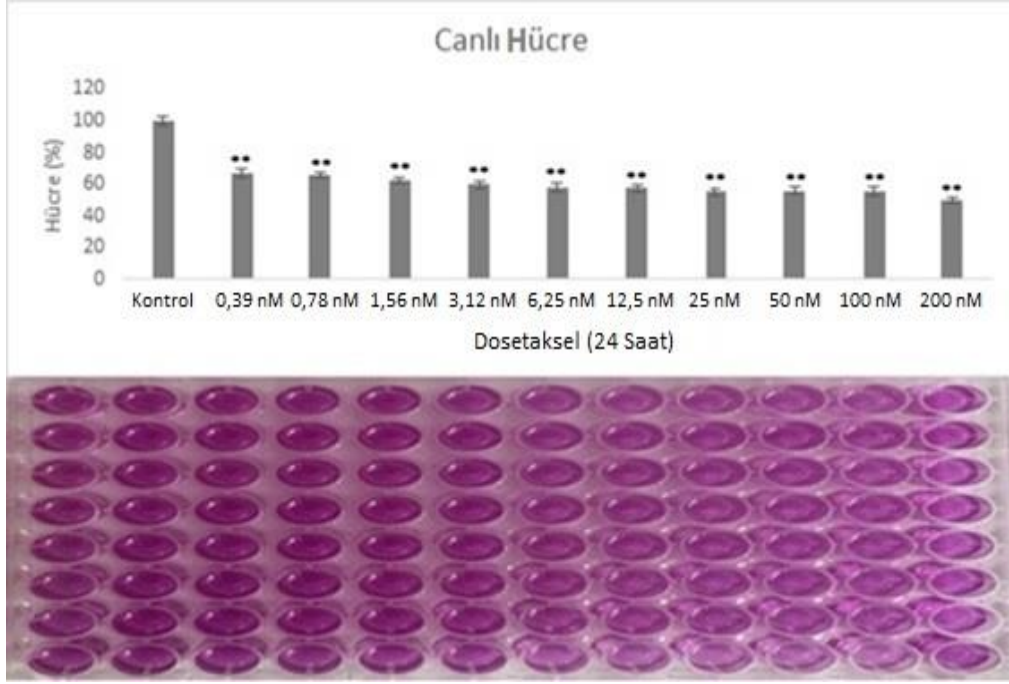
## BÖLÜM 4

### SONUÇLAR

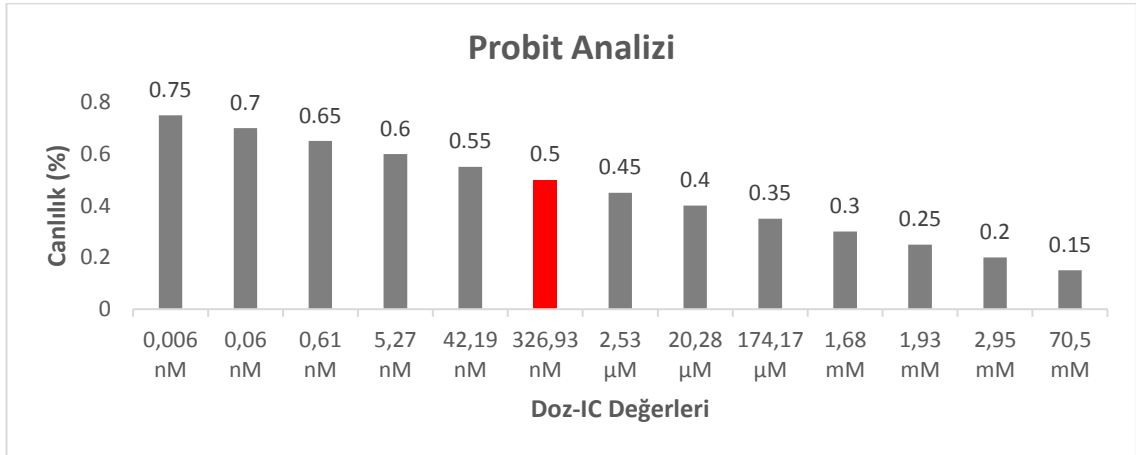
#### **4.1. Dosetaksel ve Mitoksantronun Ayrı Ayrı ve Birlikte Uygulanmasına Bağlı Dirençsiz DU-145 Hücre Hattında Çoklu İlaç Direnci Oluşturmak İçin Belirlenen IC50 Değeri**

##### **4.1.1. DU-145 Hücre Hattına Dosetakselin 0.39-200 nM Doz Aralığının 24, 48 ve 72 Saat Uygulanması Sonucunda Elde Edilen IC50 Değerleri**

DU-145 hücre hattına 24 saat süreyle 0,39-200 nM dosetaksel uygulaması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için %66,77±2,64, en az 200 nM için %50,13±1,89 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.). IC50 değeri probit analizine göre 326,93 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2.)



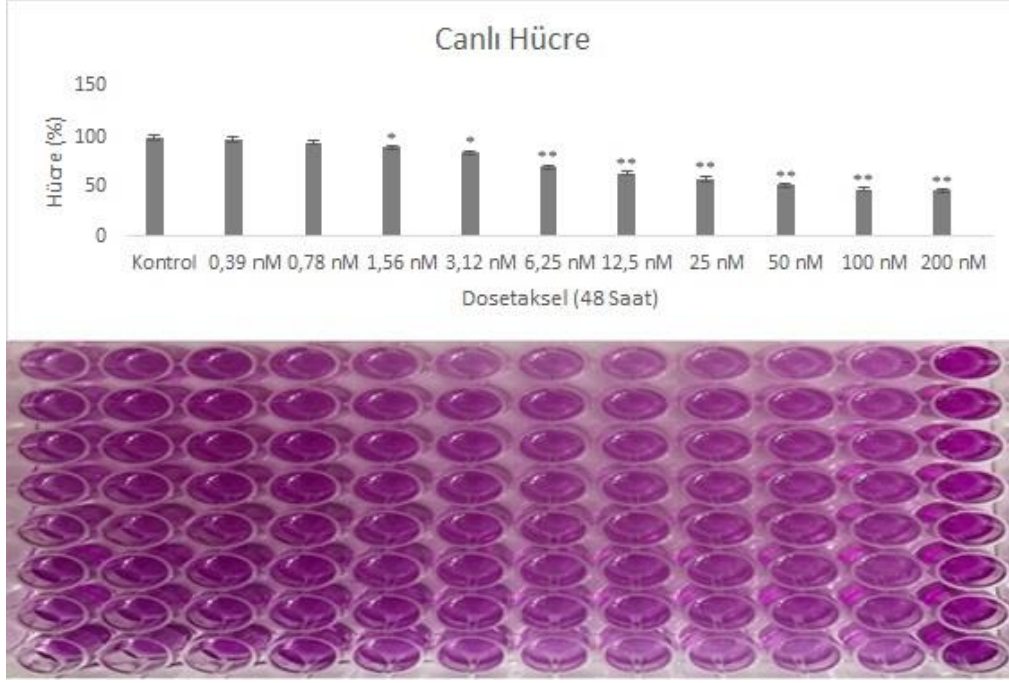
**Şekil 4.1.** DU-145 hücrelerine 0,39-200nM dosetaksel uygulandıktan 24 saat sonra canlılık miktarlarına bağlı renk değişimi ve MTT istatistiksel analiz neticeleri.



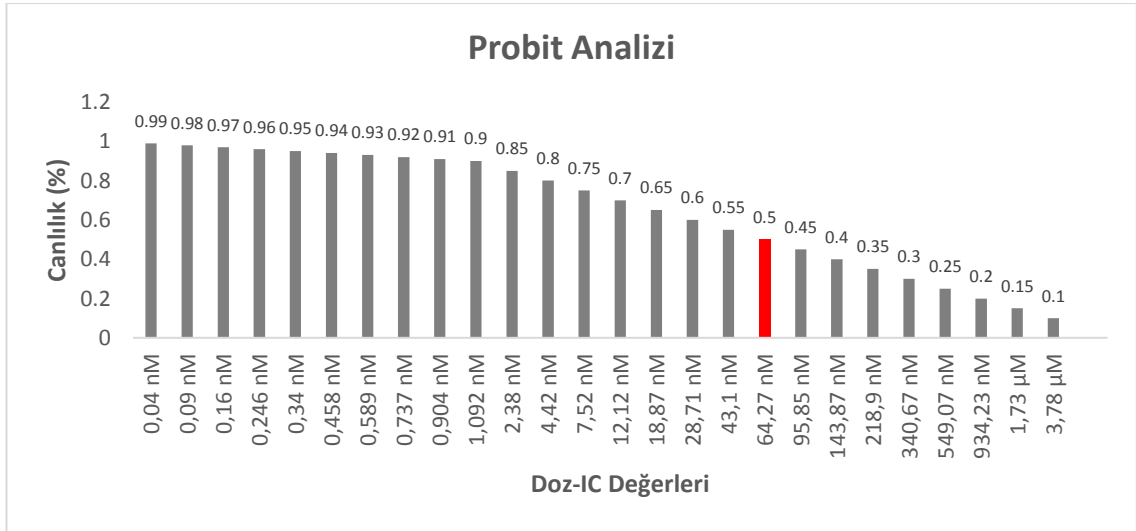
**Şekil 4.2.** Dosetakselin DU-145 hücrelerine 24 saatlik uygulanmasına bağlı IC50'nin probit analiziyle hesaplanması.

DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 0,39-200 nM dosetaksel uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için  $96,99 \pm 2,57$ , en az 200 nM için  $45,37 \pm 1,81$  olarak

belirlenmiştir (Şekil 4.3.). IC50 değeri probit analizine göre 64,27 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4.).

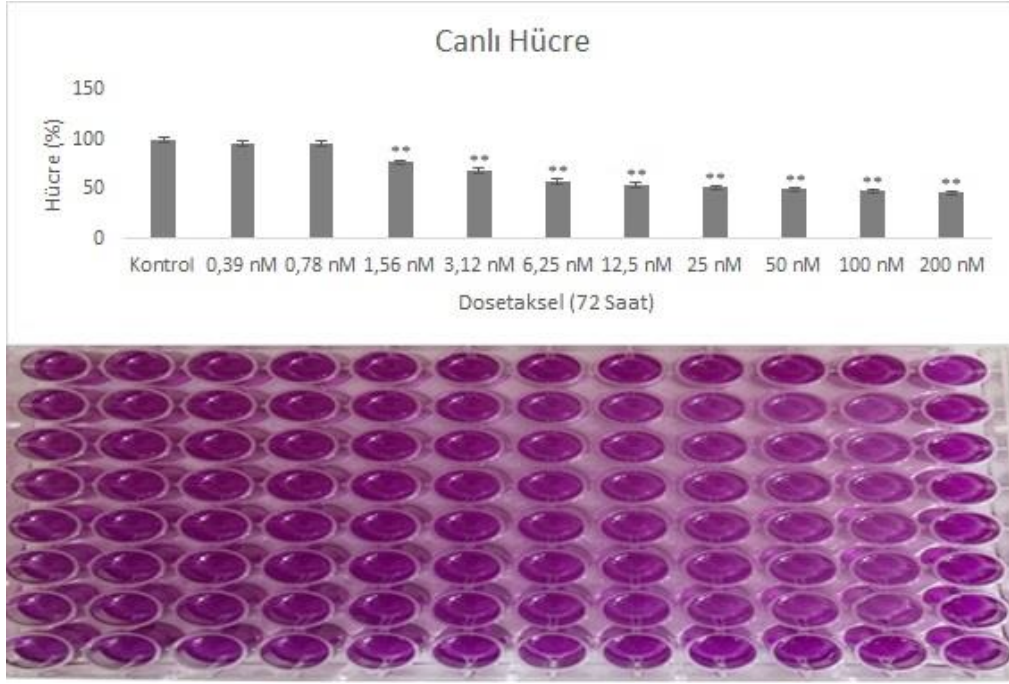


**Şekil 4.3.** Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM dosetaksel uygulandıktan 48 saat sonra canlılık miktarlarına bağlı renk değişimi ve istatistiksel sütun grafiği.

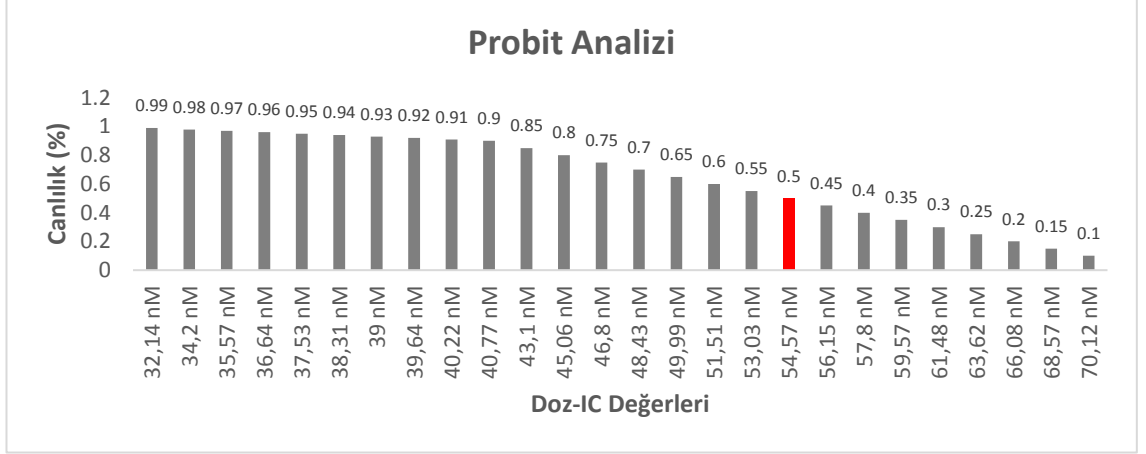


**Şekil 4.4.** DU-145 hücrelerine dosetakselin 48 saat uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.

DU-145 hücrelerine 72 saat süreyle 0,39-200 nM dosetaksel uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için  $96,14 \pm 2,89$ , en az 200 nM için  $46,55 \pm 2,21$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5.). IC50 değeri probit analizine göre 54,57 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6.).



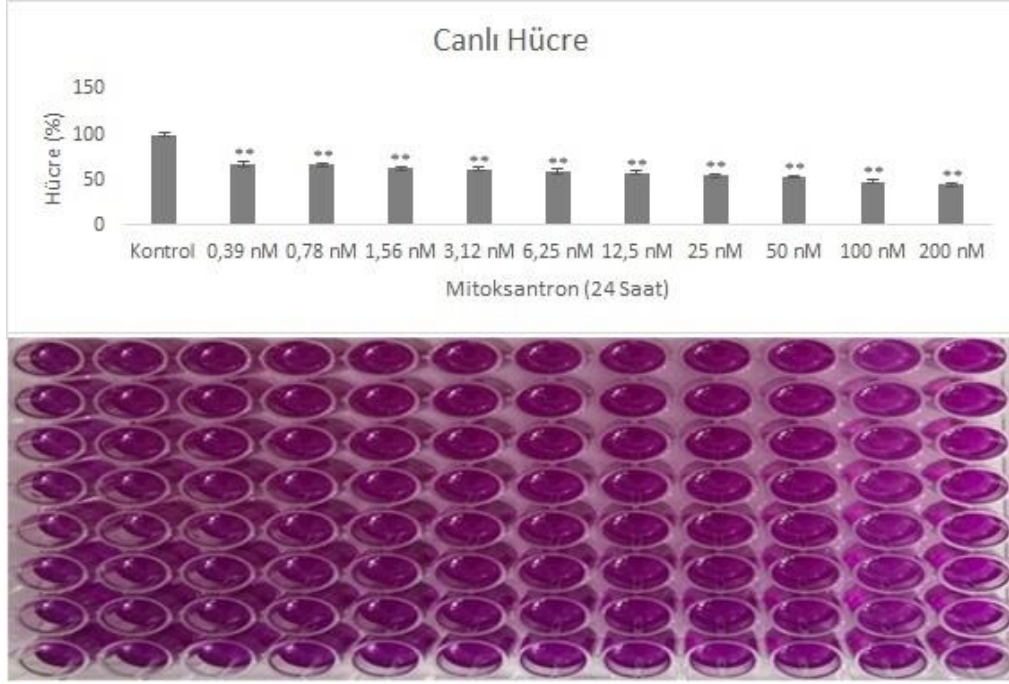
**Şekil 4.5.** Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 100nM dosetaksel uygulandıktan 72 saat sonraki canlılık miktarları.



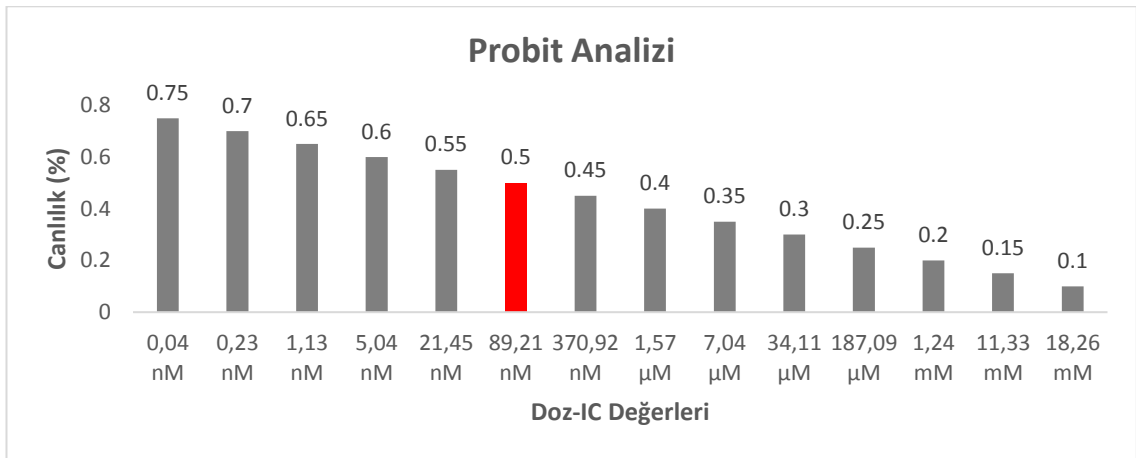
**Şekil 4.6.** DU-145 hücrelerine dosetakselin 72 saatlik uygulanmasına bağlı IC<sub>50</sub>'nin probit analiziyle hesaplanması.

#### 4.1.2. DU-145 Hücre Hattına Mitoksantronun 0,39- 200 nM Doz Aralığının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulanması Sonucunda Elde Edilen IC<sub>50</sub> Değerleri

DU-145 hücre hattına 24 saat süreyle 0,39-200 nM mitoksantron uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için  $67,34 \pm 2,67$ , en az 200 nM için  $44,71 \pm 1,99$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7.). IC<sub>50</sub> değeri probit analizine göre 89,21 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8.).



**Şekil 4.7.** DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM mitoksantron uygulandıktan 24 saat sonra canlılık miktarı ve MTT istatistiksel analiz neticesinin sütun grafiği.

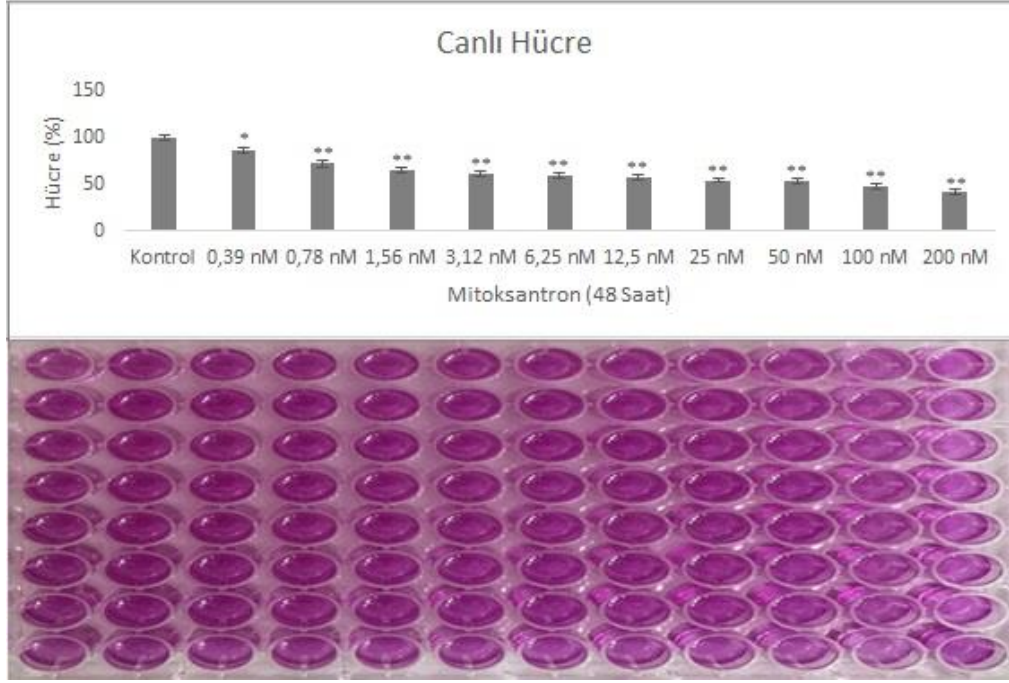


**Şekil 4.8.** Mitoksantronun DU-145 hücrelerine 24 saatlik uygulanmasına bağlı IC50'nin probit analiziyle hesaplanması.

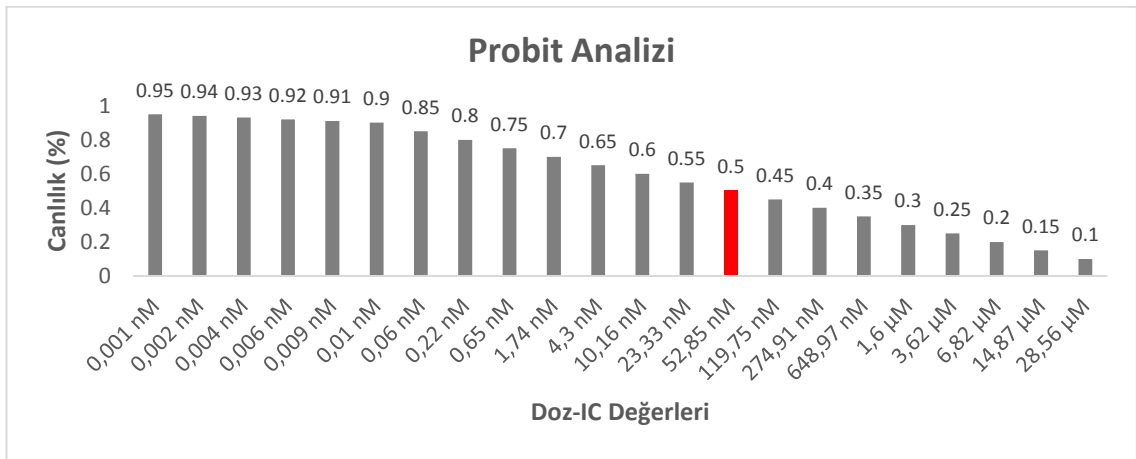
DU-145 hücrelerine 48 saat 0,39-200 nM mitoksantron uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için  $87,01 \pm 3,12$ , en az 200 nM için  $42,29 \pm 2,09$  olarak hesaplanmıştır



(Şekil 4.9.). IC50 değeri probit analizine göre 52,58 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10.).



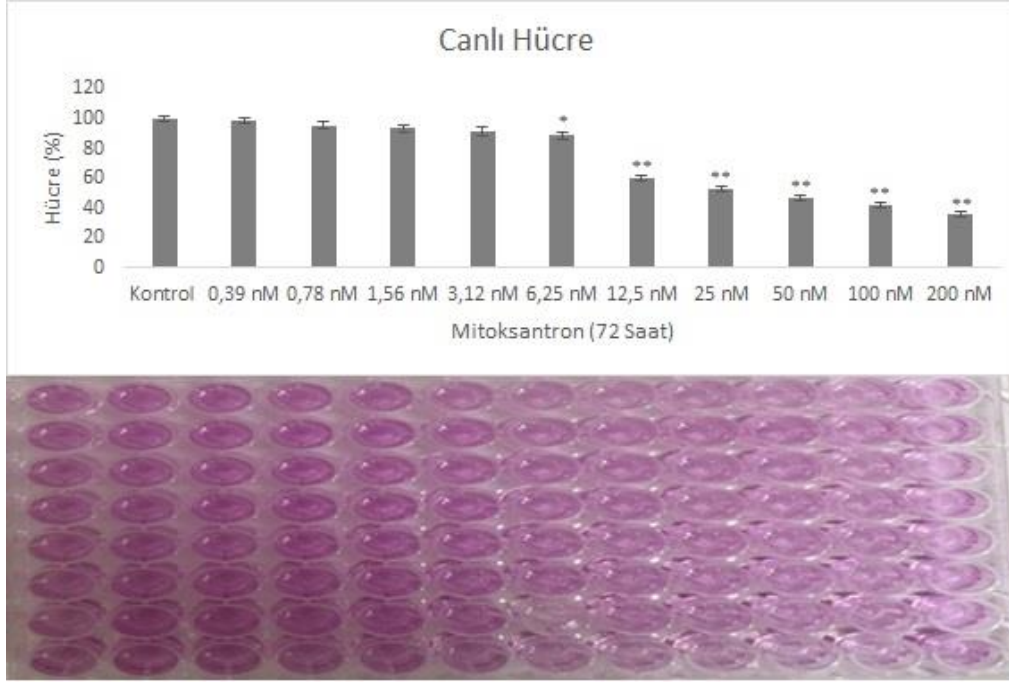
**Şekil 4.9.** DU-145 hücrelerine 48 saat 0,39- 200nM mitoksantron uygulandıktan sonra canlılık miktarı ve MTT istatistiksel analiz neticesinin sütun grafiği.



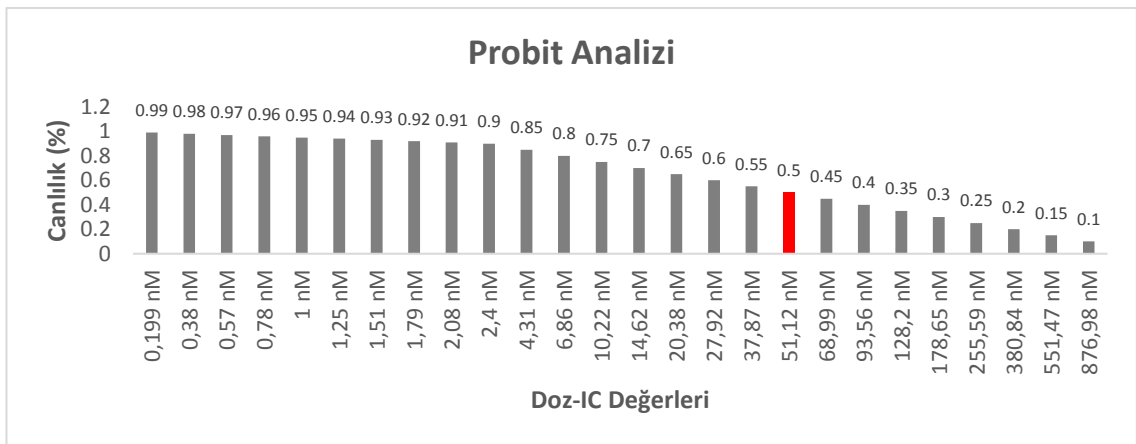
**Şekil 4.10.** DU-145 hücrelerine 48 saat mitoksantron uygulanmasına bağlı IC50'nin probit analiziyle hesaplanması.

DU-145 hücrelerine 72 saat 0,39-200 nM mitoksantron uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı

olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için  $98,78 \pm 2,4$ , en az 200 nM için  $35,67 \pm 1,56$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11.). IC50 değeri probit analizine göre 51,12 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12.).



**Şekil 4.11.** Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM mitoksantron uygulandıktan 72 saat sonra canlılık miktarı ve MTT istatistiksel analiz neticesinin sütun grafiği.

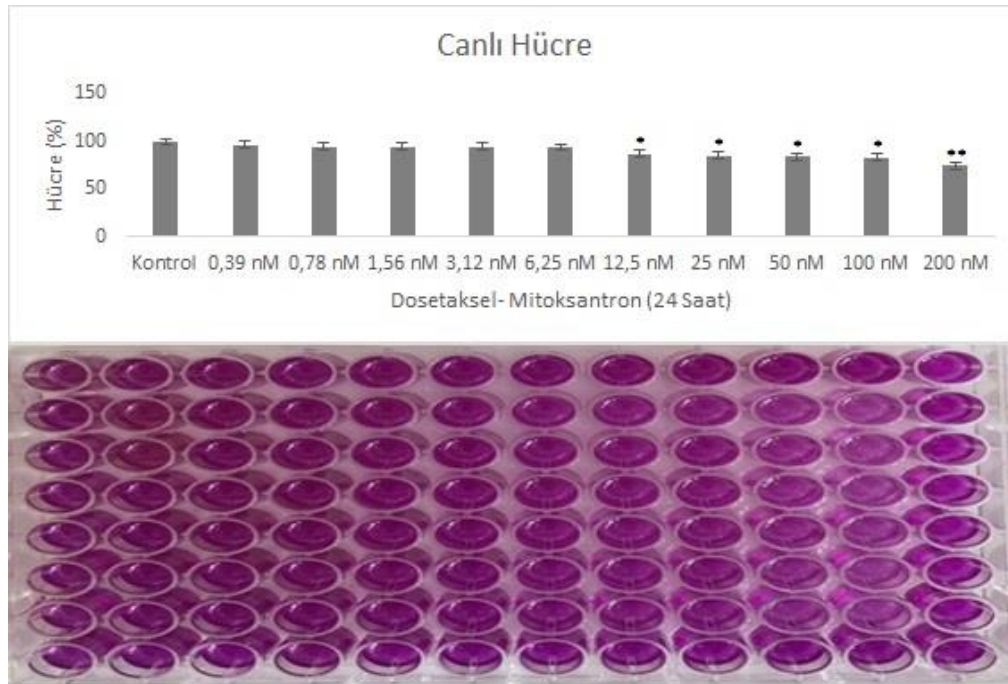


**Şekil 4.12.** DU-145 hücrelerine 72 saat mitoksantron uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.

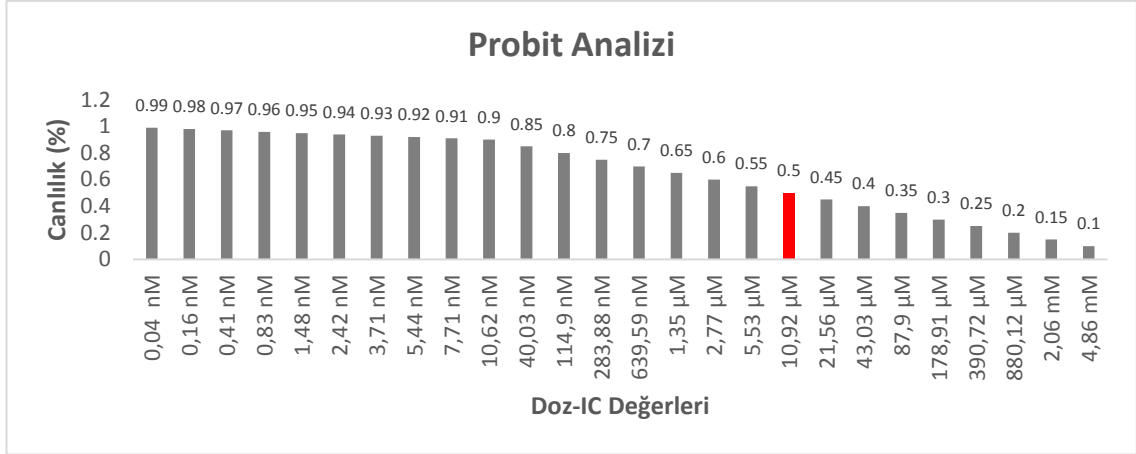
#### 4.1.3. Dositaksel ve Mitoksantronun Birlikte Dirençsiz DU-145 Hücre Hattına 0,39-200 nM'lık Dozlarının 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulanması Sonucunda IC50 Değerlerinin Hesaplanması

Dositaksel ve mitoksantronun ayrı ayrı dirençsiz DU-145 hücre hattı üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarına bağlı IC50 değerleri hesaplandıktan sonra birlikte kullanılmalarına bağlı 0.39- 200 nM'lık konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

DU-145 hücre hattına 24 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun 0,39-200 nM dozunun uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için  $96,94 \pm 3,56$ , en az 200 nM için  $74,97 \pm 3,78$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.13.). IC50 değeri, yapılan probit analizine göre 10,92  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14.).

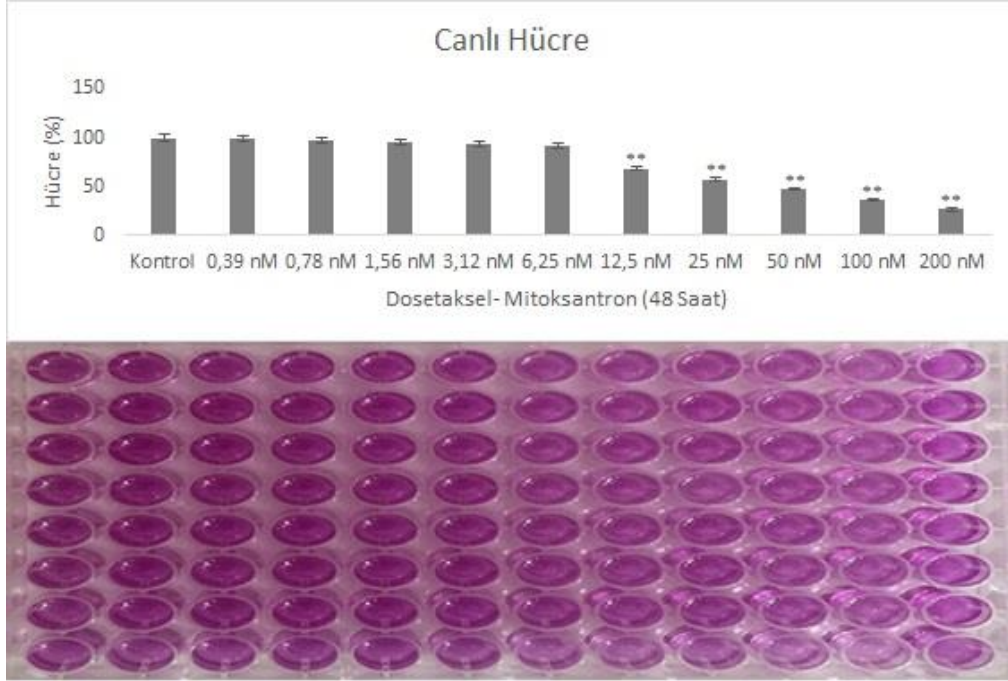


**Şekil 4.13.** Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM dosetaksel ve mitoksantron birlikte uygulandıktan 24 saat sonraki canlılık miktarlarının MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.

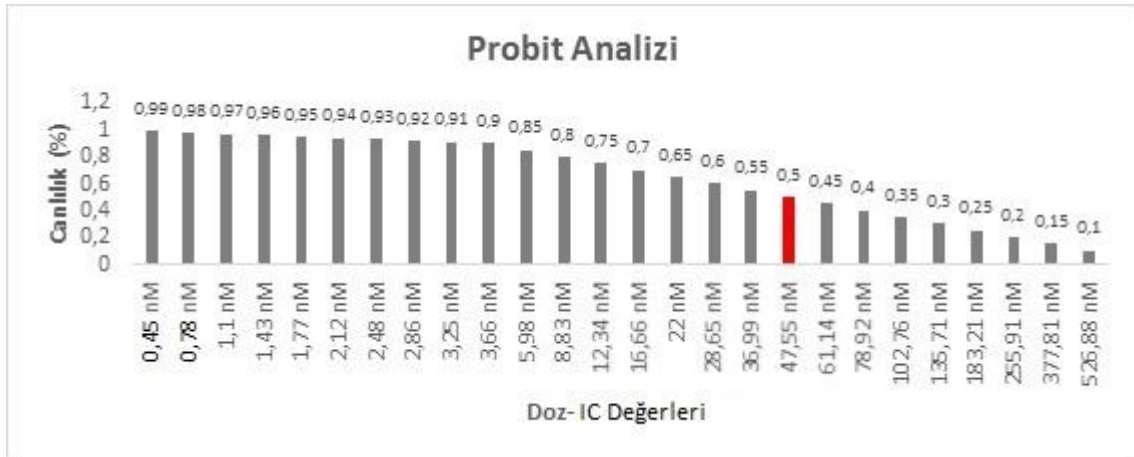


**Şekil 4.14.** DU-145 hücre hattına 24 saat dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı IC<sub>50</sub> değerinin probit analiziyle hesaplanması.

DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun 0,39-200 nM dozunun uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için %98,74±3,16, en az 200 nM için %26,5±1,36 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15.). IC<sub>50</sub> değeri probit analizi neticesinde 47,55 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.16.).



**Şekil 4.15.** DU-145 hücrelerine 48 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun 0,39-200 nM dozunun uygulanmasına bağlı canlılık miktarlarının MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.

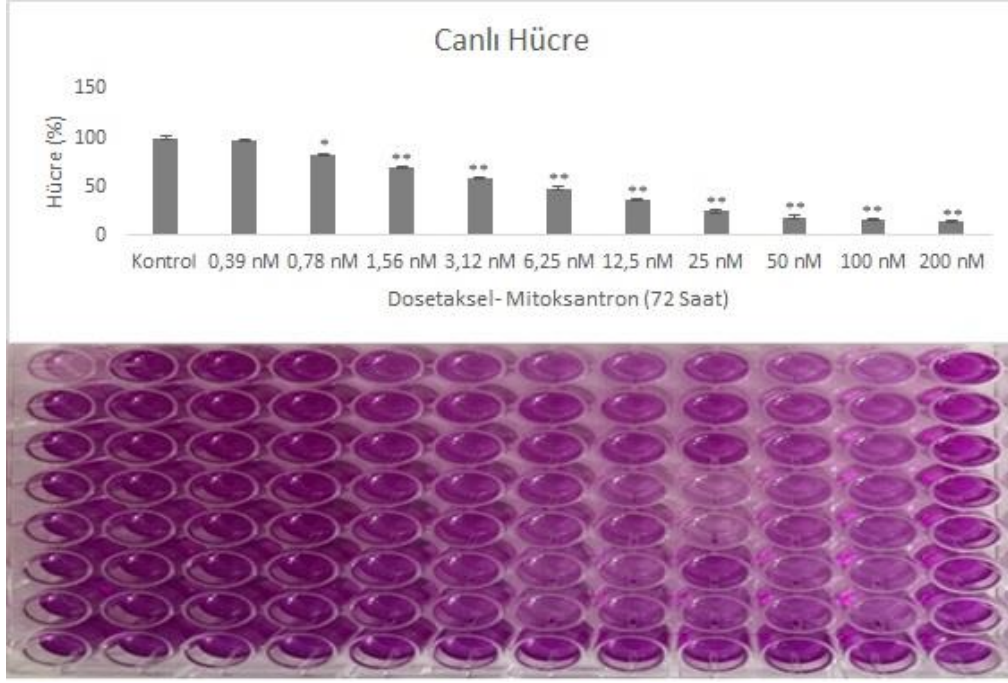


**Şekil 4.16.** DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.

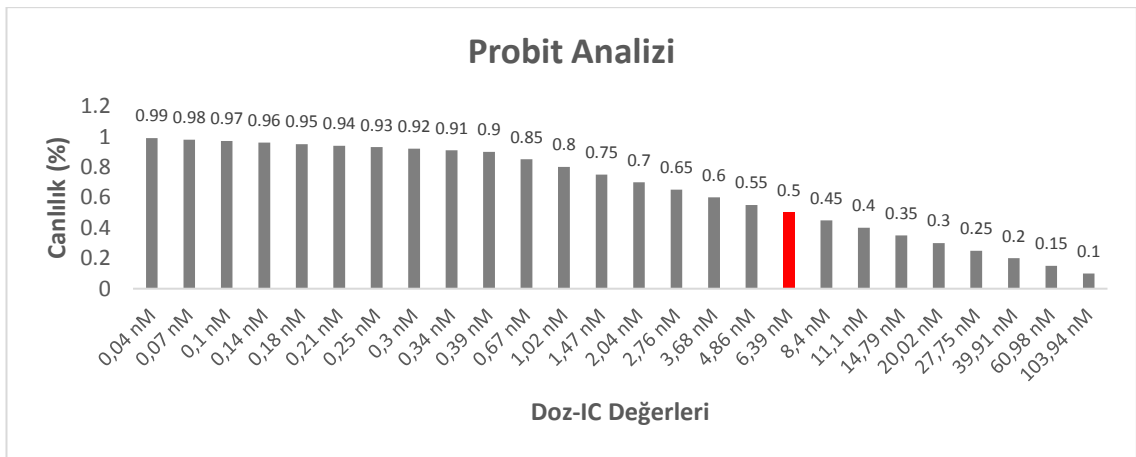
DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun 0,39-200 nM dozunun uygulanması neticesinde madde uygulanan hücrelerin, kontrol hücrelerine göre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda



canlılık oranı en fazla 0,39 nM'lık uygulama için  $97,41 \pm 1,18$ , en az 200 nM için  $14,8 \pm 0,25$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17.). IC50 değeri probit analizi neticesinde 6,39 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.18.).



**Şekil 4.17.** Dirençsiz DU-145 hücrelerine 0,39- 200nM dosetaksel ve mitoksantron uygulandıktan 72 saat sonraki canlılık miktarlarının MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.



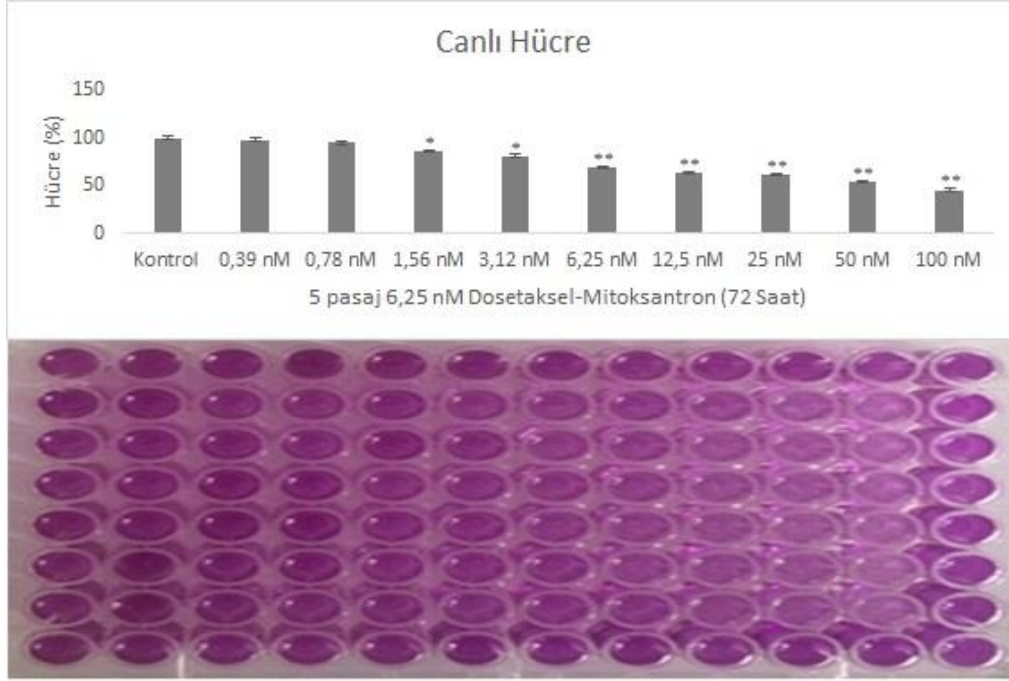
**Şekil 4.18.** DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.

MTT analizleri neticesinde Şekil 4.17.'de görüldüğü üzere dosetaksel ve mitoksantronun farklı konsantrasyonlarının birlikte 72 saatlik uygulanması neticesinde 6,25 nM'lık dozun dirençsiz DU-145 hücrelerinin yaklaşık olarak %51,8'ini öldürdüğü görülmektedir. Şekil 4.18.'de probit istatistiksel analizi neticesinde bu uygulamanın IC50 dozunun 6,39 nM olarak hesaplanmıştır. Çalışmada dosetaksel ve mitoksantronun stok konsantrasyonları 4 mM ve 24 mM olduğu için bu stokları mikropipet ile 6,39 nM'a seyreltmek mümkün olmamaktadır. Bunun için IC50 değeri 6,25 nM olarak kabul edilmiştir.

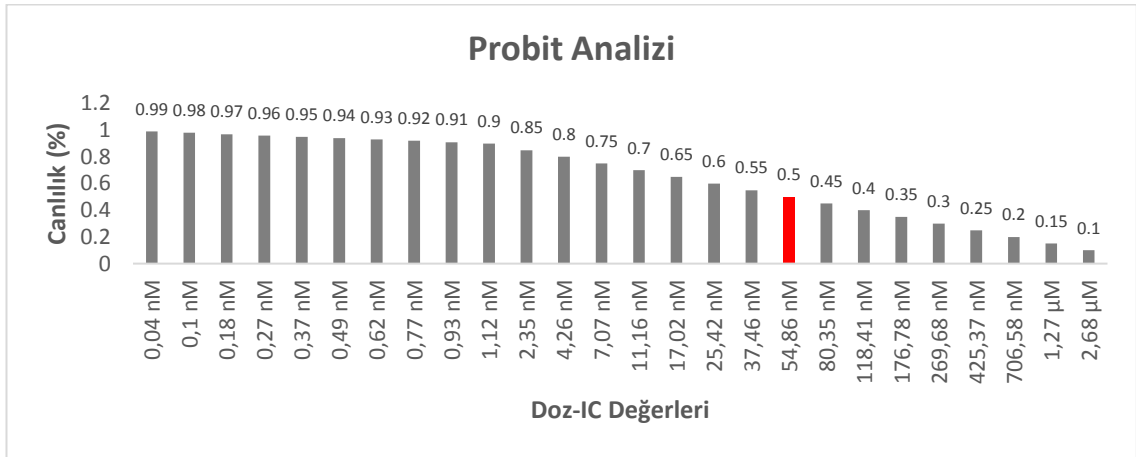
#### **4.2.1. DU-145 Hücrelerinde Çoklu İlaç Direnci Gelişimi**

5 pasaj boyunca dosetaksel ve mitoksantronun IC50 dozu olan 6,25 nM'lık konsantrasyonu uygulanarak DU-145 hücrelerinde çoklu ilaç direnci oluşturulamaya çalışılmıştır. Bunun için DU-145 hücreleri 25 cm<sup>3</sup>'lük flasklara 4 ml besi yeri ile birlikte ekilmiştir. Hücrelerin flaskın dibine tutunduğu mikroskop aracılığı ile kontrol edildikten sonra ortamdan 40 µl besi yeri uzaklaştırılıp yerine 40 µl 625 nM konsantrasyonda dosetaksel-mitoksantron karışımı uygulanmıştır. Böylece besi yerindeki madde konsantrasyonunun 6,25 nM olması sağlanmıştır. Her besi yeri değişiminde 6,25 nM'lık doz uygulanmıştır. 5 pasaj sonunda hücreler tripsin-EDTA aracılığı ile kaldırılmıştır. Hücreler; içinde dosetaksel ve mitoksantron içermeyen besi yerine alınarak 96 çukurlu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin plakadaki çukurların zemin yüzeyine tutundukları kontrol edildikten sonra 0,39- 100 nM dosetaksel ile mitoksantron birlikte uygulanmıştır. Uygulama yapıldıktan 72 saat sonra MTT analizleri yapılmıştır.

DU-145 hücrelerine 5 pasaj boyunca dosetaksel ve mitoksantronun birlikte 72 saat süreyle IC50 dozu olan 6,25 nM konsantrasyonunun uygulanmasının ardından MTT analizi yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde en düşük doz olan 0,39 nM için %98,01±1,36, en yüksek doz olan 100 nM için %45,53±1,35 canlılık tespit edilmiştir (Şekil 4.19.). Direnç geliştirilen DU-145 hücrelerinin probit analiziyle IC50 değeri 54,86 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.20.).



**Şekil 4.19.** Direnç geliştirilen DU-145 hücrelerine 0,39- 100 nM dosetaksel ile mitoksantron birlikte 72 saat süreyle uygulandıktan sonra MTT analizine bağlı canlılık miktarı ve 96'lık plakadaki canlılık miktarına bağlı renk değişimi.

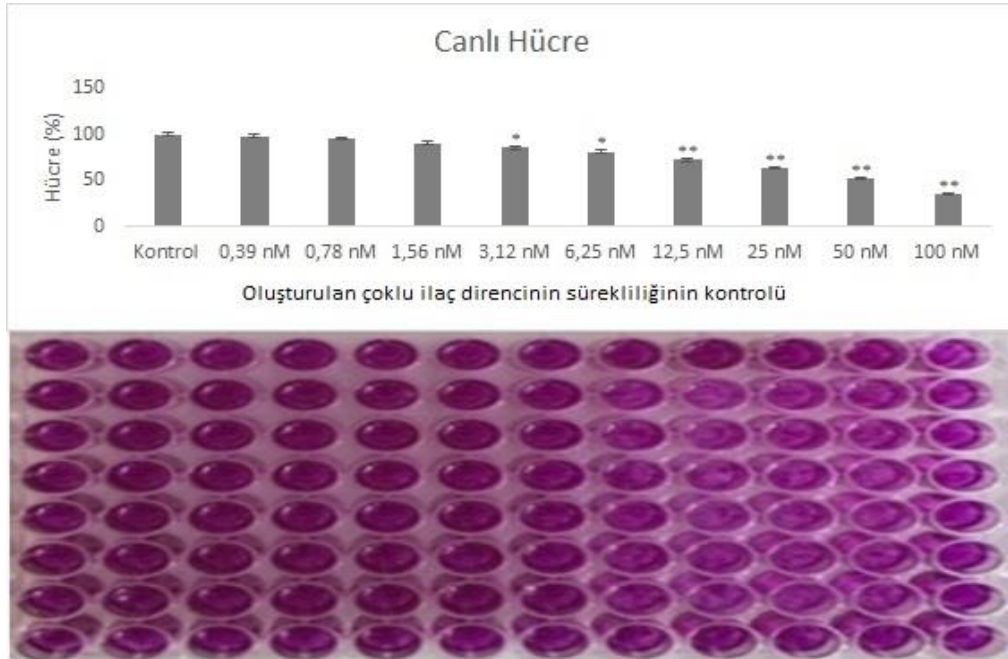


**Şekil 4.20.** Direnç geliştirmek maksadıyla 6,25 nM Dosetaksel ve mitoksantron birlikte 5 pasaj boyunca uygulanmasına bağlı DU-145 hücrelerinde değişen IC50 değerinin probit analiziyle hesaplanması.

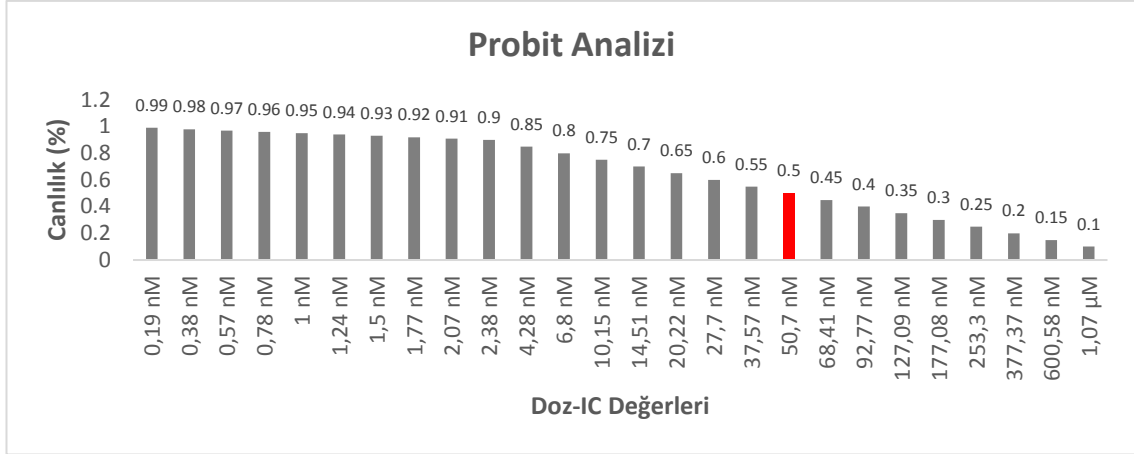
Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi DU-145 hücrelerine 5 pasaj 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanması neticesinde IC50 değeri 54,86 nM'a yükselmiştir. Direnç



gelişimine bağlı elde edilen bu IC50 değerinin kalıcılığını kontrol etmek amacıyla direnç geliştiği düşünülen DU-145 hücreleri herhangi bir madde uygulamaksızın 5 kez pasajlanmış ve 5. pasajın sonunda MTT analizi yapılmıştır. Yapılan MTT analizi sonucunda en düşük doz olan 0,39 nM için canlılık miktarı  $98,7 \pm 1,76$ , en yüksek doz olan 100 nM için  $35,24 \pm 1,24$  nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.21.). IC50 değeri probit analizi sonucunda 50,7 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.22.).



**Şekil 4.21.** Çoklu ilaç direnci oluşturulan DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmadan MTT analizinin yapılmasına bağlı sütun grafiği ve canlılık miktarına bağlı 96'lık plakadaki renk değişimi.



**Şekil 4.22.** Çoklu ilaç direnci geliştiği düşünülen DU-145 hücre hattına herhangi bir madde uygulanmadan MTT analizi yapılması neticesinde elde edilen verilere göre IC50 değerinin hesaplanması.

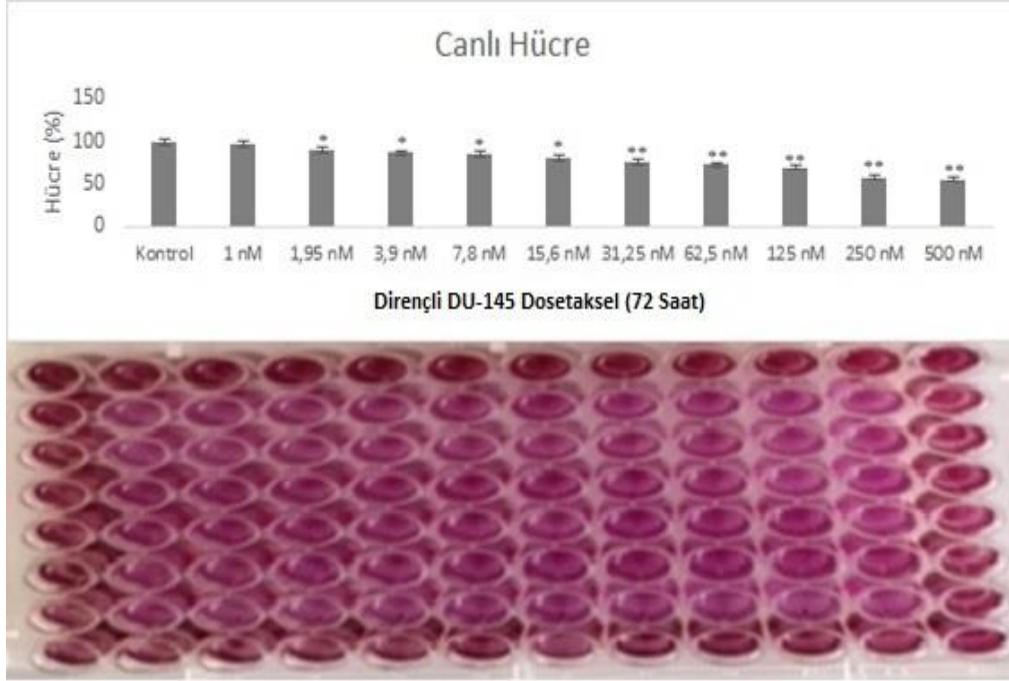
5 pasaj boyunca 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanması neticesinde Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi IC50 54,86 nM olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte madde uygulanması kesildikten 5 pasaj sonra yapılan analizler neticesi Şekil 4.22.'de görüldüğü gibi 50,7 nM'dır. Dirençsiz DU-145 hücre hattı için dosetaksel ve mitoksantronun 72 saat süreyle uygulanmasına bağlı IC50 ise 6,39 nM'dır.

#### **4.2. Dirençli DU-145 Hücreleri Üzerinde Dosetaksel, Mitoksantron, 17-DMAG ve ABA'nın Etkilerini Araştırmak İçin MTT Analizlerinin Yapılması**

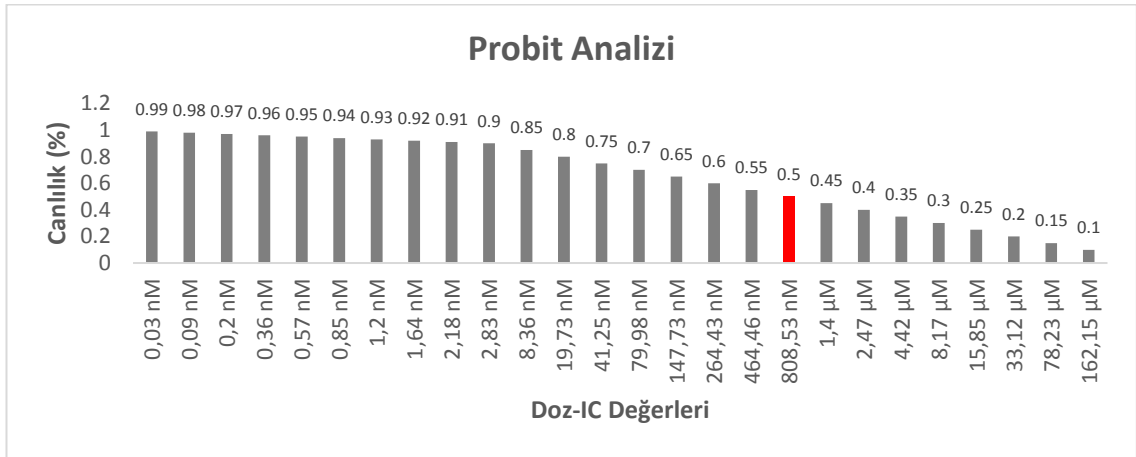
DU-145 hücre hattında, dosetaksel ve mitoksantron ile çoklu ilaç direnci geliştirildikten sonra; dosetaksel, mitoksantron, 17-DMAG ve ABA'nın ayrı ayrı ve birlikte etkileri araştırılmıştır.

##### **4.2.1. Dirençli DU-145 Hücreleri Üzerinde Dosetakselin Etkisi**

Dirençli DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle dosetakselin 1-500 nM doz aralığı uygulanarak canlılık üzerine etkisi araştırılmıştır. Buna göre yapılan MTT analiz sonuçlarının anlamlı olduğu ve canlılık miktarı en düşük doz olan 1 nM için %97,47±3,54, en yüksek doz olan 500 nM için %55,48±2,51 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.23.). IC50 değeri probit analizi neticesinde 808,53 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24.).



**Şekil 4.23.** Dirençli DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 1- 500 nM dosetaksel uygulanması sonucunda MTT analizinden elde edilen sütun grafiği ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.

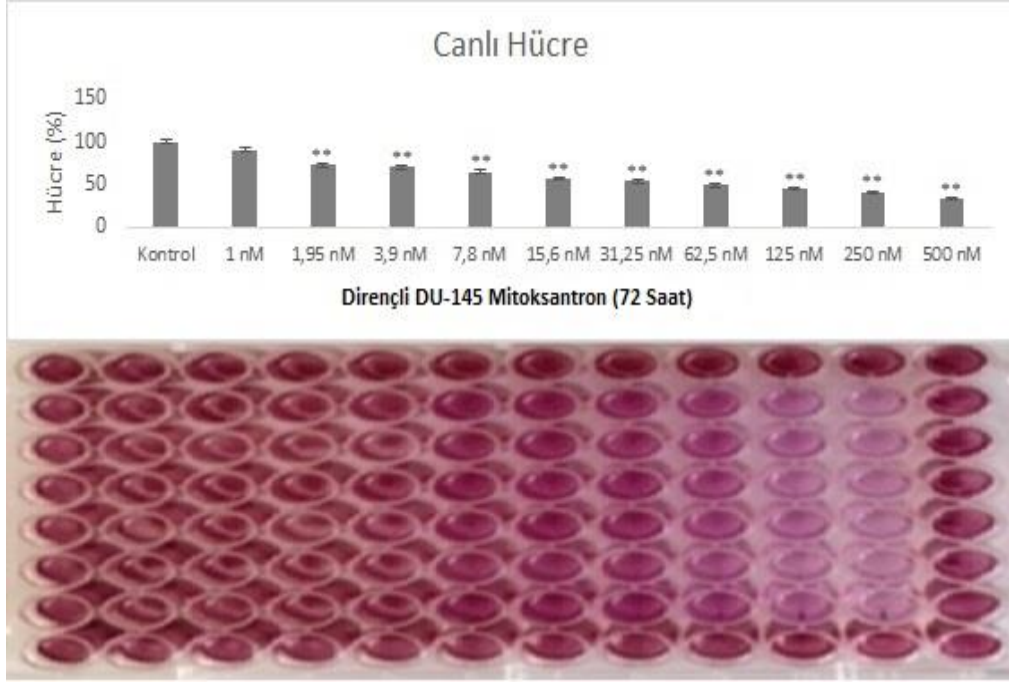


**Şekil 4.24.** MDR'li DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle dosetaksel uygulanması neticesinde probit analiziyle IC50 değerinin hesaplanması.

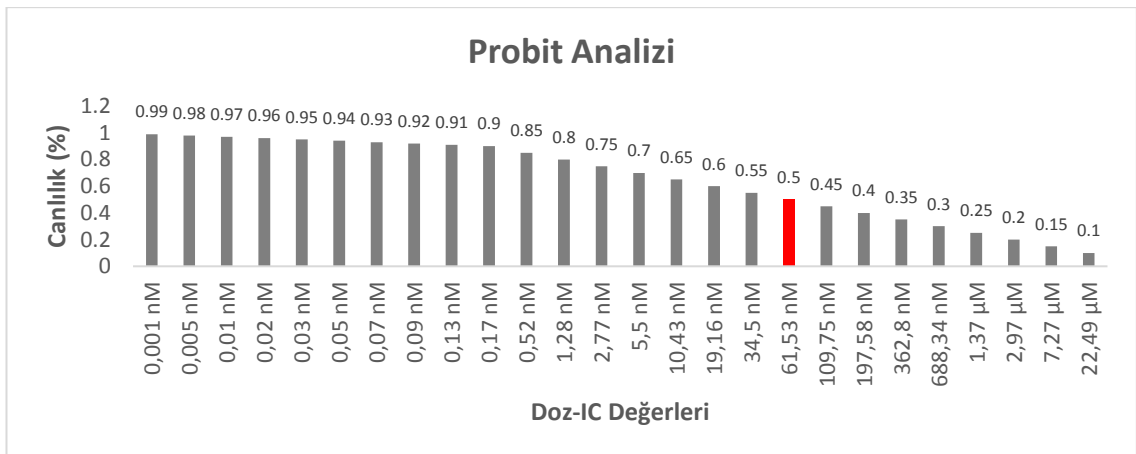
#### 4.2.2. Dirençli DU-145 Hücrelerinin Üzerinde Mitoksantronun Etkisi

Dirençli DU-145 hücre hattına tek başına mitoksantronun 72 saat süreyle 1- 500 nM konsantrasyonunun uygulanmasına bağlı canlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. MTT

analiz neticelerine mitoksantronun en düşük dozu olan 1 nM için canlılık  $90,85 \pm 2,31$ , en yüksek dozu olan 500 nM için  $33,72 \pm 1,27$  olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25.). IC50 değeri yapılan probit analiz neticesinde 61,53 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.26.).



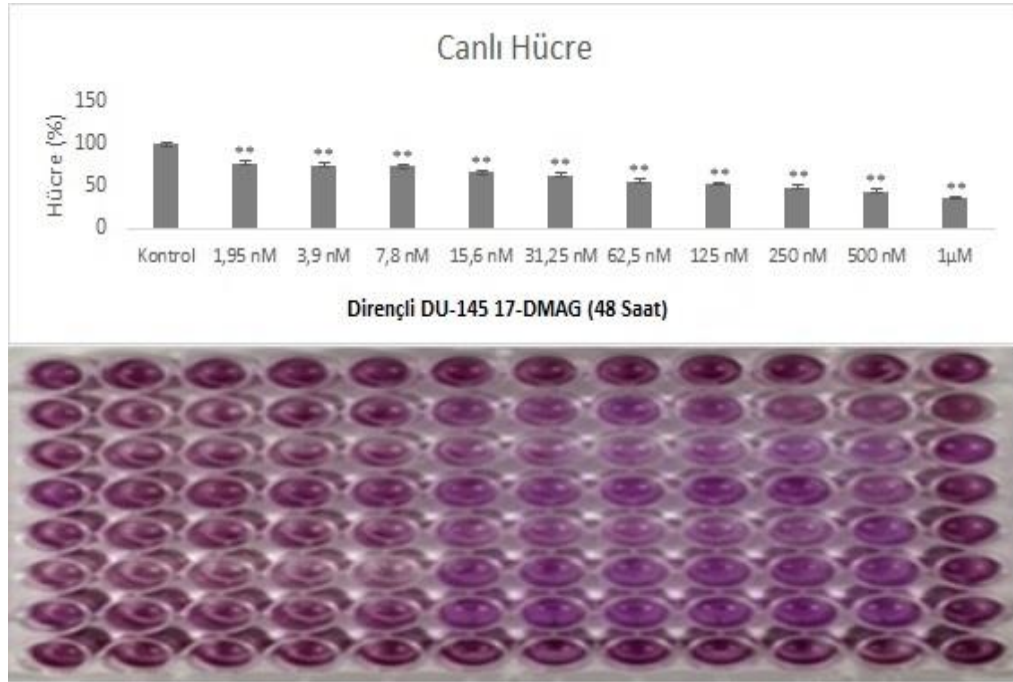
**Şekil 4.25.** Dirençli DU-145 hücre hattına 1- 500 nM mitoksantronun 72 saat süreyle uygulanmasına bağlı oluşturulan MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.



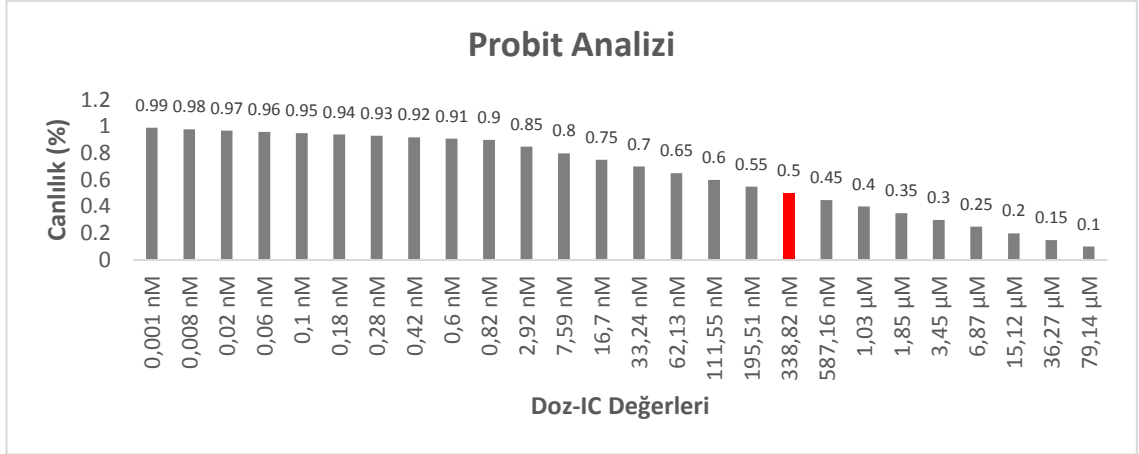
**Şekil 4.26.** Dirençli DU-145 hücre hattına 1- 500 nM mitoksantronun 72 saat süreyle uygulanması sonucunda IC50 değerinin hesaplanması.

#### 4.2.3. Çoklu İlaç Dirençli DU-145 Hücre Hattında 17-DMAG'ın Etkileri

Dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 1,95 nM- 1 $\mu$ M 17-DMAG'ın uygulanması neticesinde MTT analizleri yapılmıştır. Yapılan MTT analizi neticesinde hücre miktarındaki azalmanın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Canlılık miktarı en düşük doz olan 1,95 nM için %77,83 $\pm$ 2,56, en yüksek doz olan 1  $\mu$ M için 36,34 $\pm$ 1,96 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.27.). IC50 değeri probit analizi neticesinde 338,82 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.28.).



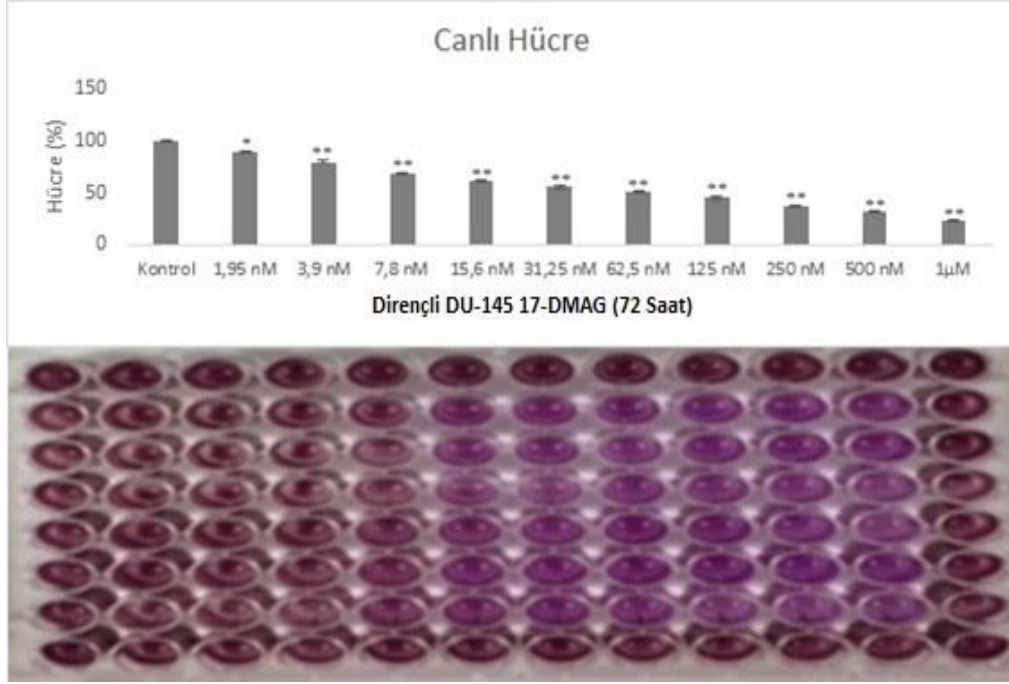
**Şekil 4.27.** Dirençli DU-145 hücrelerine 48 saat süreyle 1,95 nM- 1  $\mu$ M 17-DMAG uygulandıktan sonra yapılan MTT analizinin sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılığına bağlı renk değişimi.



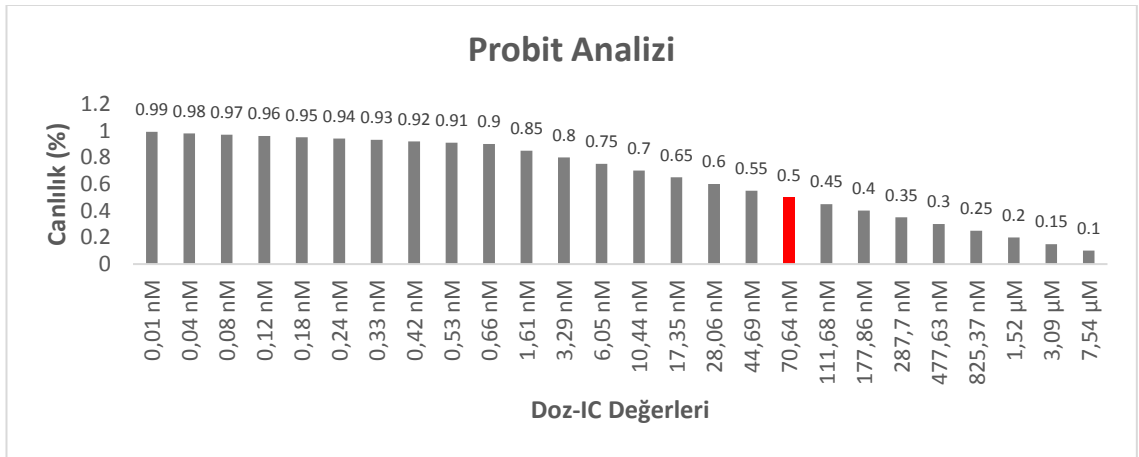
**Şekil 4.28.** Dirençli DU-145 hücrelerine 48 saat süreyle 1 nM- 1 µM 17-DMAG uygulanması sonucunda IC50 değerinin hesaplanması.

Dirençli DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 1,95 nM- 1µM 17-DMAG'ın uygulanmasına bağlı hücre miktarında anlamlı azalmalar olmuştur. Canlılık miktarı en düşük doz olan 1,95 nM için  $89,22 \pm 1,25$ , en yüksek doz olan 1 µM için  $23,29 \pm 1,06$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.29.). Yapılan probit analizi neticesinde IC50 değeri 70,64 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.30.).





**Şekil 4.29.** Dirençli DU-145 hücre hattına 1,95 nM- 1 µM 17-DMAG uygulandıktan 72 saat sonra yapılan MTT analizinin sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.

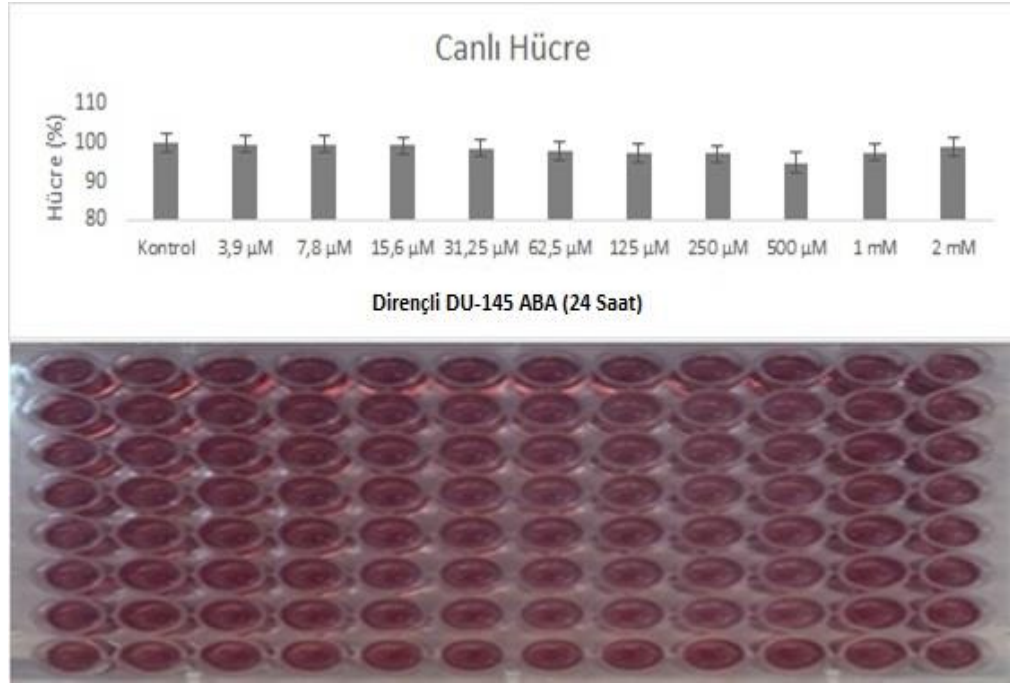


**Şekil 4.30.** Dirençli DU-145 hücrelerine 72 saat süreyle 1 nM- 1 µM 17-DMAG uygulanmasına bağlı IC50 değerinin hesaplanması.

72 saat süreyle uygulanmaya bağlı IC50 dozu 70,64 nM iken 48 saat sürelik uygulama için bu değer 338,82 nM olarak hesaplanmıştır. 17-DMAG için etkin süre 72 saat etkin IC50 değeri 70,64 nM olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.4. Dirençli DU-145 Hücrelerinin Üzerinde Absisik Asit (ABA)'in Etkisi

Abisik asit (ABA)'in dirençli DU-145 hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat süreyle 3,9  $\mu$ M-2 mM doz aralığının uygulanmasına bağlı etkisi araştırılmıştır. ABA'nın 24 saatlik uygulanmasına bağlı MTT analizinden elde edilen verilerin anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanan en düşük doz olan 3,9  $\mu$ M için canlılık  $99,69 \pm 2,57$  ancak en az canlılık miktarı 500  $\mu$ M için  $94,82 \pm 2,76$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.31.). ABA'nın 24 saat süreyle uygulanmasına bağlı dirençli DU-145 hücre hattında meydana gelen azalmalar düzenli olmayıp; 1 mM ve 2 mM'lık uygulamada canlılık miktarı 500  $\mu$ M'a göre daha fazla olduğu için probit analizi yapılmamıştır ve IC50 değeri elde edilememiştir.

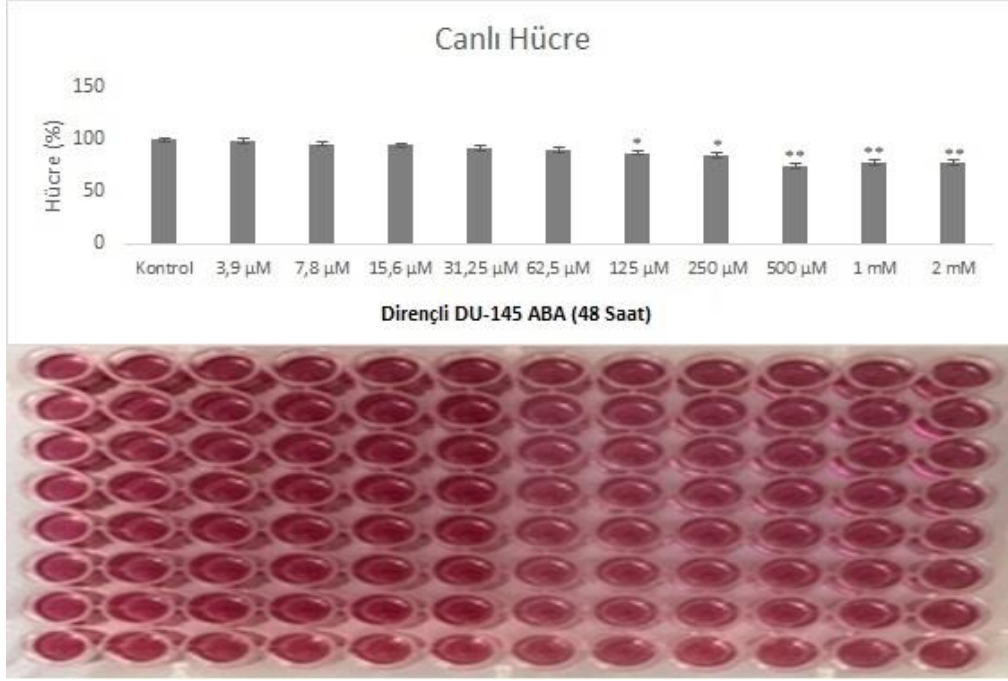


**Şekil 4.31.** Dirençli DU-145 hücre hattına 24 saat süreyle 3,9  $\mu$ M- 2 mM ABA'nın uygulanması neticesinde oluşturulan MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.

Dirençli DU-145 hücre hattına ABA'nın 48 saat süreyle 3,9  $\mu$ M- 2 mM doz aralığının uygulanmasına bağlı hücre miktarındaki azalmanın anlamlı olduğu belirlenmiştir. En yüksek canlılık miktarı 3,9  $\mu$ M için  $98,76 \pm 2,11$ , en az canlılık 500  $\mu$ M için  $74,78 \pm 2,24$  olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32.). 1 ve 2 mM

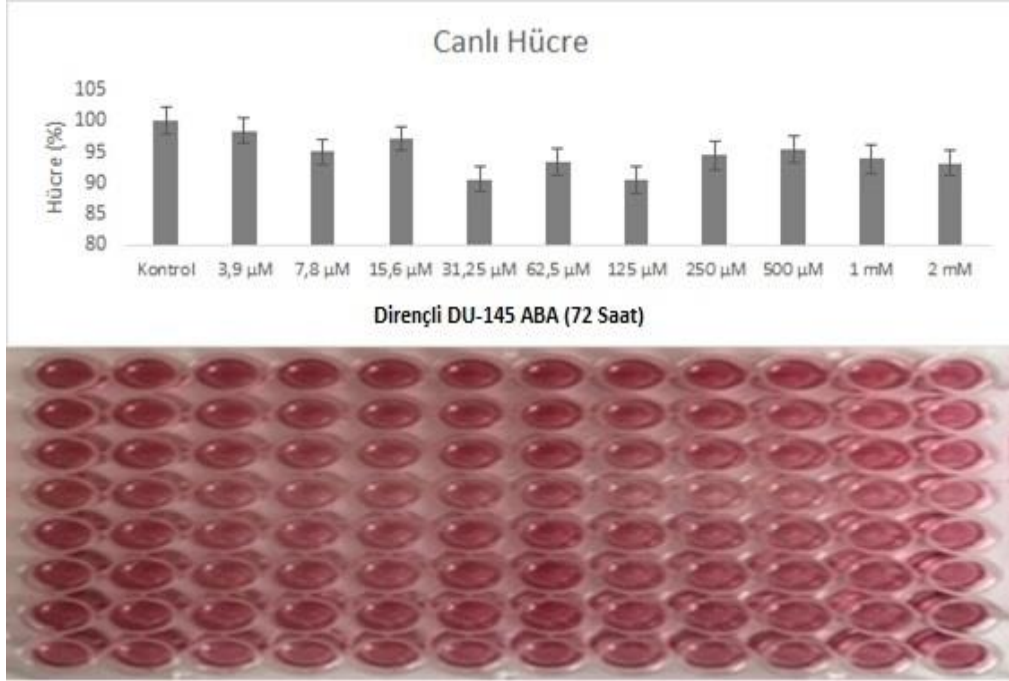


konsantrasyonlarında hücrelerdeki canlılık miktarı 500  $\mu$ M uygulamasına göre daha fazla olduğu için IC50 değeri hesaplanamamıştır.



**Şekil 4.32.** Dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 3,9  $\mu$ M- 2 mM ABA'nın uygulanması neticesinde elde edilen MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.

Dirençli DU-145 hücre hattına ABA'nın 72 saat süreyle 3,9  $\mu$ M-2 mM doz aralığının uygulanması sonucunda elde edilen MTT verilerinin anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Sütun grafiğine göre en fazla canlılık miktarı 3,9  $\mu$ M için %98,44±2,11, en az canlılık miktarı 125  $\mu$ M'lık uygulamada %90,41±2,31 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.33.). ABA'nın 125  $\mu$ M'lık konsantrasyonunun uygulanmasından sonra gelen doz aralığına bağlı canlılık miktarında artış olduğu için IC50 değeri 72 saatlik uygulama için hesaplanamamıştır.



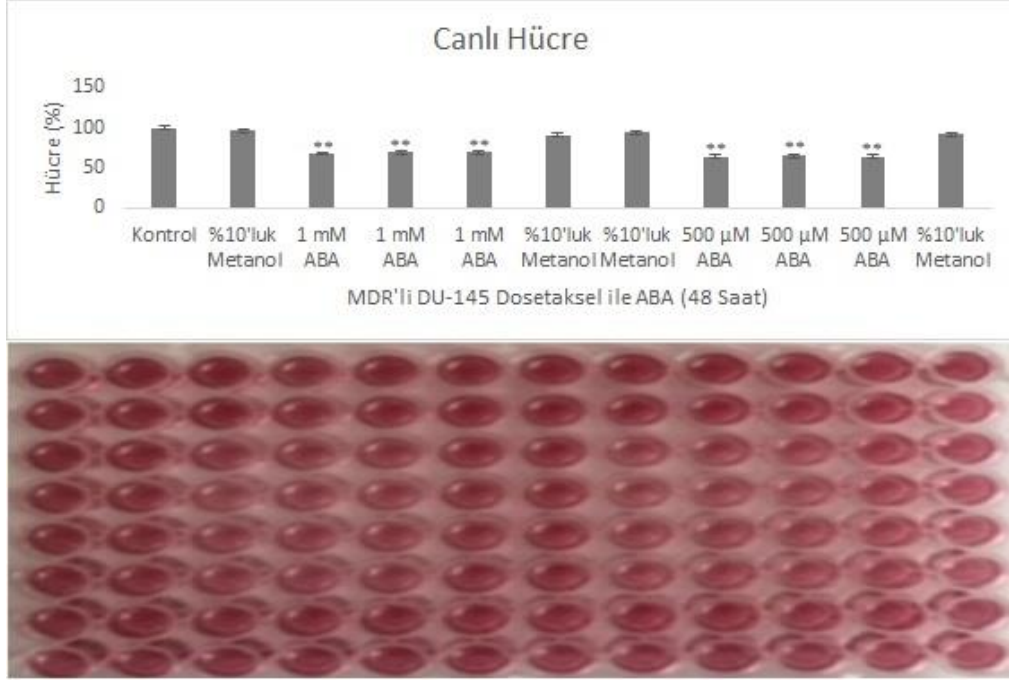
**Şekil 4.33.** Dirençli DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 3,9 µM- 2 mM ABA'nın uygulanması neticesinde elde edilen MTT sütun grafiği ve 96'lık plakadaki hücrelerin canlılık miktarına bağlı renk değişimi.

3,9 µM-2 mM ABA'nın 48 saatlik uygulanması neticesinde elde edilen verilere göre en fazla ölüm %25,22 oranında 500 µM'lık uygulamaya bağlı olarak gerçekleşmiştir.

#### **4.2.5. Dositaksel ve ABA'nın Birlikte Dirençli DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri**

Daha önce dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı DU-145 hücre hattında çoklu ilaç direnci geliştirilmiştir. Ancak mitoksantronun hepatotoksik etkileri nedeniyle (Llesuy & Arnaiz, 1990) sadece kanser hücrelerine değil aynı zamanda sağlıklı hücrelere de zarar vereceğinden dolayı çoklu ilaç direnci geliştirildikten sonra kullanılmasına son verilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattı üzerinde dosetaksel ve ABA'nın birlikte etkilerini araştırmak için 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel ile 1 mM ABA ve 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulamaları yapılmıştır. 50 nM dosetaksel ile 1 mM ABA'nın birlikte uygulanması neticesinde ortalama %68,68±1,97, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı ise %64,36±2,11 canlı

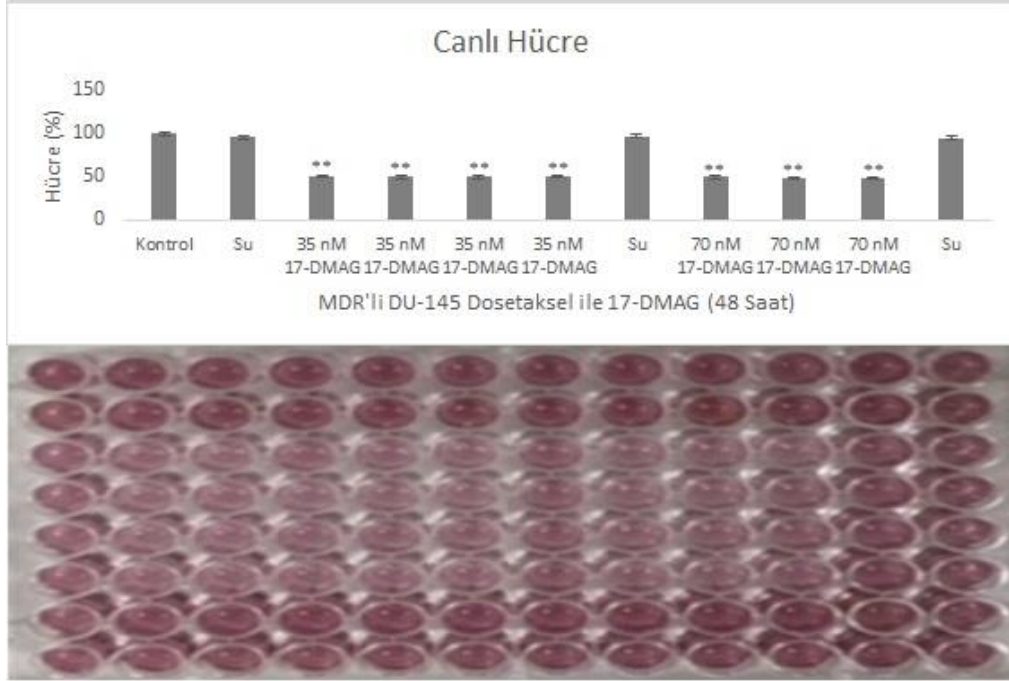
hücre tespit edilmiştir. Bu uygulamalara bağlı canlılık miktarındaki anlamlı azalmalar Şekil 4.34.'te MTT sütun grafiği ve 96'lık plakada gösterilmiştir.



**Şekil 4.34.** Dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 50 nM dozetaksel ile 1 mM ABA ve 50 nM dozetaksel ile 500 µM ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı canlılık miktarının MTT sütun grafiğinde ve 96'lık plakada gösterilmesi.

#### 4.2.6. Doksetaksel ve 17-DMAG'ın Birlikte Dirençli DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri

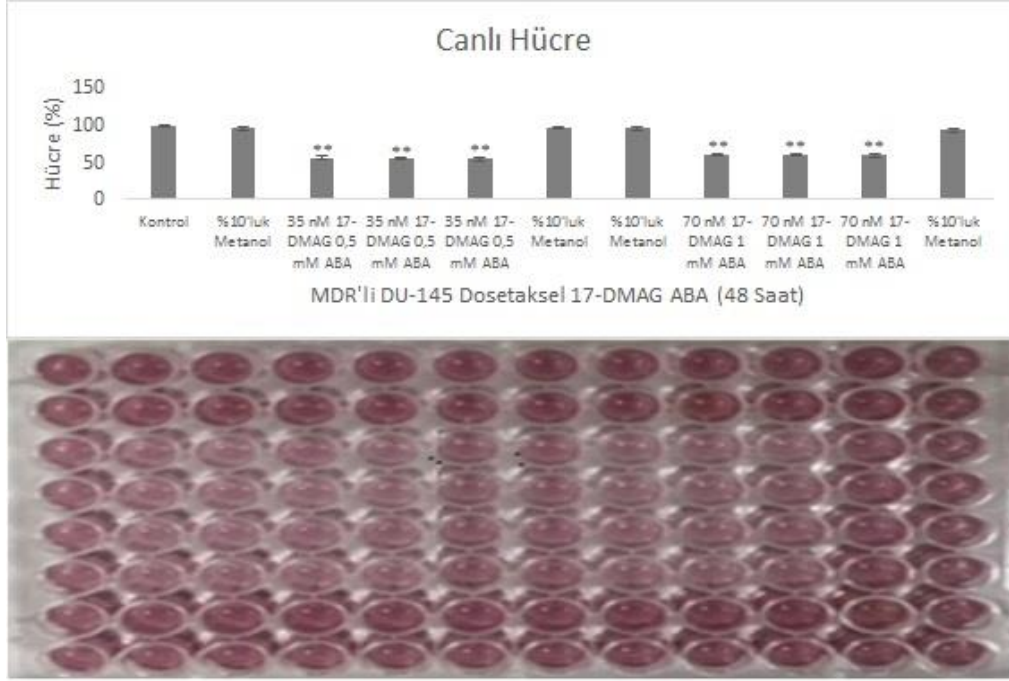
Dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 50 nM dozetaksel ile 35-70 nM 17-DMAG'ın birlikte uygulanmasına bağlı hücrelerin canlılık miktarındaki değişimleri araştırmak için MTT analizi yapılmıştır. Yapılan MTT analizi sonucunda hücre miktarlarındaki azalmanın anlamlı olduğu, 50 nM dozetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulamasına bağlı  $50,33 \pm 2,32$ , 50 nM dozetaksel ile 70 nM 17-DMAG uygulamasında ise ortalama  $49,16 \pm 2,01$  canlı hücre olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.35.).



**Şekil 4.35.** Dirençli DU-145 hücrelerine 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG ve 50 nM dosetaksel ile 70 nM 17-DMAG birlikte uygulanmasına bağlı canlılık miktarları ve 96'lık plakadaki canlılığa bağlı renk değişimi.

#### **4.2.7. Dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın Birlikte Dirençli DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkileri**

Dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın birlikte etkilerini araştırmak için 96'lık plakaya dirençli DU-145 hücre hattı ekilmiştir. Plakanın 3 sırasına 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500 µM ABA birlikte uygulanmıştır. Diğer 3 sıraya ise aynı süre boyunca 50 nM dosetaksel, 70 nM 17-DMAG ve 1 mM ABA birlikte uygulanmıştır. Yapılan MTT analizleri sonucunda uygulamalara bağlı hücrelerin canlılık miktarındaki azalmanın anlamlı olduğu saptanmıştır. 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 0,5 mM ABA'nın birlikte uygulamasına bağlı %55,66±1,89, 50nM dosetaksel, 70 nM 17-DMAG ile 1mM ABA'nın uygulanmasına bağlı ortalama %60,08±1,02 canlılık tespit edilmiştir (Şekil 4.36.).



**Şekil 4.36.** Dirençli DU-145 hücre hattına doksetsel, 17-DMAG ile ABA'nın farklı konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda elde edilen MTT grafiği ve 96'lık plakada canlılık miktarına bağlı renk değişimi.

Ancak Şekil 4.35.'te ABA'nın 500 µM'lık dozunun olmadığı durumda ölüm oranı %49,66 iken ABA'nın 1 mM'lık dozu kullanılmadan ölüm oranı %50,84'tür. Bu durumdan dolayı ABA ile 17-DMAG'ın sinerjistik/ antagonistik ilişkisi BLISS, CDA ve HSA denklemlerine göre araştırılmıştır:

$$CDI_{50nM \text{ Doksetsel}, 35nM \text{ 17-DMAG ve } 500\mu M \text{ ABA}} = 0,56 / (0,5 \times 0,69) = 1,61$$

1,61 > 1 Antagonist

$$CDI_{50nM \text{ Doksetsel}, 70nM \text{ 17-DMAG ve } 1mM \text{ ABA}} = 0,6 / (0,49 \times 0,64) = 1,9$$

1,9 > 1 Antagonist

$$BLISS (CI)_{50nM \text{ Doksetsel}, 35nM \text{ 17-DMAG ve } 500\mu M \text{ ABA}} =$$

$$[(0,5 + 0,31) - (0,5 \times 0,31)] / 0,44 = 1,48 \quad 1,48 > 1 \text{ Antagonist}$$

$$BLISS (CI)_{50nM \text{ Doksetsel}, 70nM \text{ 17-DMAG ve } 1mM \text{ ABA}} =$$

$$[(0,51 + 0,36) - (0,5 \times 0,36)] / 0,4 = 1,71 \quad 1,71 > 1 \text{ Antagonist}$$

$$\text{HSA } 50\text{nM Doseetaksel, } 35\text{nM } 17\text{-DMAG ve } 500\mu\text{M ABA} = 0,5 / 0,44 = 1,12$$

1,12 > 1 Antagonist

$$\text{HSA } 50\text{nM Doseetaksel, } 70\text{nM } 17\text{-DMAG ve } 1\text{ mM ABA} = 0,51 / 0,4 = 1,27$$

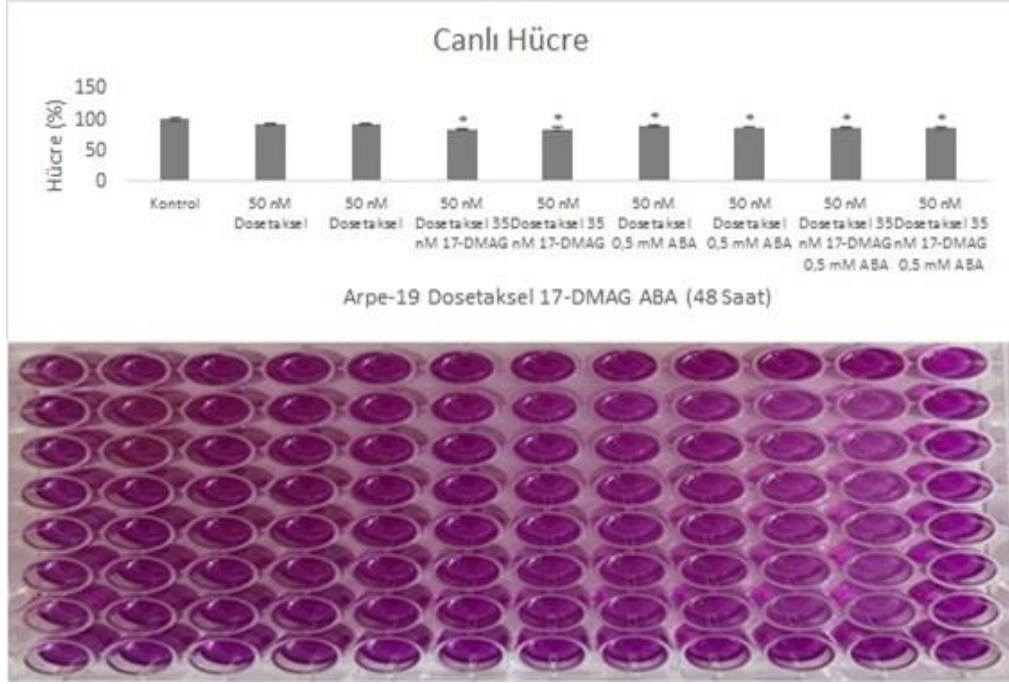
1,27 > 1 Antagonist

17-DMAG ile ABA'nın çoklu ilaç dirençli DU-145 hücre hattı üzerinde birlikte uygulanmasına bağlı yapılan MTT analiz sonuçları; hem CDI, hem BLISS (CI) hem de HSA denklemine göre bu iki maddenin antagonist (birbirinin etkisini azaltan) olduğunu göstermiştir.

#### **4.2.8. ARPE-19 (Sağlıklı Retinal Pigment) Hücre hattında, Dirençli DU-145 Hücre Hattında Etkin Olan Doseetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın Etkileri**

Dirençli DU-145 hücre hattı üzerinde doseetakselin, 17-DMAG'ın, ABA'nın tekli, ikili ve üçlü etkin uygulamalarına bağlı sitotoksik etkilerini sağlıklı hücre hattında araştırmak için aynı uygulamalar 48 saat süreyle ARPE-19 hücre hattına da yapılmıştır. Uygulamalar neticesinde yapılan MTT analizlerine göre, dirençli DU-145 hücrelerin canlılık miktarındaki azalmanın doseetaksel için istatistik olarak önemli olmadığı, diğer uygulamalar için önemli olduğu belirlenmiştir. MTT analizine göre doseetaksel tek başına %7,6±0,04, doseetaksel ile 17-DMAG birlikte %15,98±0,67, doseetaksel ile ABA birlikte %11,24±1,02 ve üç madde birlikte %13,44±0,41 oranında ARPE-19 hücrelerinin canlılık miktarında azalma meydana getirmiştir (Şekil 4.37.).





**Şekil 4.37.** ARPE-19 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan maddelere karşılık hücrelerin canlılık miktarındaki değişimin MTT analizi ve 96'lık plakada gösterilmesi.

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarıyla karşılaştırıldığı zaman ARPE-19'da meydana gelen bu ölüm oranlarının son derece az olması, kullanılan maddelerin sağlıklı hücre hattı üzerinde sitotoksik etkilerinin az olduğunu göstermektedir.

### 4.3. Gen İfadesi Analizi Sonuçları

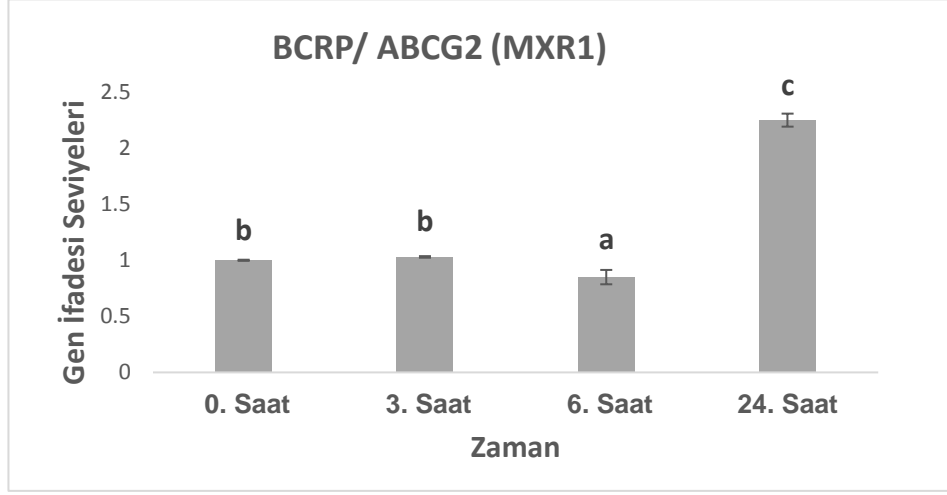
#### 4.3.1. Dirençsiz DU-145 Hücre Hattında Madde Uygulanmasına Bağlı Gen İfadesi Seviyesinde Meydana Gelen Değişimler

Yapılan SPSS analizleri neticesinde gen ifadesi seviyelerinde meydana gelen anlamlı değişimler küçükten büyüğe doğru a, ab, b, bc, c, cd ve d olacak şekilde harflendirilmiştir.

##### 4.3.1.1. Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadeleri

BCRP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.38.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında BCRP ifadesi kontrole göre 6. saatin sonunda  $0,85 \pm 0,07$  kat olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık 24. saatin sonunda BCRP geninin

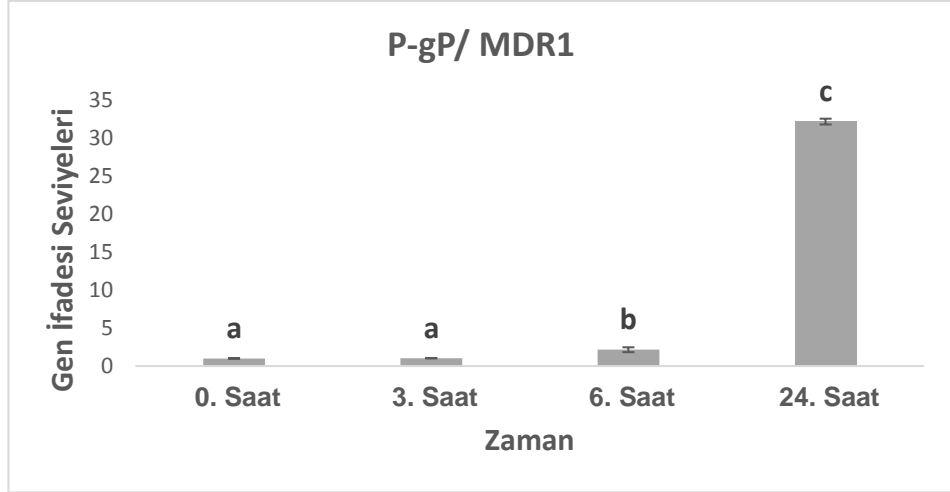
ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış olmuş ve  $2,26 \pm 0,5$  kat olarak belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.38.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCRP/ ABCG2 (MXR1) geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

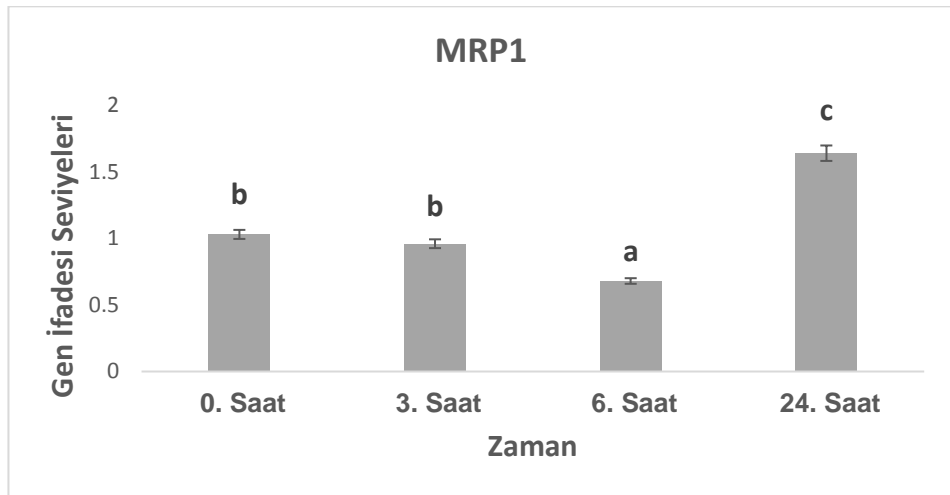
P-gP gen ifadelerinde uygulamadan sonra 3-24 saat aralıklarında gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.39.'da gösterilmiştir. P-gP/ MDR1'in gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artışların 6. saatte (kontrole göre  $2,15 \pm 0,39$  kat) ve 24. saatte (kontrole göre  $32,14 \pm 0,21$  kat) olduğu belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).





**Şekil 4.39.** Dirençsiz DU-145 hücre hattında 6,25 nM dozetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak P-gP/ MDR1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

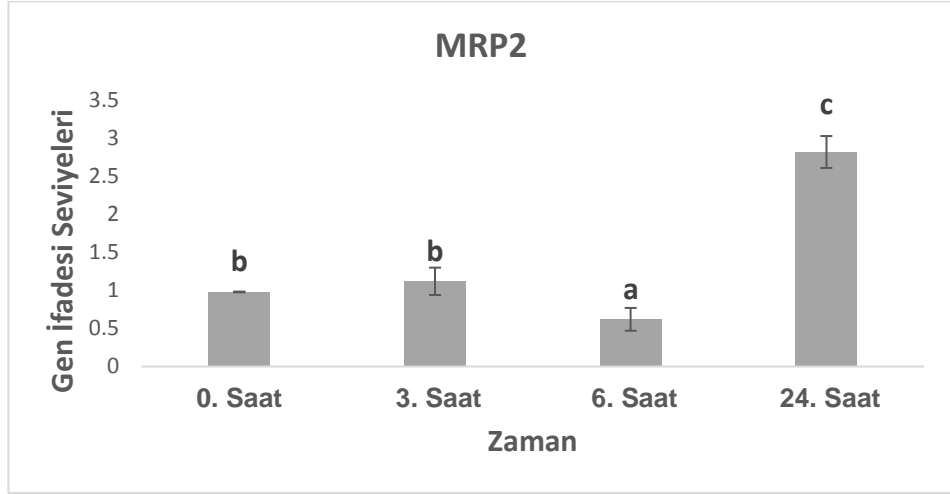
MRP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.40.'ta gösterilmiştir. MRP1'in gen ifadesi seviyesi 6. saatte kontrole göre  $0,68 \pm 0,21$  kata kadar azalmasına rağmen 24. saatte  $1,64 \pm 0,58$  kat yükselmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.40.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dozetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

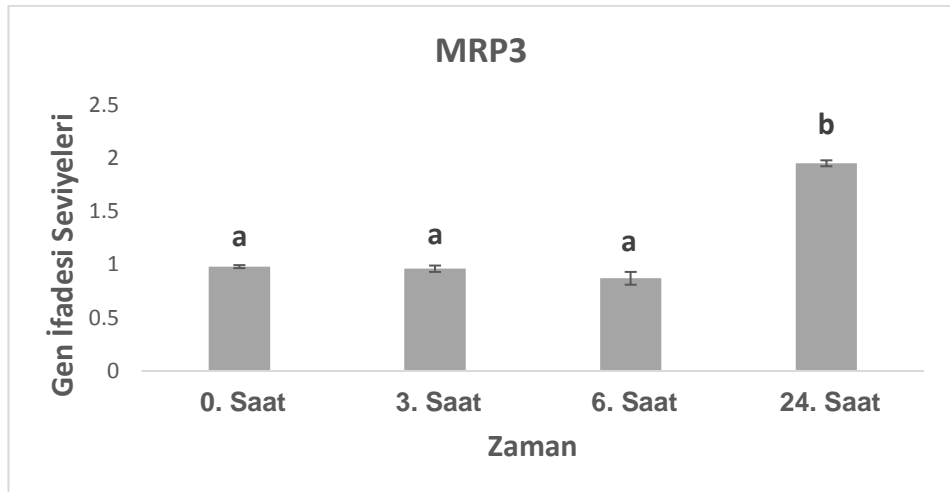
MRP2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.41.'de gösterilmiştir. MRP2'nin gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler 6. saatte

(kontrolle göre  $0,62 \pm 0,21$  kat azalma) ve 24. saatte (kontrolle göre  $1,64 \pm 0,58$  kat artış) belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



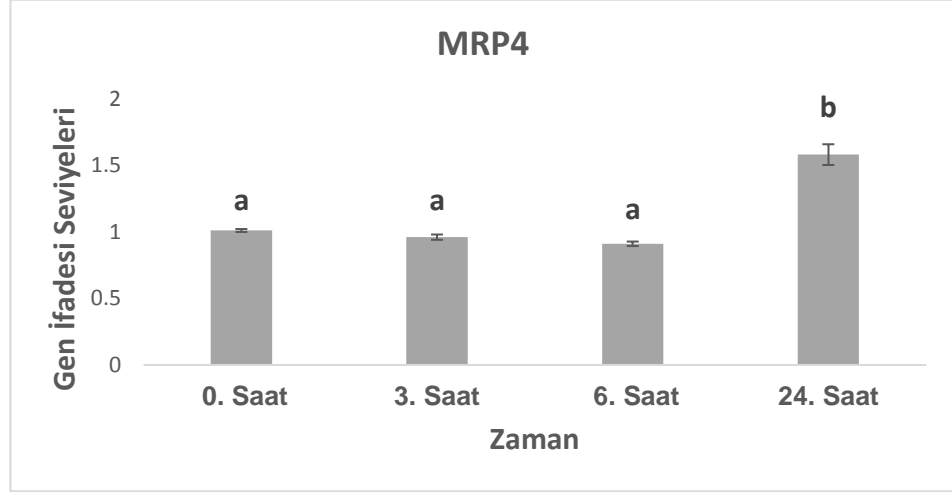
**Şekil 4.41.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MRP3'ün uygulamadan sonra gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.42.'de gösterilmiştir. MRP3'ün gen ifadesi seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı değişim sadece uygulamanın 24. saatinde kontrolle göre  $1,95 \pm 0,29$  kat artış olarak belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



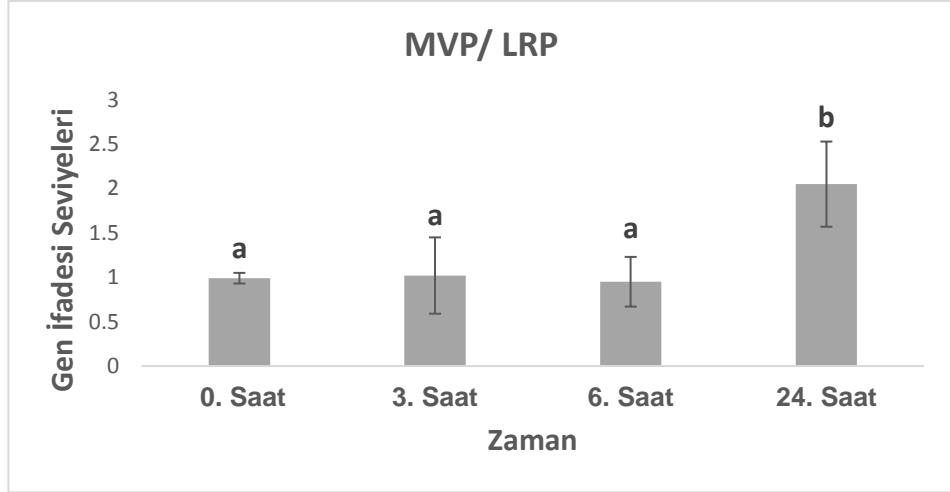
**Şekil 4.42.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MRP4'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.43.'te gösterilmiştir. MRP4'ün gen ifadesi seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı değişim sadece uygulamanın 24. saatinde kontrole göre  $1,58 \pm 0,78$  kat artış olarak belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.43.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

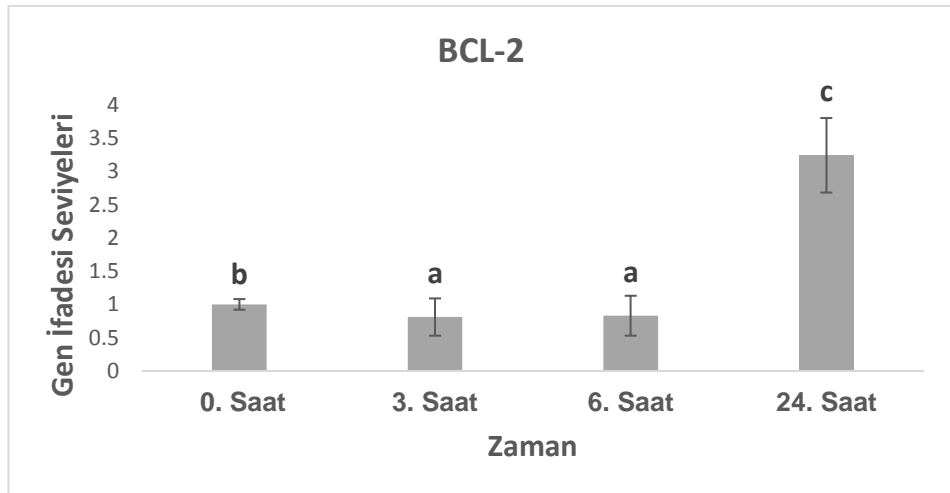
MVP/LRP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.44.'te gösterilmiştir. Görüldüğü gibi gen ifadesinde anlamlı değişim sadece 24. saatte kontrole göre  $2,06 \pm 0,48$  kat artış olarak saptanmıştır ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.44.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### 4.3.1.2. BCL-2 Onkogeninin İfadesi

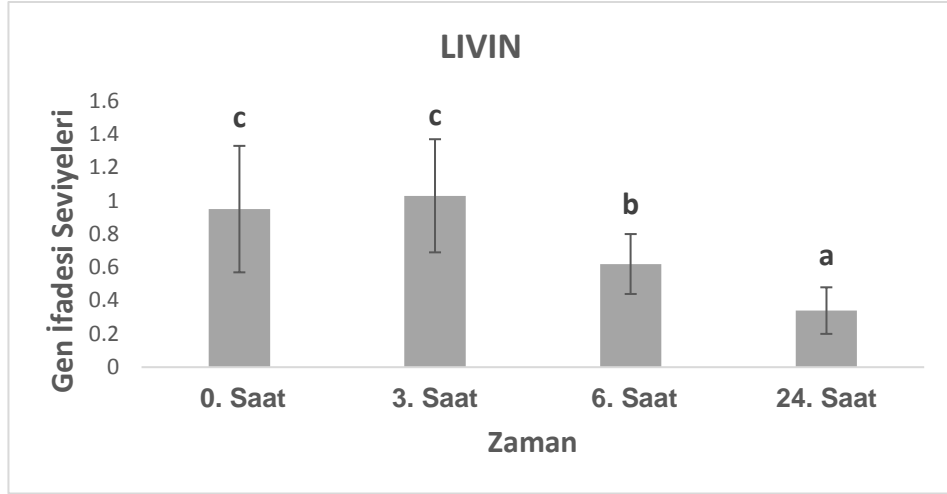
BCL-2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.45.'te gösterilmiştir. BCL-2'nin gen ifadesi seviyesinin uygulamanın 24. saatinde kontrole göre  $3,24 \pm 0,5$  kat artış ile istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.45.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

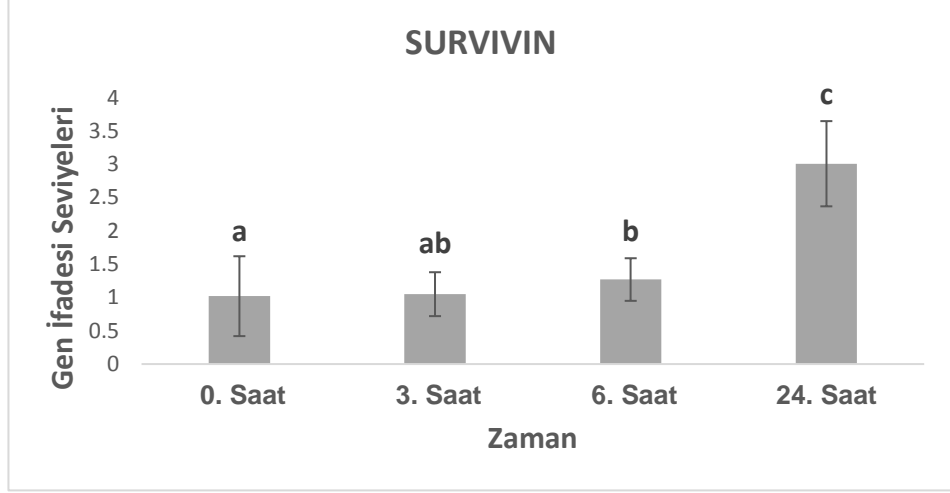
#### 4.3.1.3. Sağ Kalım Genlerinin İfadesi

Livin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.46.'da gösterilmiştir. Livin gen ifadelerinde uygulamanın 6. ve 24. saatlerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmaların olduğu (6. saatte  $0,62\pm 0,18$  kat ve 24. saatte  $0,34\pm 0,14$  kat) belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



Şekil 4.46. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak Livin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

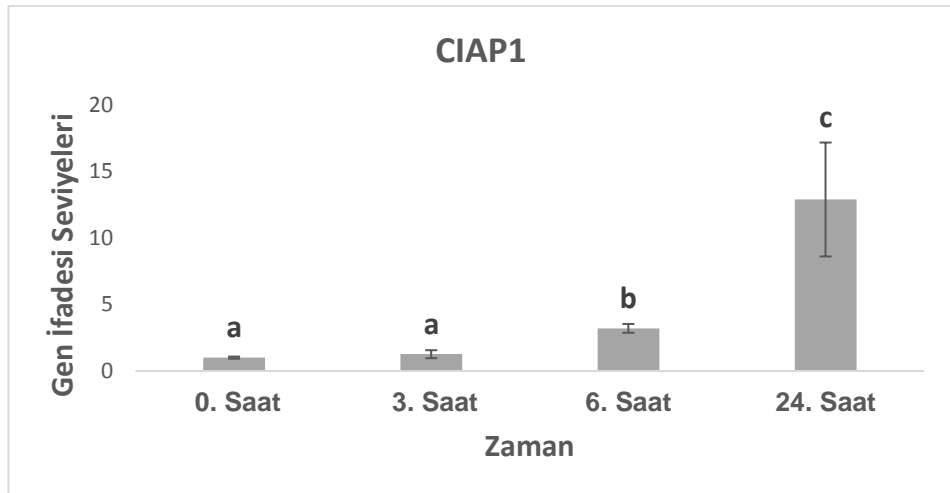
Survivin'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.47.'de gösterilmiştir. Survivin gen ifadesinin en yüksek değerinin uygulamanın 24. saatinde (kontrole göre  $3,01\pm 0,64$  kat artış) olduğu saptanmıştır ( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.47.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak Survivin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

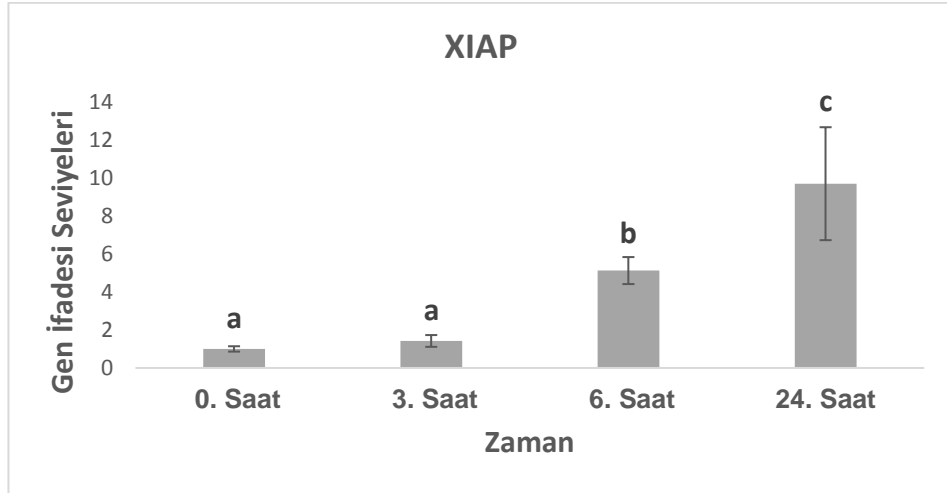
#### 4.3.1.4. Apoptoz İnhibitör Gnelerinin İfadeleri

CIAP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.48.'de gösterilmiştir. CIAP1'in gen ifadesi seviyesi 6. saat ve 24. saatte kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiş ve bu artışlar 6. saatte kontrole göre  $3,19 \pm 0,33$  kat, 24. saatte kontrole göre  $12,88 \pm 4,28$  kat olarak belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.48.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak CIAP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

XIAP'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.49.'da gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi gen ifadesi seviyeleri 6. ve 24. saatlerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar göstermiş ve bu artışlar kontrole göre 6. saatte  $5,12 \pm 0,71$  kat ve 24. saatte  $9,69 \pm 2,97$  kat olarak hesaplanmıştır ( $P \leq 0,05$ ).



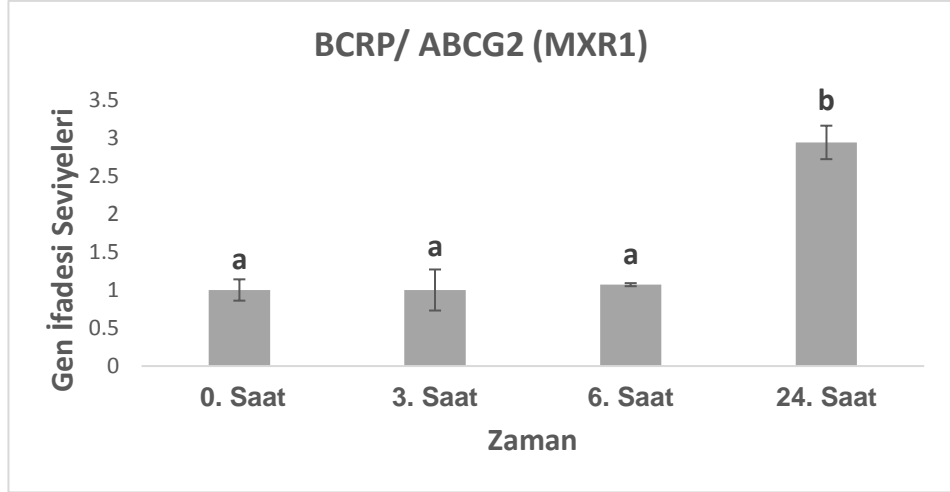
**Şekil 4.49.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### **4.3.2. Dirençli DU-145 Hücre Hattına Dosetaksel ve Mitoksantronun Birlikte Uygulanmasına Bağlı Gen İfadesi Seviyelerinde Meydana Gelen Değişimler**

Çalışmada dosetaksel ve mitoksantronun birlikte 72 saatlik uygulanmasına bağlı IC50 değeri 6,25 nM olarak bulunduktan sonra bu doz dirençsiz DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca uygulanmıştır. 5. pasaj sonunda oluşturulan dirence bağlı gen ifadelerinde meydana gelen değişimler aşağıda sütun grafikleri aracılığı ile açıklanmıştır.

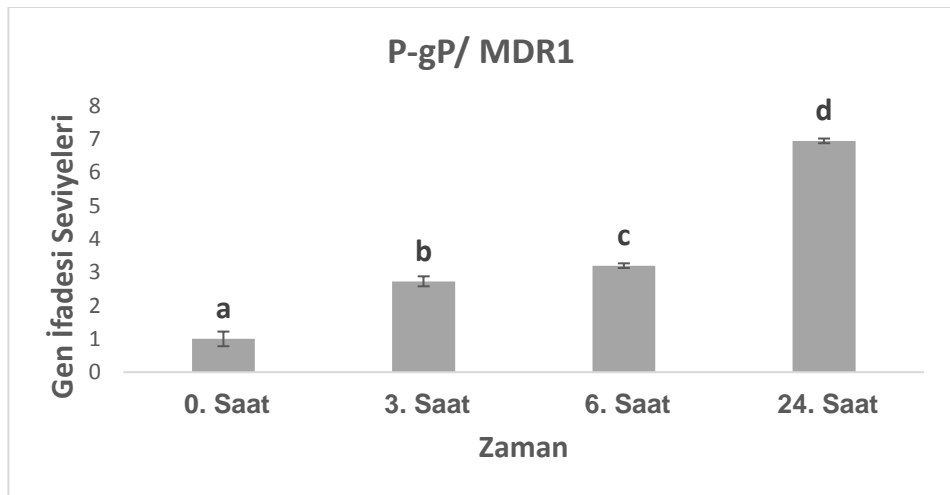
##### **4.3.2.1. Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadeleri**

BCRP/ABCG2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.50.'de gösterilmiştir. BCRP/ABCG'nin gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim uygulamanın 24. saatinde kontrole göre  $2,94 \pm 0,22$  kat olarak belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.50.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

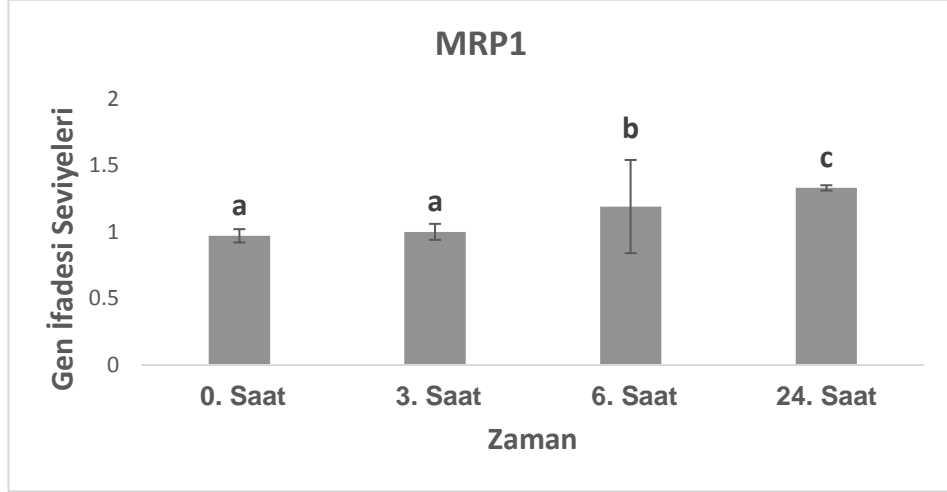
P-gP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.51.'de gösterilmiştir. P-gP/ MDR1'in gen ifadesi seviyesi 0. saatte  $1,03 \pm 0,22$  kat olarak hesaplanmıştır. P-gP'nin 3., 6. ve 24. saat gen ifadesi seviyelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir. Bu artışlar sırasıyla 3. saatin sonunda  $2,52 \pm 0,15$  kat, 6. saatin sonunda  $3 \pm 0,07$  kat ve 24. saatin sonunda kontrole göre  $7,15 \pm 0,07$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.51.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak P-gP/ MDR1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

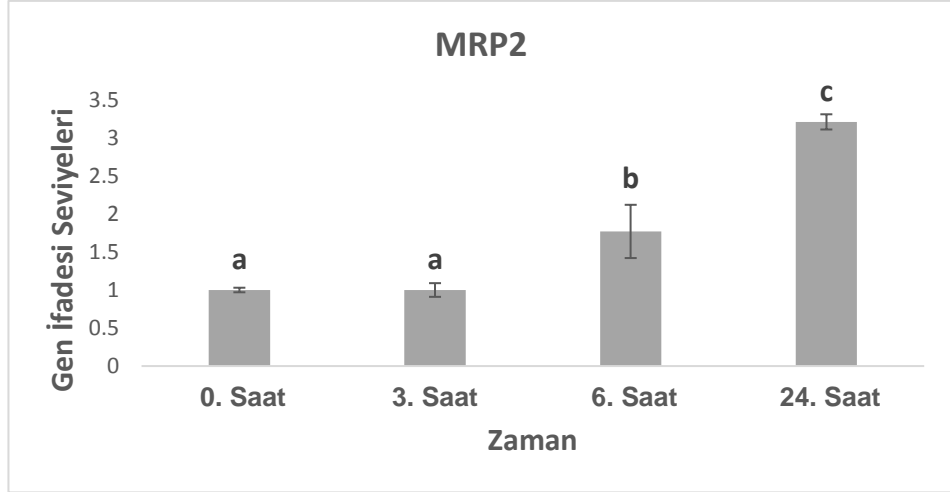


MRP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.52.'de gösterilmiştir. MRP1'in gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar 6. ve 24. saatlerde (sırası ile kontrole göre  $1,19\pm 0,35$  kat ve  $1,33\pm 0,02$  kat artış) belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



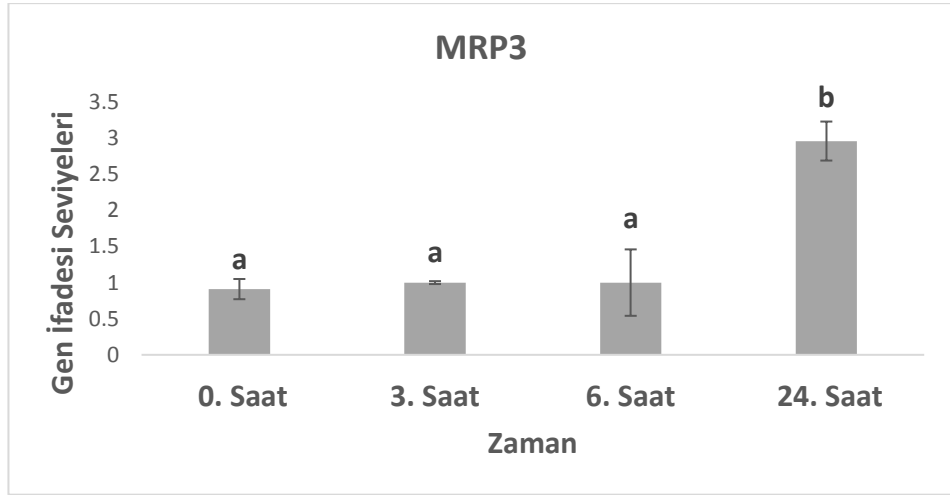
**Şekil 4.52.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MRP2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.53.'te gösterilmiştir. MRP2'nin gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışların 6. saat sonunda  $1,77\pm 0,35$  kat ve 24 saatin sonunda  $3,22\pm 0,1$  kat olduğu belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.53.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

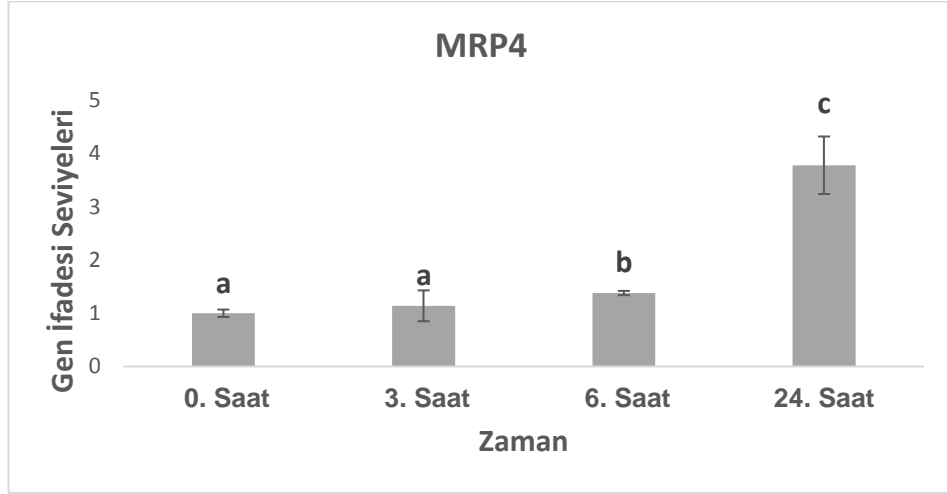
MRP3'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.54.'te gösterilmiştir. MRP3'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışın 24. saatin sonunda kontrole göre  $2,96 \pm 0,27$  kat olduğu belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.54.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

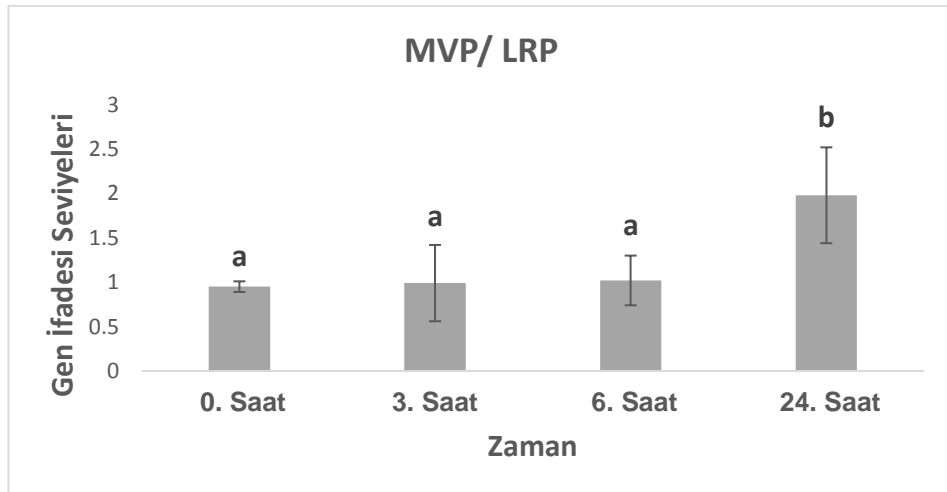
MRP4'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.55.'te gösterilmiştir. MRP4'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı

artışların 6. saatin sonunda kontrole göre  $1,38 \pm 0,04$  kat, 24. saatin sonunda kontrole göre  $3,78 \pm 0,54$  kat olduğu belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.55.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

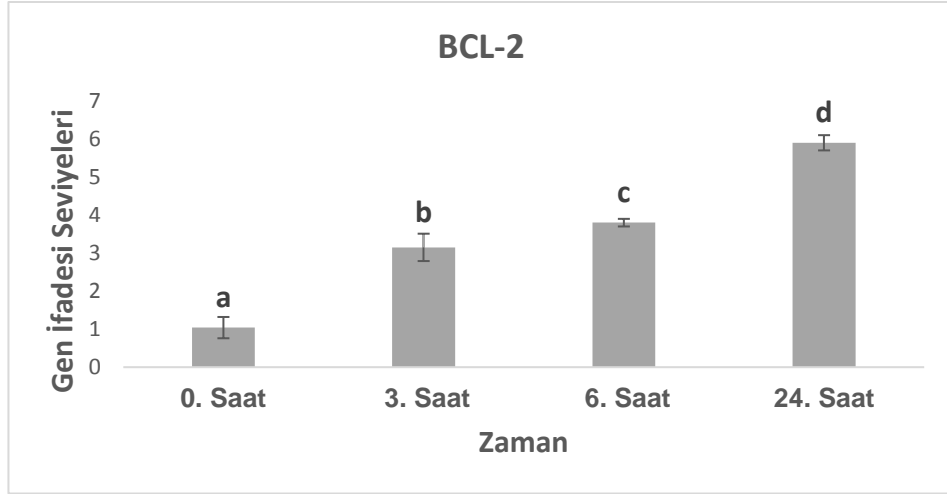
MVP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.56.'da gösterilmiştir. MVP/ LRP'nin kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışın 24. saat sonunda  $1,98 \pm 0,54$  kat olduğu belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.56.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### 4.3.2.2. BCL-2 Onkogeninin İfadesi

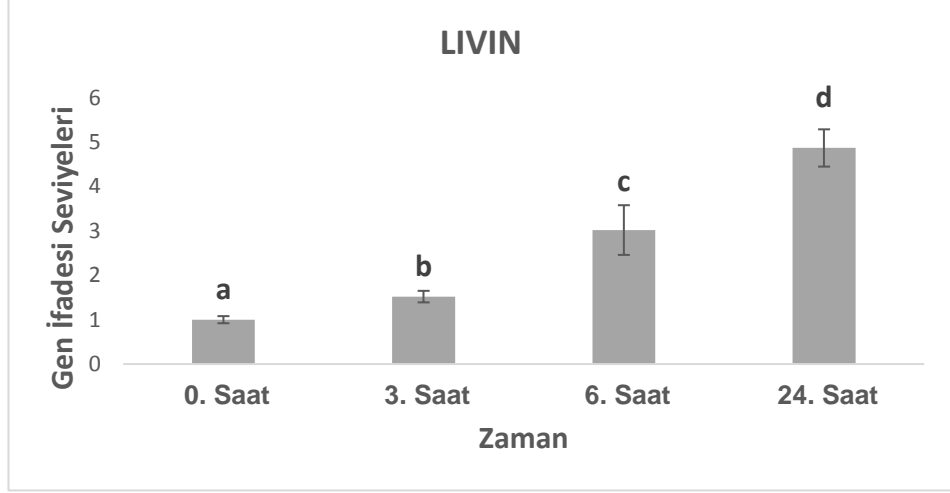
BCL-2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.57.'de gösterilmiştir. BCL-2'nin kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $3,15\pm 0,36$  kat, 6. saatin sonunda  $3,8\pm 0,1$  kat ve 24. saatin sonunda  $5,9\pm 0,2$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



Şekil 4.57. Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

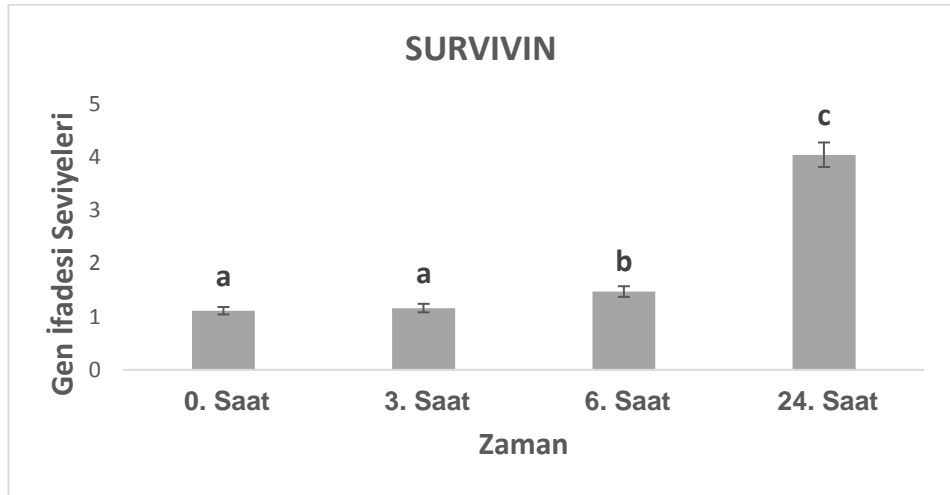
#### 4.3.2.10. Sağ Kalım Genlerinin İfadeleri

Livin'in gen ifadesi seviyelerindeki değişimler Şekil 4.58.'de gösterilmiştir. Livin'nin kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $1,52\pm 0,13$  kat, 6. Saatin sonunda  $3,02\pm 0,56$  kat ve 24. Saatin sonunda  $4,87\pm 0,42$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.58.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak LIVIN geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

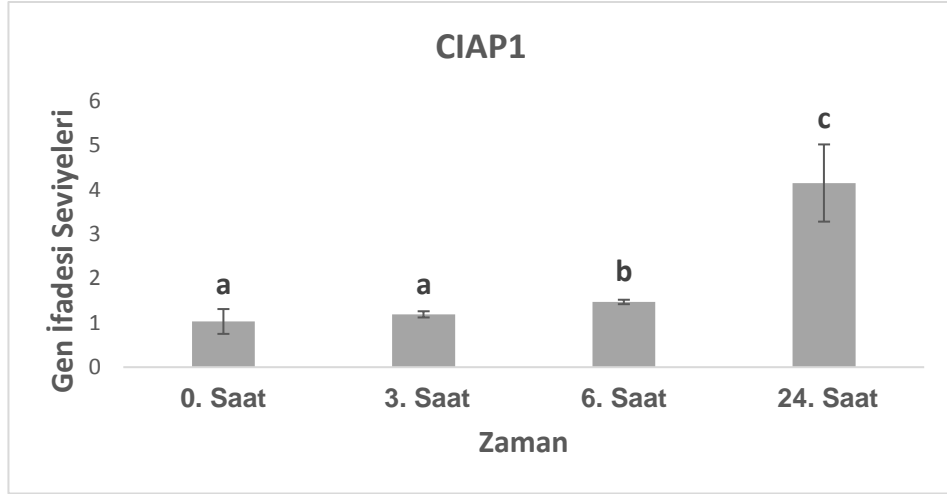
Survivin'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.59.'da gösterilmiştir. Survivin'nin kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 6. saatin sonunda  $1,47 \pm 0,1$  kat ve 24. saatin sonunda  $4,04 \pm 0,23$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.59.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak Survivin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

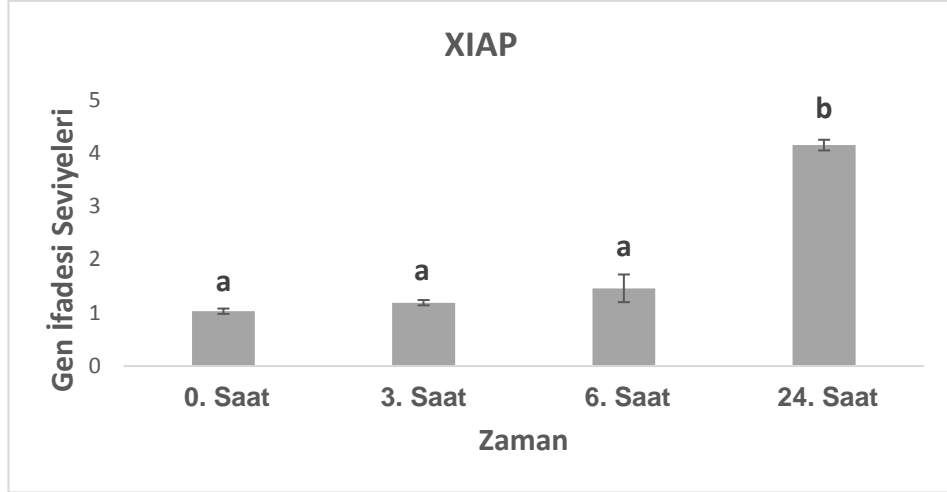
#### 4.3.2.11. Apoptoz İnhibitör Genlerinin İfadeleri

CIAP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.60.'ta gösterilmiştir.CIAP1'in kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 6. saatin sonunda  $1,47\pm 0,05$  kat ve 24. saatin sonunda  $4,15\pm 0,88$  kat oldukları belirlenmiştir( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.60.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak CIAP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

XIAP'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.61.'de gösterilmiştir. XIAP'in kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışın 24. saatin sonunda  $4,15\pm 0,1$  kat olduğu belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



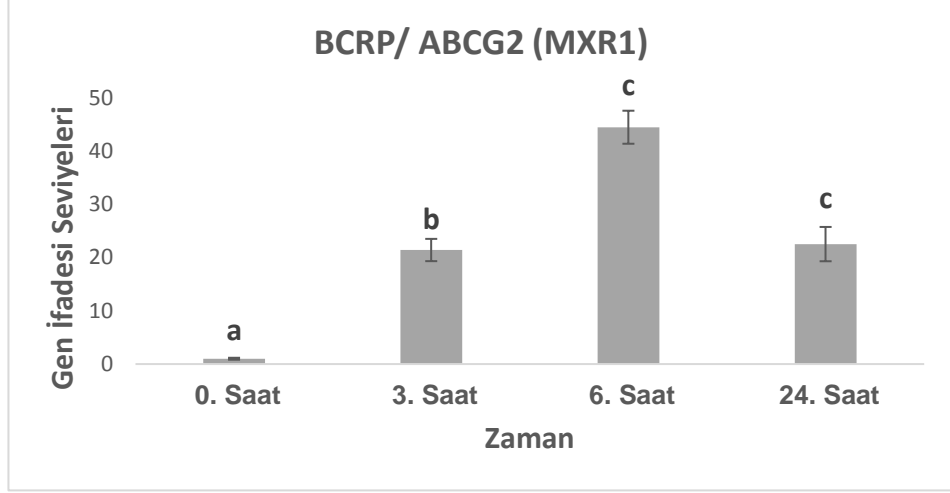
**Şekil 4.61.** Dirençli DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### 4.3.3. Geliştirilen Direncin Kalıcılığının Gen İfadesi Analizleriyle Açıklanması

Dirençsiz DU-145 hücre hattında MDR meydana getirmek için 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı çoklu ilaç direnci genlerinden olan MRP2, MRP3, MRP4 ve MVP/ LRP genlerinin ifade seviyelerinde meydana gelen değişimler gösterilmiştir. Meydana gelen çoklu ilaç direncinin sürekliliğini ispat etmek amacıyla çoklu ilaç direnci oluşturulan DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulaması yapılmamıştır. 5. Pasajın sonunda hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanması neticesinde gen ifadelerindeki değişimler aşağıda gösterilmiştir.

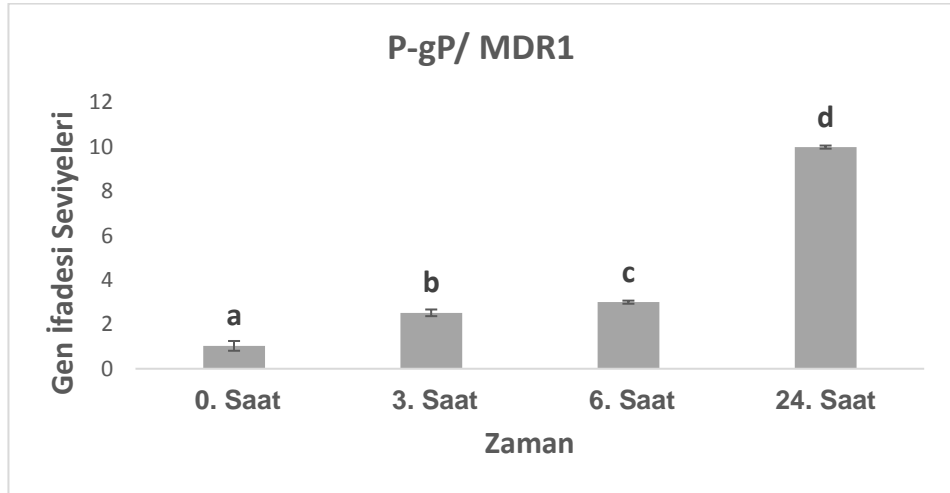
##### 4.3.3.1. Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadeleri

BCRP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.62.'de gösterilmiştir. BCRP/ ABCG2 (MXR1)'in kontrole göre gen ifadesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $21,43 \pm 2,09$  kat, 6. saatin sonunda  $44,48 \pm 3,11$  kat ve 24. saatin sonunda  $22,53 \pm 3,22$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.62.** 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmayan dirençli DU-145 hücre hattına 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

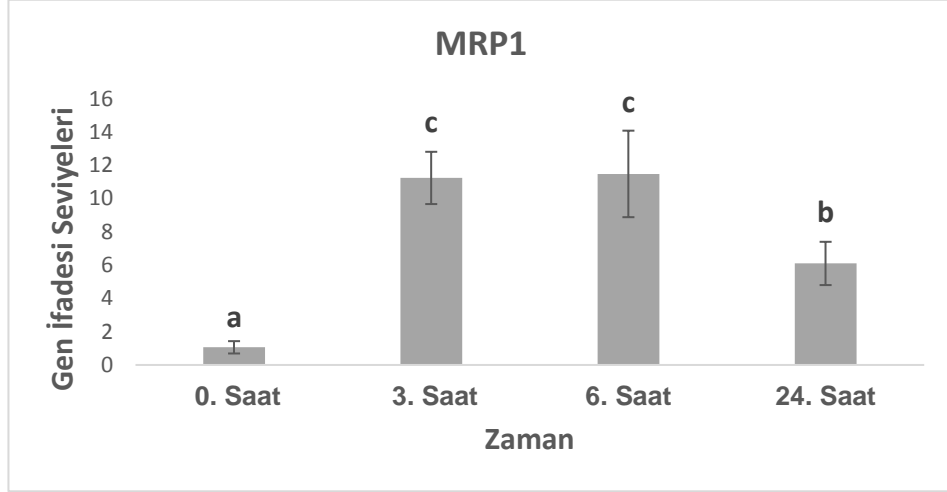
P-gP'nin gen ifadesi seviyesindeki meydana gelen değişimler Şekil 4.63.'te gösterilmiştir. P-gP/ MDR1'in kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $2,52 \pm 0,15$  kat, 6. saatin sonunda  $3 \pm 0,07$  kat ve 24. saatin sonunda  $9,99 \pm 0,07$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.63.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantron birlikte uygulanmasına bağlı olarak P-gP/MDR1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

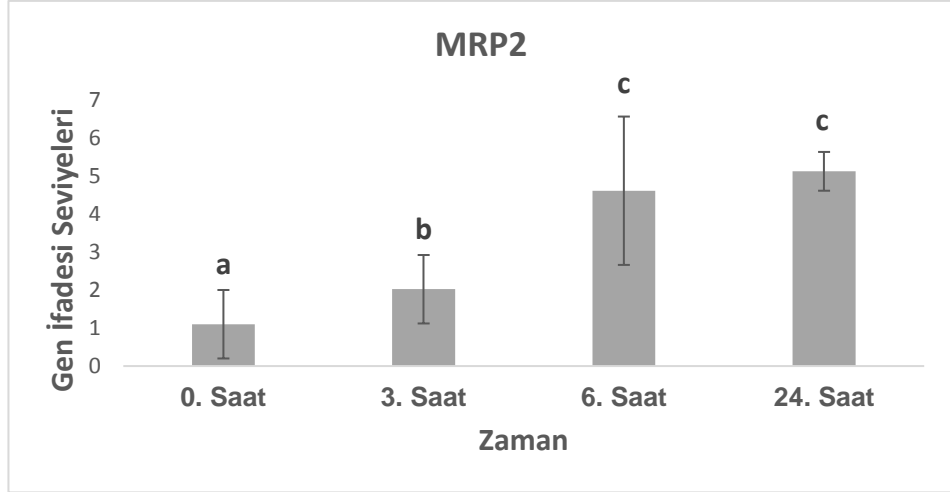


MRP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.64.'te gösterilmiştir. MRP1'in kontrole göre geni ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $11,25 \pm 1,57$  kat, 6. saatin sonunda  $11,48 \pm 2,61$  kat ve 24. saatin sonunda  $6,11 \pm 1,3$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



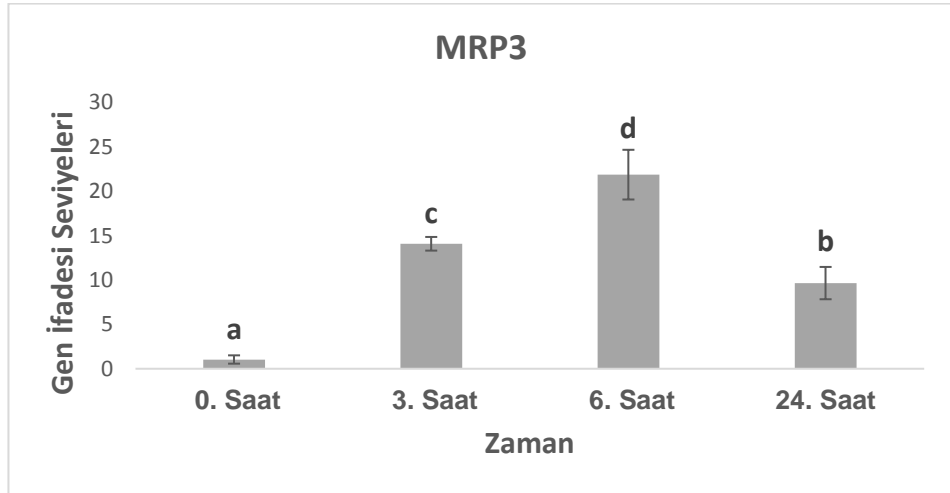
**Şekil 4.64.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MRP2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.65.'te gösterilmiştir. MRP2'nin kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $2,02 \pm 0,9$  kat, 6. saatin sonunda  $4,61 \pm 1,95$  kat ve 24. saatin sonunda  $5,12 \pm 0,52$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



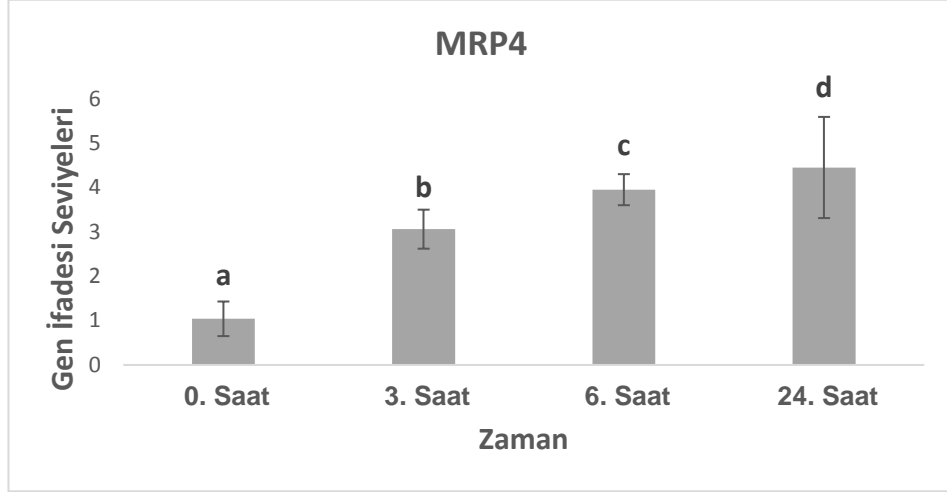
**Şekil 4.65.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MRP3'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.66.'da gösterilmiştir. MRP3'ün kontrole göre gen ifadesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $14,08 \pm 0,77$  kat, 6. saatin sonunda  $21,87 \pm 2,8$  kat ve 24. Saatin sonunda  $9,65 \pm 1,83$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



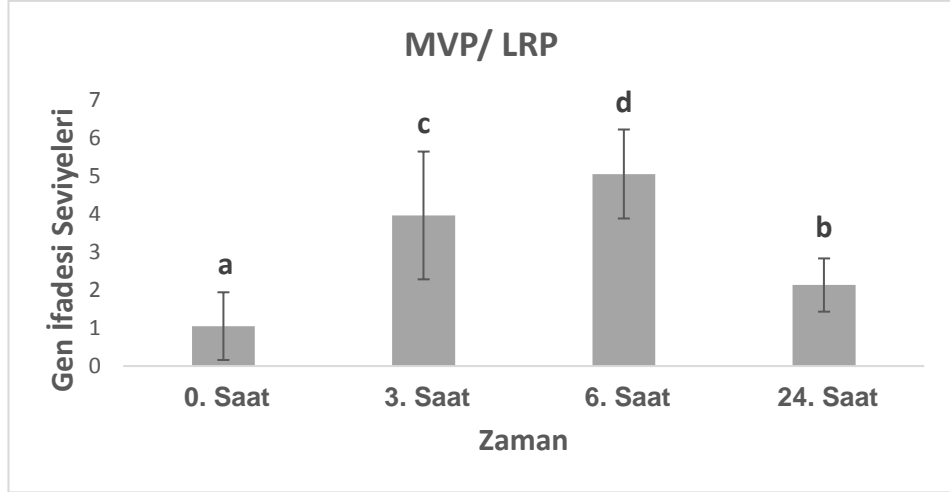
**Şekil 4.66.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MRP4'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.67.'de gösterilmiştir. MRP4'ün kontrole göre gen ifadesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $3,06 \pm 0,44$  kat, 6. saatin sonunda  $3,95 \pm 0,36$  kat ve 24. saatin sonunda  $4,45 \pm 1,14$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.67.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak MRP4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

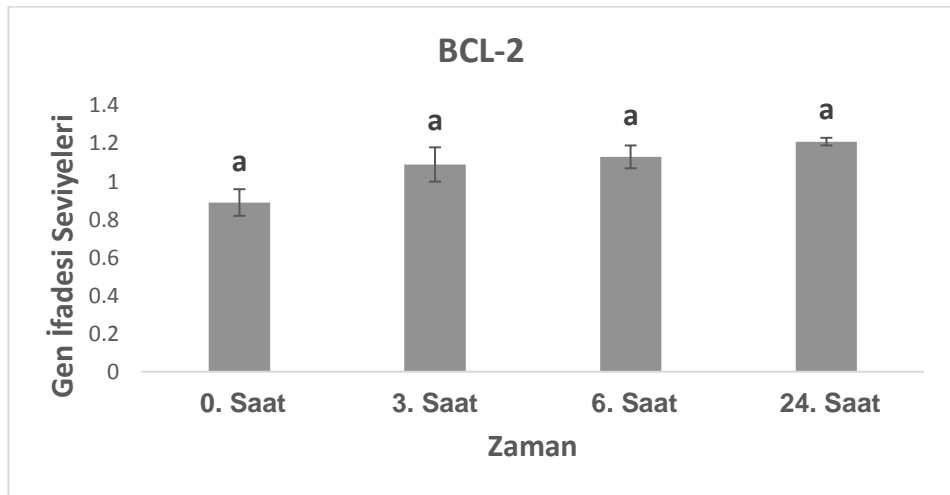
MVP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.68.'de gösterilmiştir. MVP/ LRP'nin kontrole göre gen ifadesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $3,96 \pm 1,68$  kat, 6. saatin sonunda  $5,05 \pm 1,17$  kat ve 24. saatin sonunda  $2,13 \pm 0,71$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.68.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### 4.3.3.9. BCL-2 Onkogeninin İfadesi

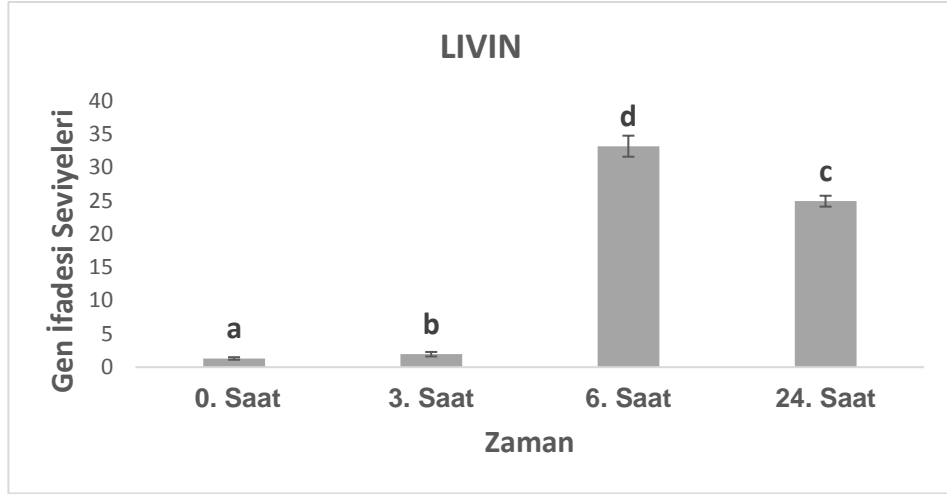
BCL-2'nin gen ifadesi meydana gelen değişimler Şekil 4.69'da gösterilmiştir. BCL-2'nin kontrole göre gen ifadesinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı artış meydana gelmemiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.69.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

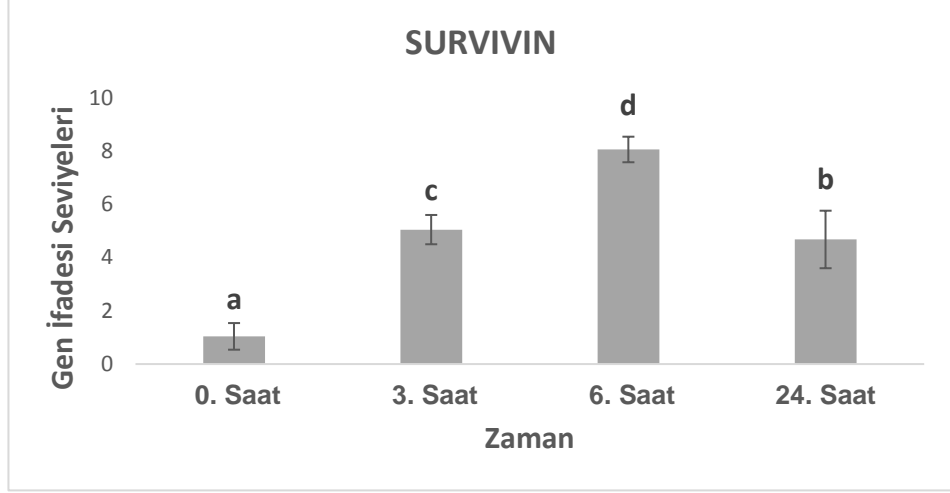
#### 4.3.3.10. Sağ Kalım Genlerinin İfadeleri

Livin'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.70.'te gösterilmiştir. Livin'nin kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $1,95 \pm 0,34$  kat, 6. saatin sonunda  $33,2 \pm 1,58$  kat ve 24. saatin sonunda  $24,94 \pm 0,82$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



Şekil 4.70. Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak Livin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

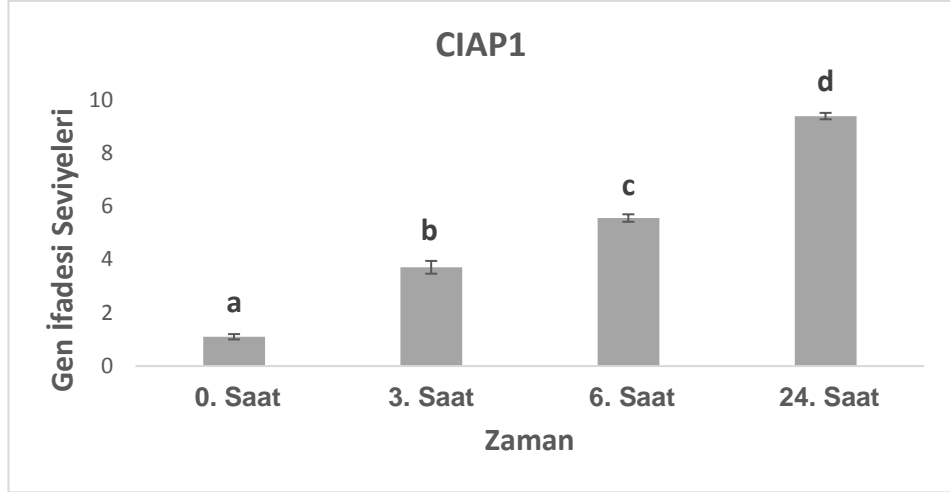
Survivin'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.71.'de gösterilmiştir. SURVIVIN'in kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $5,05 \pm 0,55$  kat, 6. saatin sonunda  $8,06 \pm 0,48$  kat ve 24. saatin sonunda  $4,68 \pm 1,08$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.71.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak Survivin geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

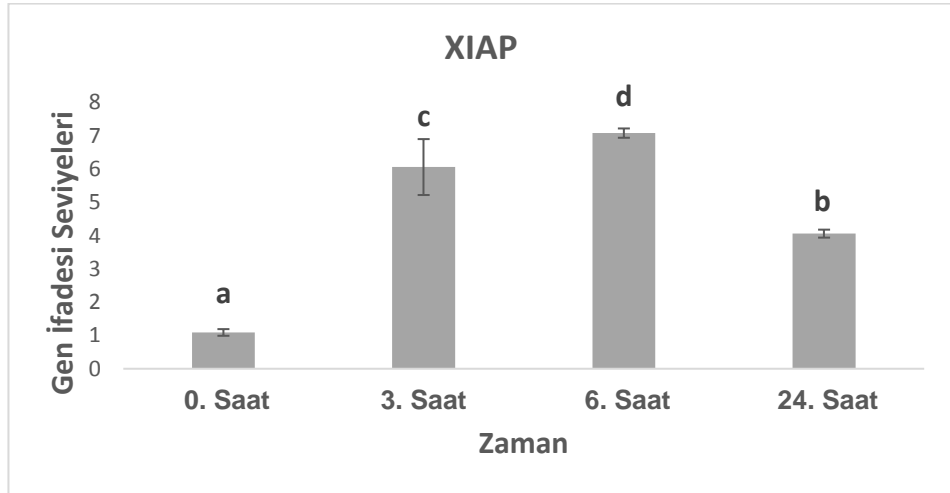
#### **4.3.3.11. Apoptoz İnhibitör Genlerinin İfadeleri**

CIAP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.72.'de gösterilmiştir. CIAP1'in kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $3,72 \pm 0,24$  kat, 6. Saatin sonunda  $5,56 \pm 0,14$  kat ve 24. saatin sonunda  $9,39 \pm 0,18$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.72.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasına bağlı olarak CIAP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

XIAP'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.73.'te gösterilmiştir. XIAP'ın kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 3. saatin sonunda  $6,06 \pm 0,84$  kat, 6. saatin sonunda  $7,08 \pm 0,15$  kat ve 24. saatin sonunda  $4,06 \pm 0,12$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.73.** Dirençli DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı olarak XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

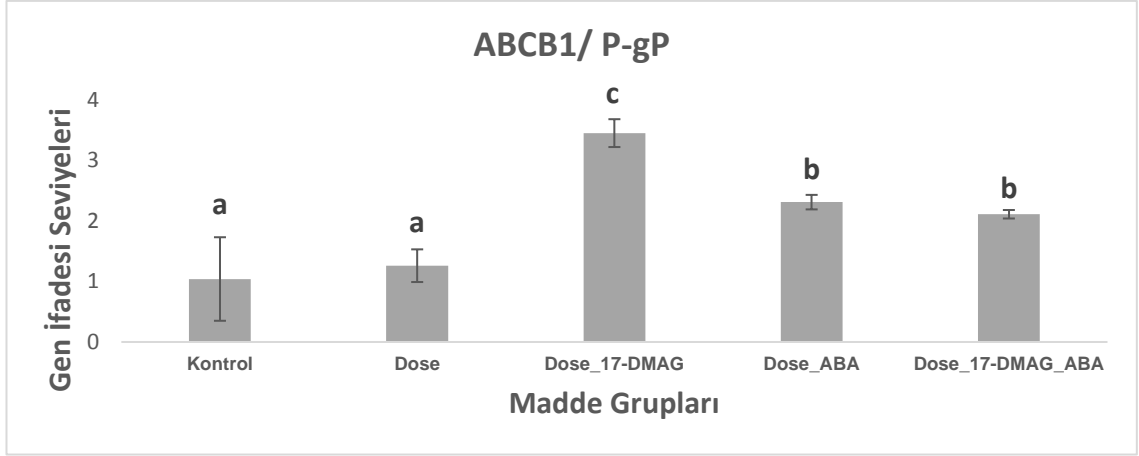
#### **4.3.4. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hattlarına Doseksel, Absisik Asit ve 17-DMAG Uygulanmasına Bağlı Gen İfadelerinde Meydana Gelen Değişimlerin Karşılaştırılması**

Dirençsiz DU-145 hücre hattına doseksel ve mitoksantronun IC50 değerinin 5 pasaj uygulanması neticesinde çoklu ilaç direnci oluşturulduğu ve bu direncin madde uygulaması kesildikten sonra da devam ettiği hem MTT analizleriyle hemde gerçek zamanlı PZR aracılığı ile gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücreleri üzerinde; 48 saatlik uygulamaya bağlı 17-DMAG'ın etkin dozu 35 nM, dosekselin 50 nM ve ABA'nın 500 µM olduğu MTT analizleri sonucunda gösterilmiştir. Bu üç maddenin hem dirençsiz hemde dirençli DU-145 hücre hatları üzerindeki etkilerini karşılaştırabilmek için maddeler ayrı ayrı ve birlikte bu hücre hatlarına uygulanarak gerçek zamanlı PZR analizleri yapılmıştır. Gerçek zamanlı PZR analizlerinde dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerinde meydana gelen; çoklu ilaç direnci genleri, endoplazmik retikulum stres genleri, antioksidan sistem genleri, tamir mekanizması sistemi genleri, ısı şoku ailesi (moleküler şaperonlar) genleri, ölüm sinyal yolları genleri ve sağ kalım genlerinin gen ifadesindeki miktarsal değişimler karşılaştırılmıştır.

##### **4.3.4.1. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Çoklu İlaç Direnci Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması**

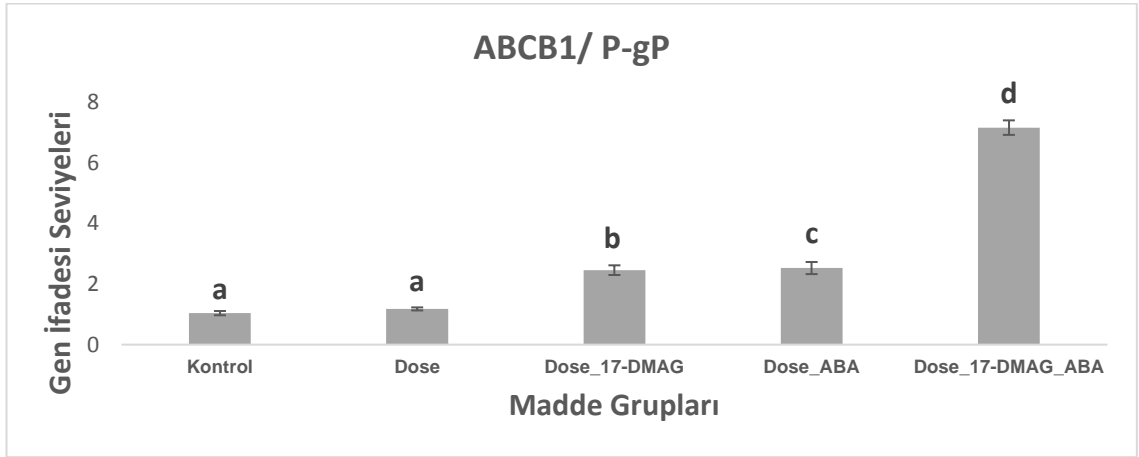
ABCB1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.74.'te gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM doseksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $3,45 \pm 0,23$  kat, 50 nM doseksel ile 500 µM ABA için  $2,31 \pm 0,12$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,11 \pm 0,07$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).





**Şekil 4.74.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCB1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

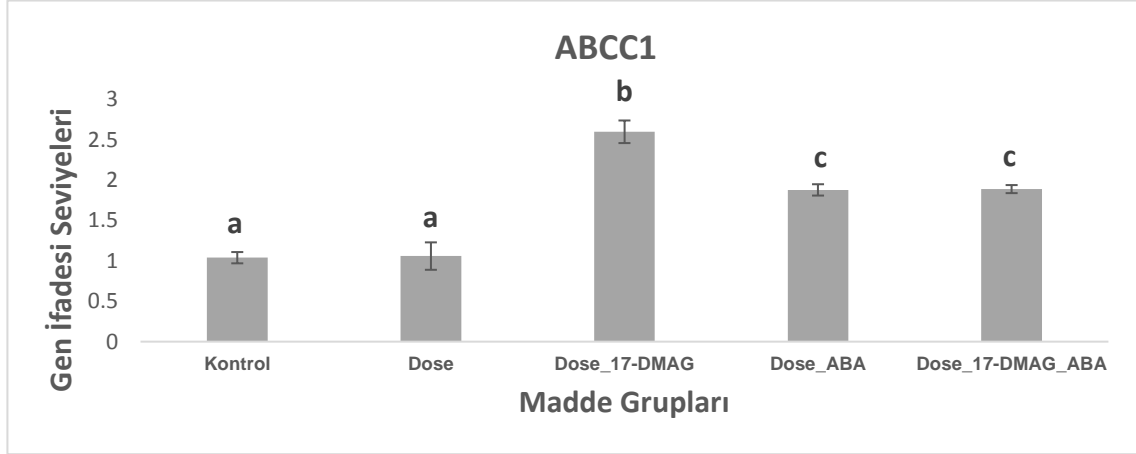
ABCB1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.75.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,46 \pm 0,16$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,53 \pm 0,2$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $7,17 \pm 0,24$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.75.** Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCB1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

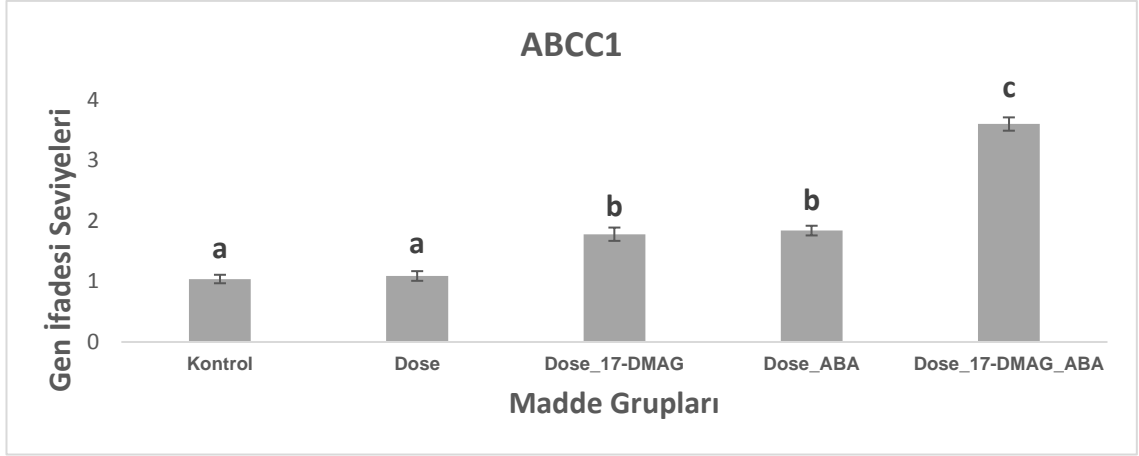
ABCC1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.76.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana

gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,6\pm0,14$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,88\pm0,07$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,89\pm0,05$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).



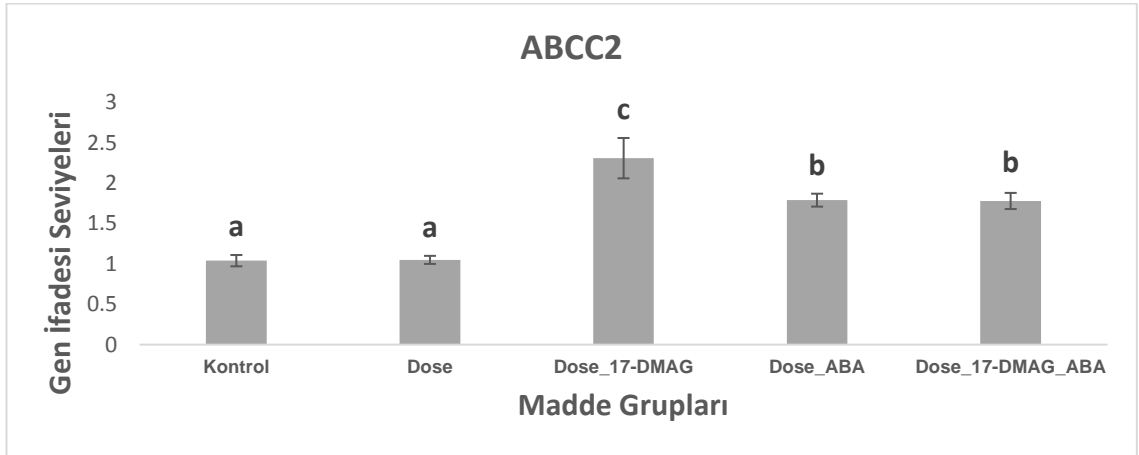
**Şekil 4.76.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

ABCC1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.77.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,78\pm0,11$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,84\pm0,08$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $3,6\pm0,11$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).



**Şekil 4.77.** Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

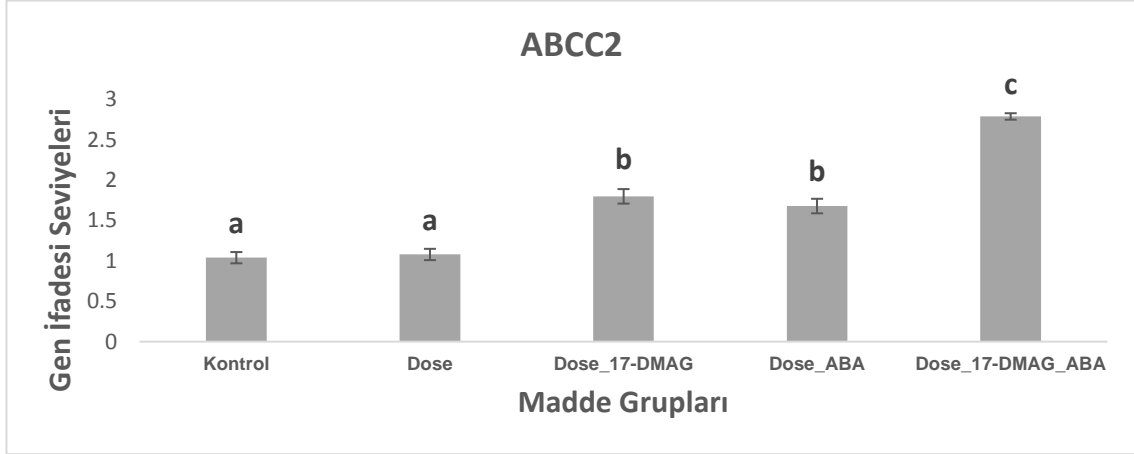
ABCC2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.78.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,31 \pm 0,25$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,79 \pm 0,08$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,78 \pm 0,1$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.78.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

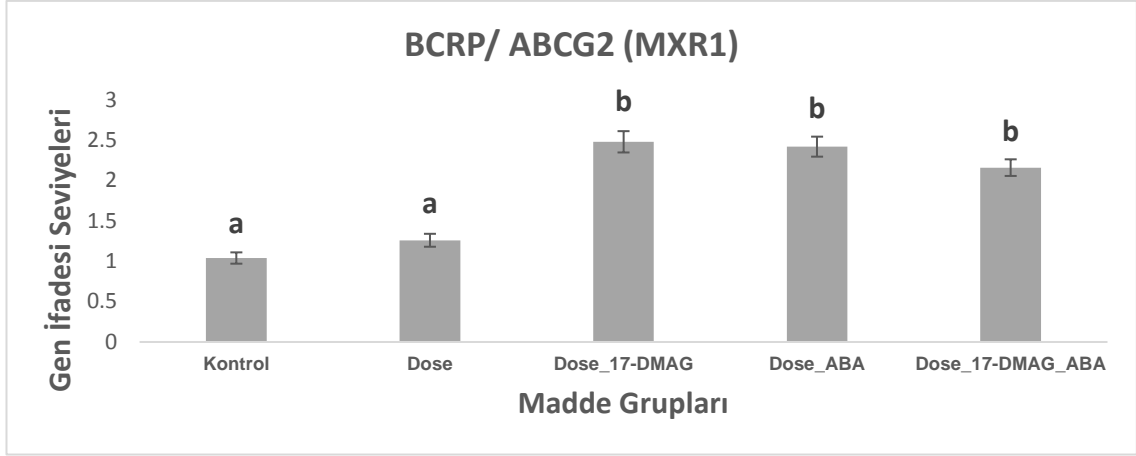
ABCC2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.79.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde

meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,8\pm 0,09$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,68\pm 0,09$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,79\pm 0,04$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



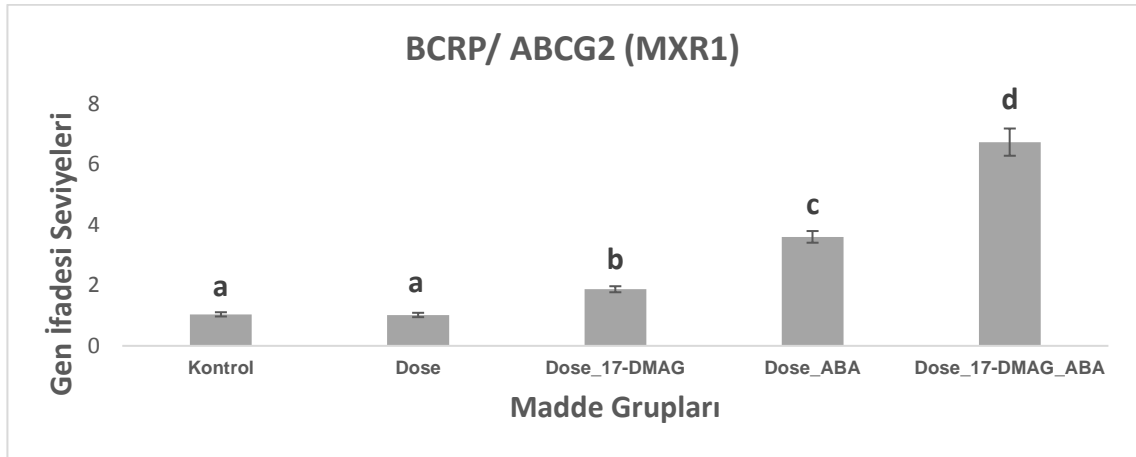
**Şekil 4.79.** Dirençli DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ABCC2 ifadesinde meydana gelen değişimler.

BCRP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.80.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,48\pm 0,13$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,42\pm 0,12$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,16\pm 0,1$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



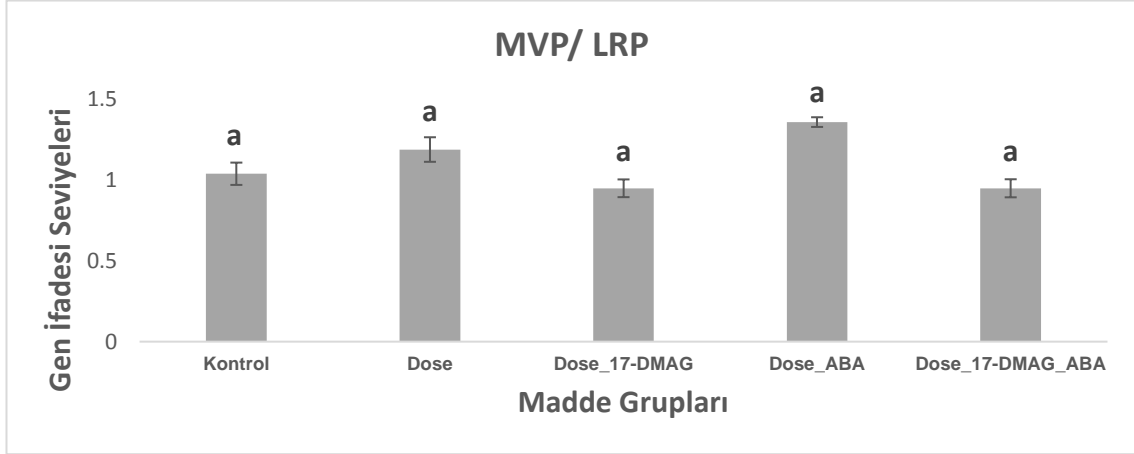
**Şekil 4.80.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

BCRP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.81.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,87 \pm 0,1$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $3,6 \pm 0,14$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $6,73 \pm 0,45$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



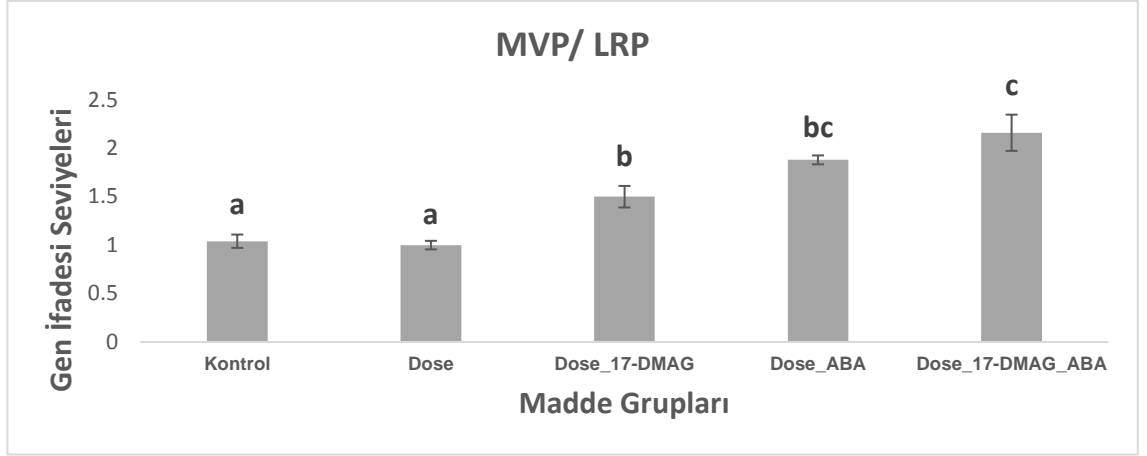
**Şekil 4.81.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MVP'nin gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.82.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir artış meydana gelmemiştir ( $P \leq 0,05$ ).



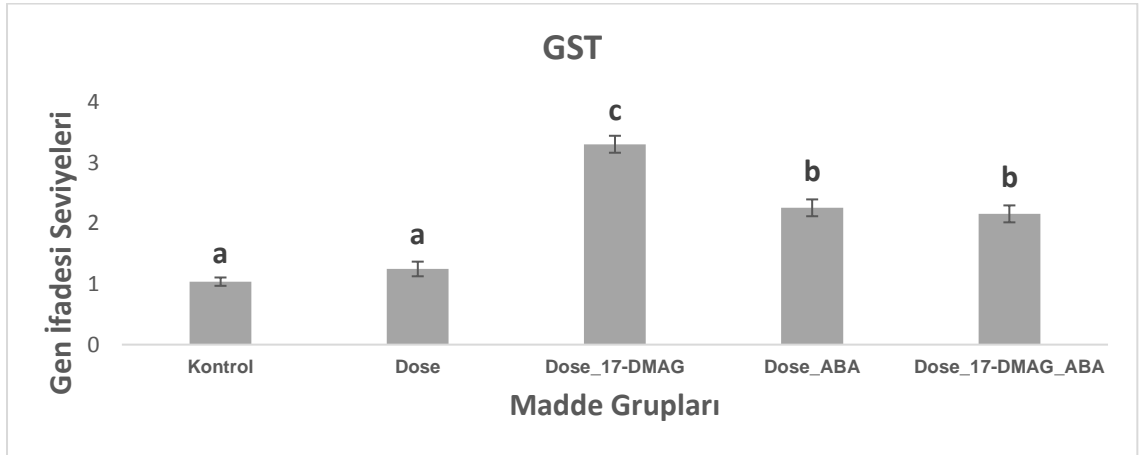
**Şekil 4.82.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı MVP/ LRP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

MVP'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.83.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,5 \pm 0,11$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,88 \pm 0,05$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,16 \pm 0,2$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.83.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BCRP/ ABCG2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

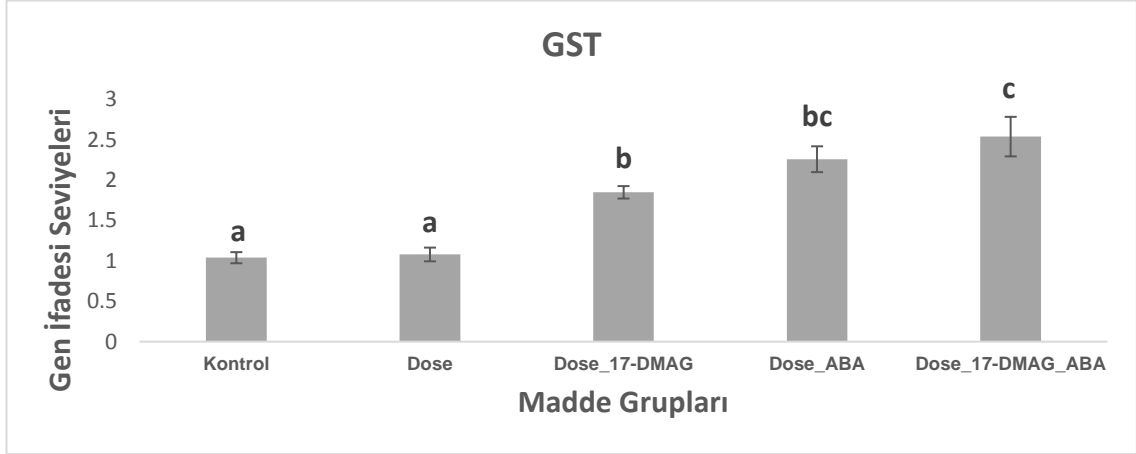
GST'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.84.'te gösterilmiştir. Dirençsiz DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $3,31 \pm 0,14$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,26 \pm 0,16$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,16 \pm 0,19$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.84.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı GST geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

GST'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.85.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde

meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,85 \pm 0,08$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,26 \pm 0,2$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,54 \pm 0,25$  kat olarak hesaplanmıştır ( $P \leq 0,05$ ).

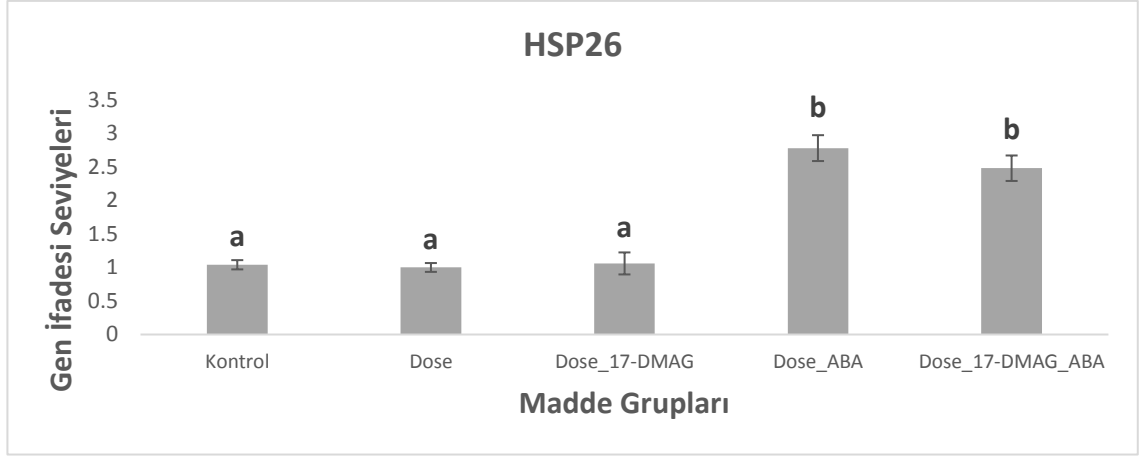


**Şekil 4.85.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı GST geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### **4.3.4.2. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Isı Şoku Ailesi Proteini Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması**

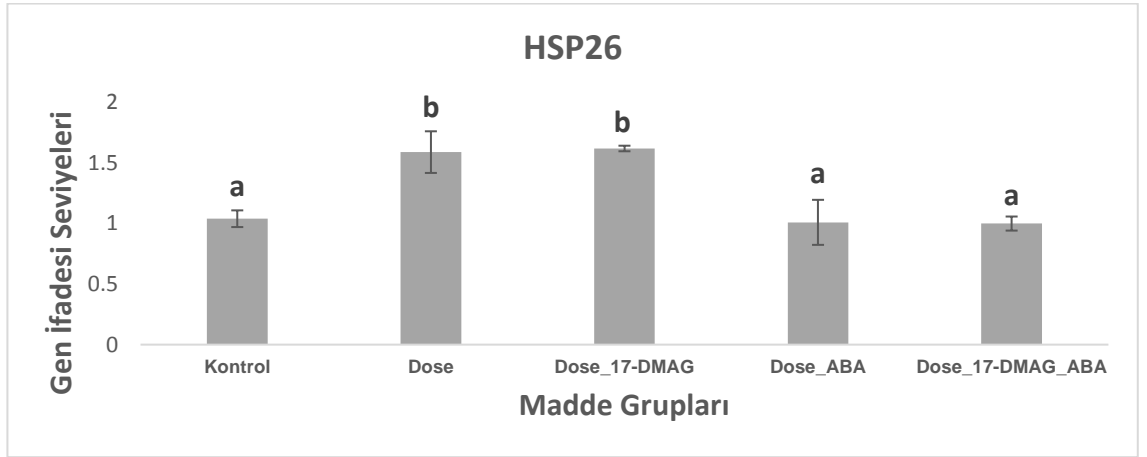
HSP26'nın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.86.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,78 \pm 0,19$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,48 \pm 0,19$  kat olarak belirenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).





**Şekil 4.86.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP26 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

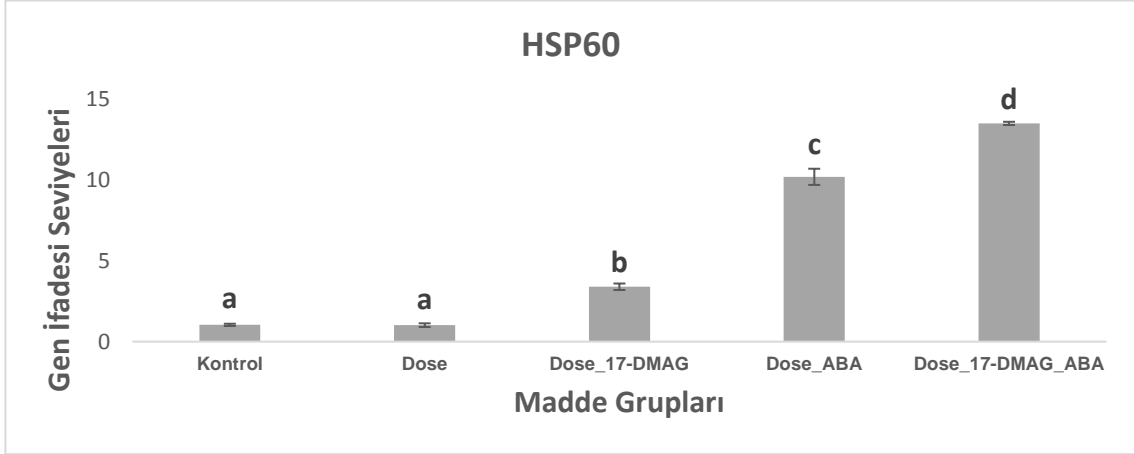
HSP26'nın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.87.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel uygulaması için  $1,59 \pm 0,17$  kat, 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $1,62 \pm 0,02$  kat oldukları belirlenmiştir. ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.87.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP26 ifadesindeki değişimler.

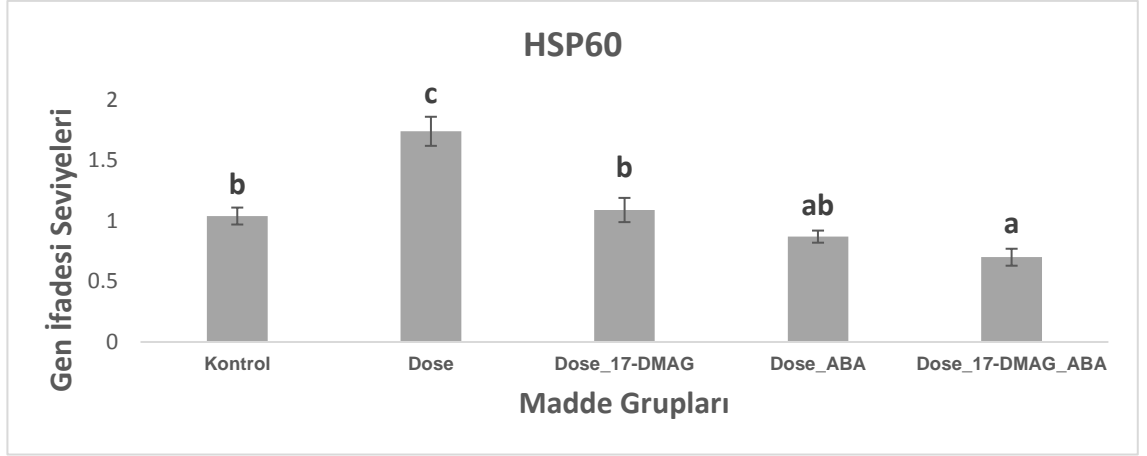
HSP60'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.88.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana

gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $3,39 \pm 0,2$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $10,21 \pm 0,5$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $13,52 \pm 0,1$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



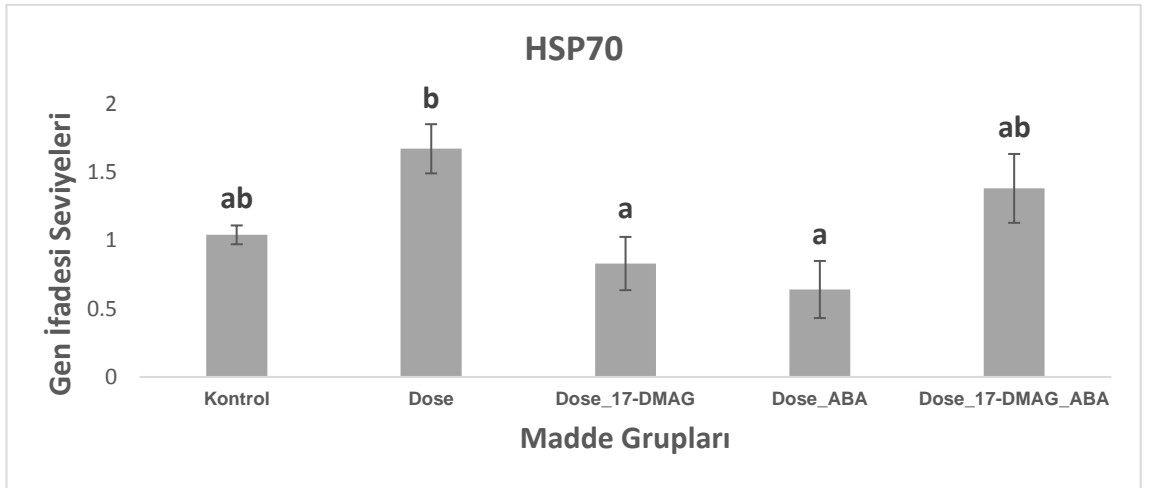
**Şekil 4.88.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP60 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

HSP60'ın kontrol ve dosetaksel uygulamasına göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.89.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışın 50 nM dosetaksel uygulaması için  $1,74 \pm 0,12$  kat olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $0,87 \pm 0,05$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $0,7 \pm 0,07$  kat istatistiksel olarak anlamlı azalmalar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



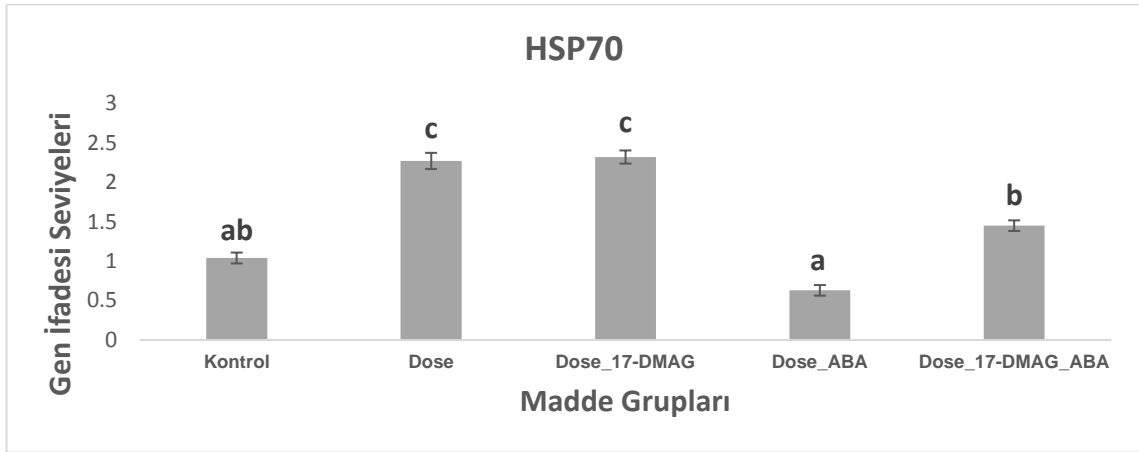
**Şekil 4.89.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP60 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

HSP70'in gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.90.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışın 50 nM dosetaksel uygulaması için  $1,67 \pm 0,18$  kat olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $0,83 \pm 0,2$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $0,64 \pm 0,21$  kat istatistiksel olarak anlamlı azalma belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



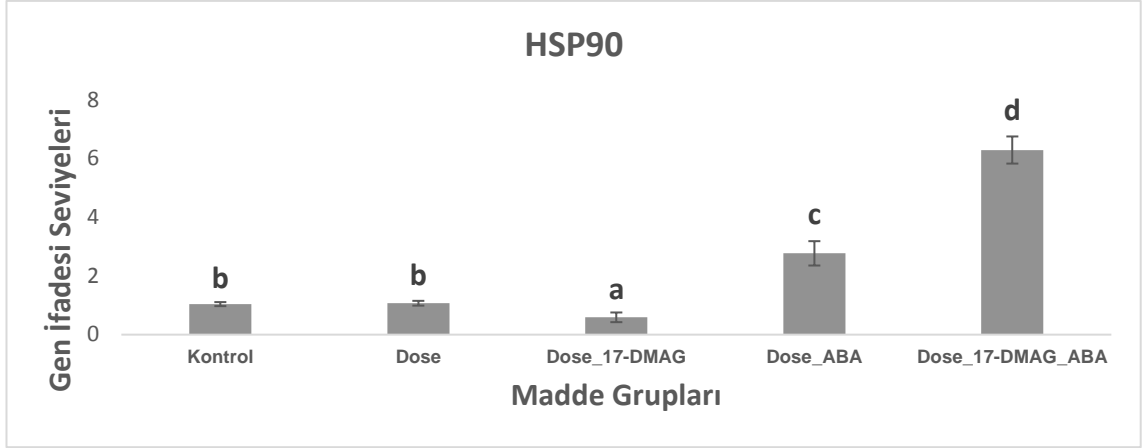
**Şekil 4.90.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP70 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

HSP70'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.91.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatikselsel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel uygulaması için  $2,27\pm 0,1$  kat, 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $2,32\pm 0,08$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,45\pm 0,07$  kat oldukları belirtilmiştir. Buna karşılık 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulaması için kontrole göre  $0,63\pm 0,07$  kat istatikselsel olarak anlamlı azalma belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



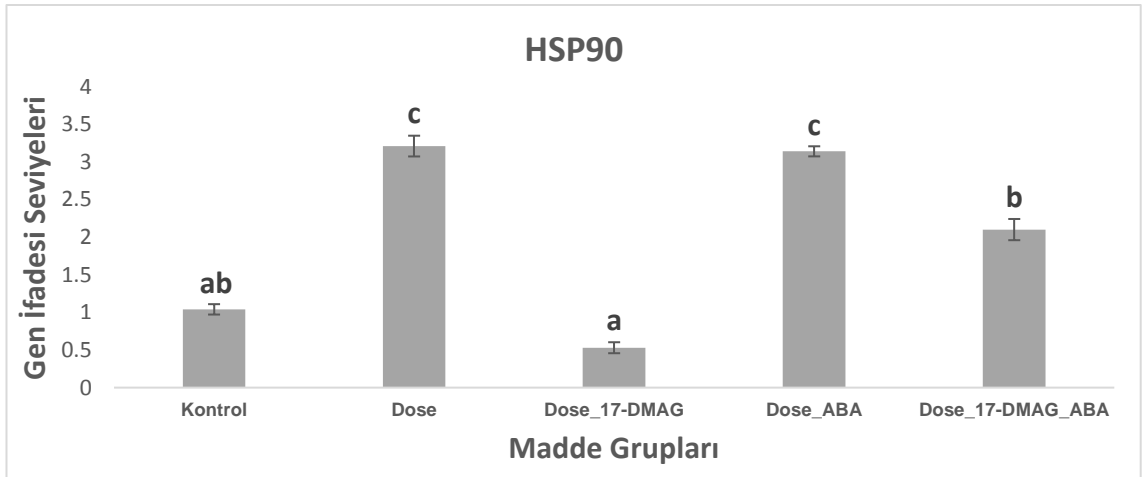
**Şekil 4.91.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP70 ifadesindeki değişimler.

HSP90'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.92.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için kontrole göre  $0,59\pm 0,17$  kat istatikselsel olarak anlamlı azalma belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulaması için  $2,77\pm 0,42$  kat ve üç maddenin birlikte uygulanması için  $6,29\pm 0,46$  kat istatikselsel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



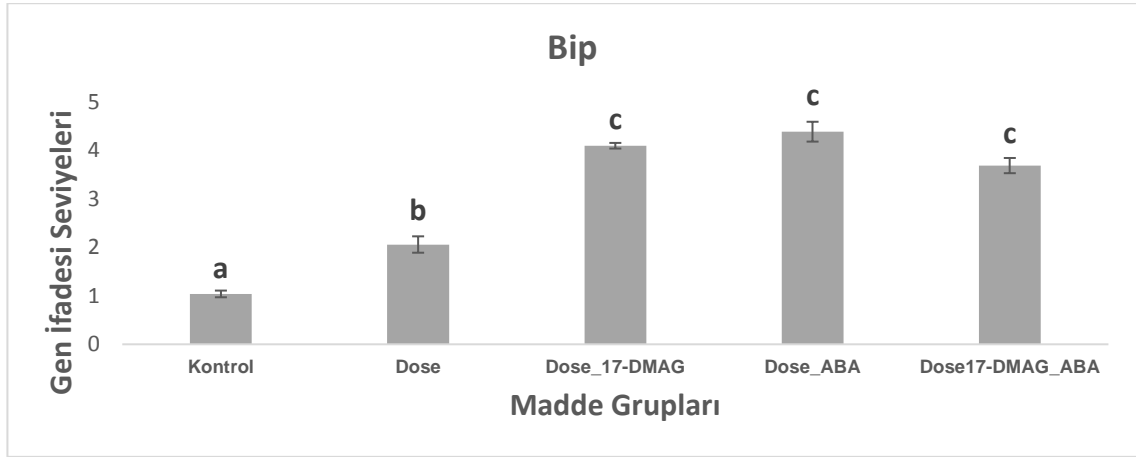
**Şekil 4.92.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı HSP90 ifadesindeki değişimler.

HSP90'ın gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.93.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel uygulaması için  $3,2 \pm 0,14$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $3,14 \pm 0,07$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,1 \pm 0,14$  kat oldukları belirlenmiştir. Buna karşılık 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması kontrole göre için  $0,53 \pm 0,07$  kat istatistiksel olarak anlamlı azalma belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



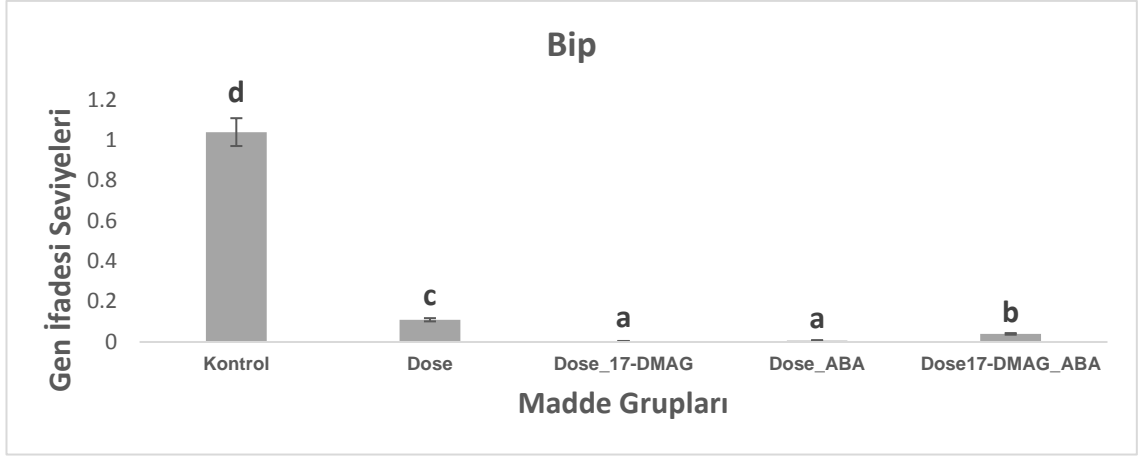
**Şekil 4.93.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı HSP90 ifadesinde meydana gelen değişimler.

Bip'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.94.'te gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel uygulaması için  $2,06\pm 0,17$  kat, 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $4,1\pm 0,06$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $4,39\pm 0,21$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $3,69\pm 0,16$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



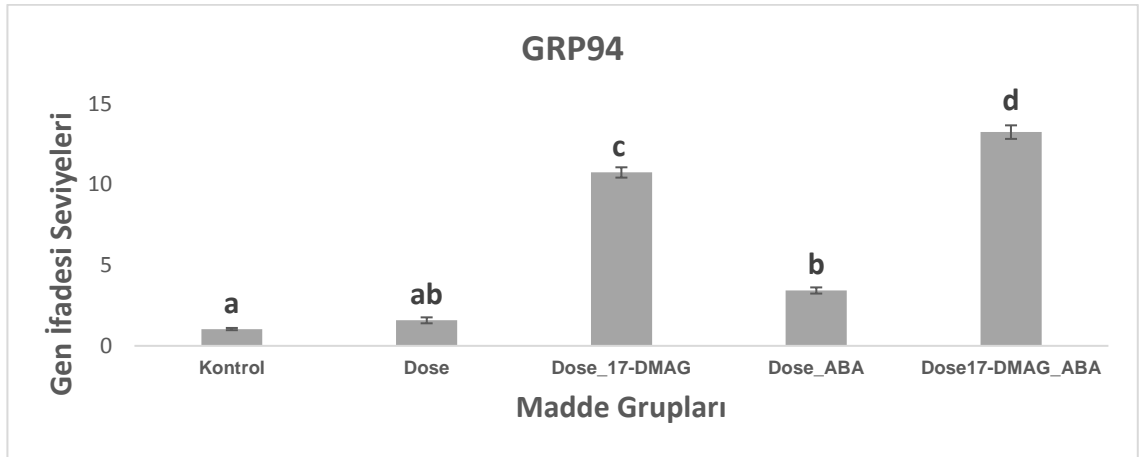
**Şekil 4.94.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Bip geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Bip'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.95.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı azalmaların 50 nM dosetaksel uygulaması için  $0,11\pm 0,008$  kat, 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $0,004\pm 0,001$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $0,007\pm 0,001$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $0,04\pm 0,004$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



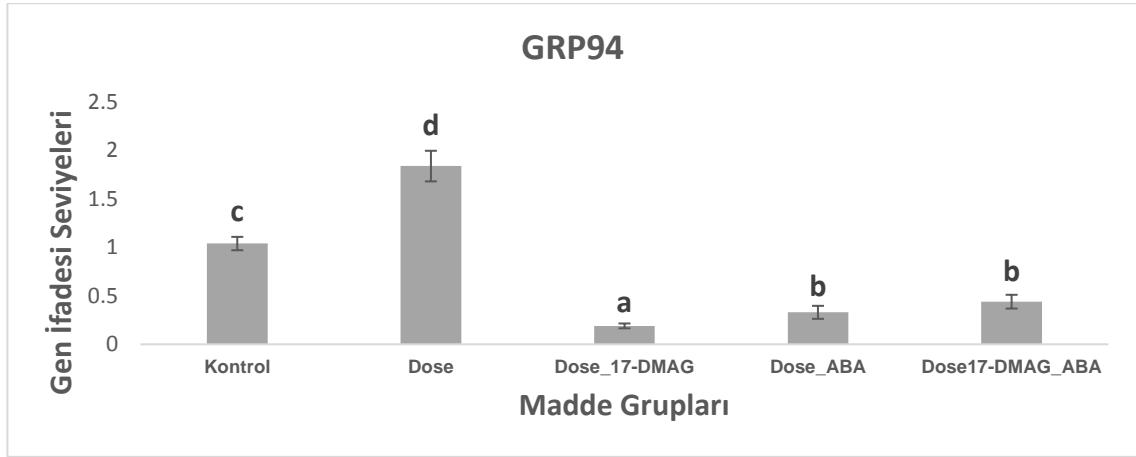
**Şekil 4.95.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Bip geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

GRP94'ün kontrole göre gen ifadesi seviyesindeki anlamlı artışlar Şekil 4.96.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışların 50 nM dosetaksel uygulaması için  $1,58 \pm 0,18$  kat, 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $10,74 \pm 0,32$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $3,43 \pm 0,19$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $13,24 \pm 0,42$  kat oldukları belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.96.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı GRP94 ifadesindeki değişimler.

GRP94'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.97.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel uygulaması sonucunda  $1,84 \pm 0,16$  kat istatikselsel olarak anlamlı artış belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $0,19 \pm 0,03$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $0,33 \pm 0,07$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $0,44 \pm 0,07$  kat istatikselsel olarak anlamlı azalma belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).

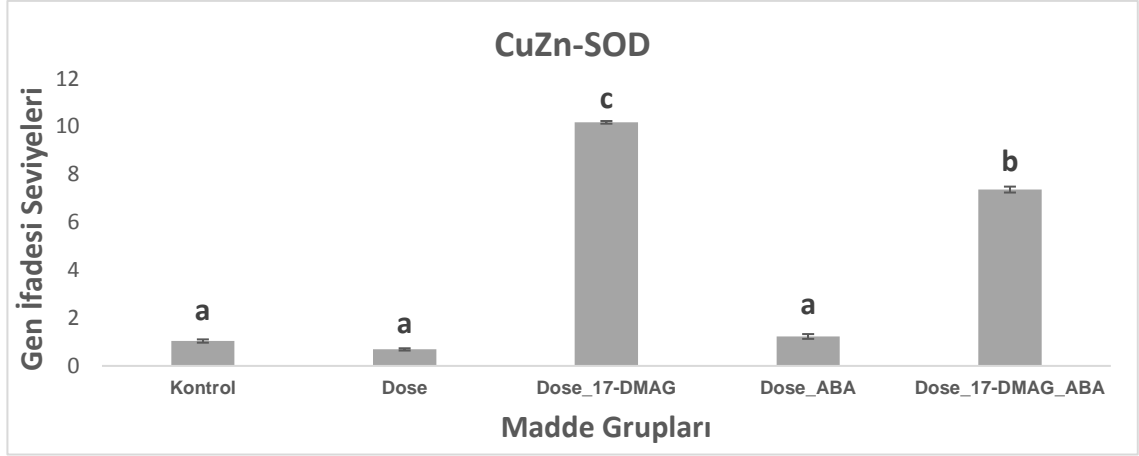


**Şekil 4.97.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı GRP94 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### **4.3.4.3. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Oksidatif Stres Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması**

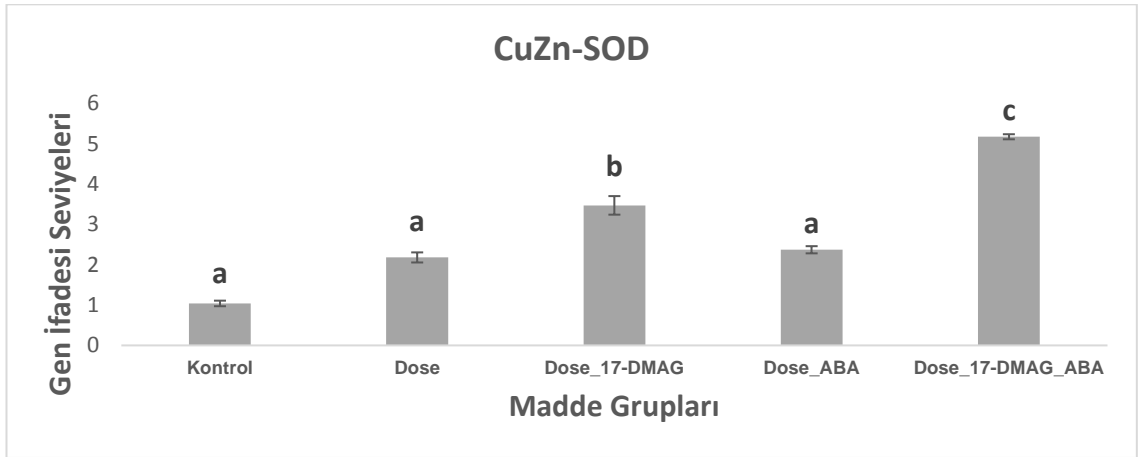
CuZn-SOD'un gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.98.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $10,18 \pm 0,06$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $7,37 \pm 0,12$  kat istatikselsel olarak anlamlı artış belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).





**Şekil 4.98.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı CuZn-SOD geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

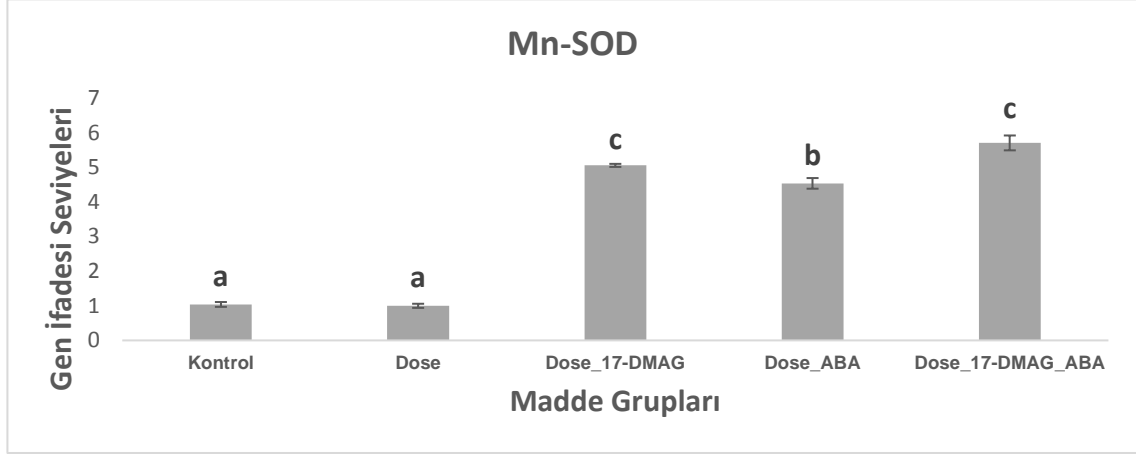
CuZn-SOD'un kontrole göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.99.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $3,47 \pm 0,23$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $5,17 \pm 0,06$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.99.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı CuZn-SOD ifadesindeki değişimler.

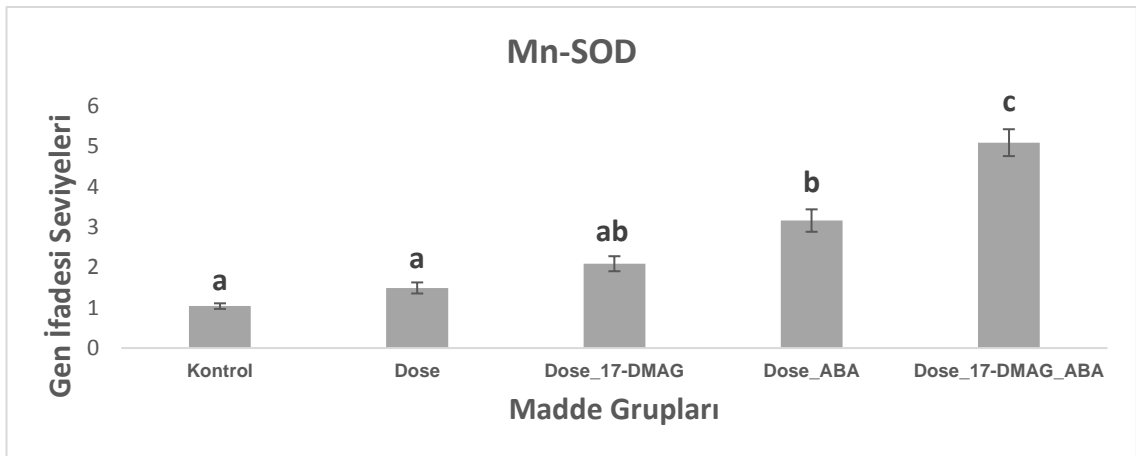
Mn-SOD'un gen ifadesi seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.100.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $5,06 \pm 0,04$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için

4,54±0,15, üç maddenin birlikte uygulanması için 5,71±0,22 kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



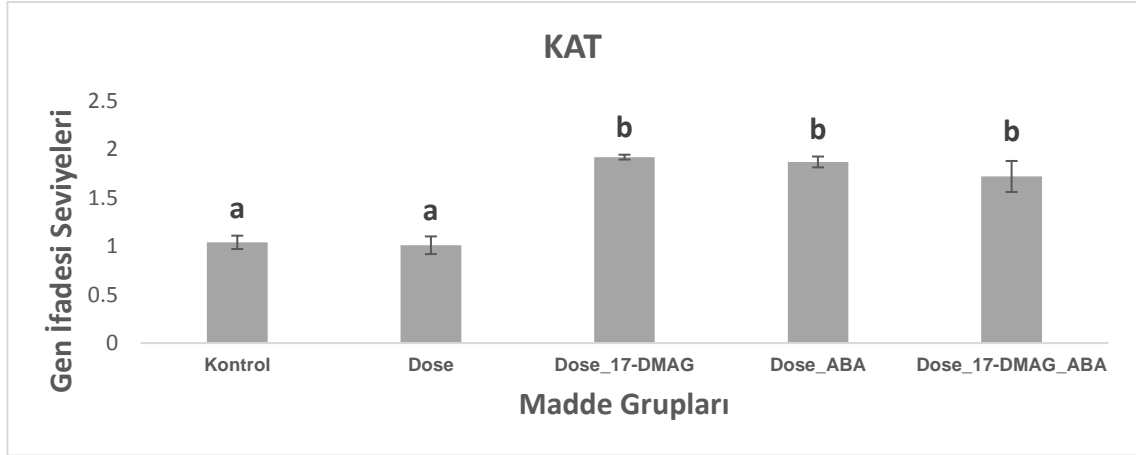
**Şekil 4.100.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Mn-SOD ifadesindeki değişimler.

Mn-SOD'un gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.101.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için 2,09±0,19 kat, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA için 3,16±0,28 kat, üç maddenin birlikte uygulanması için 5,09±0,33 kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



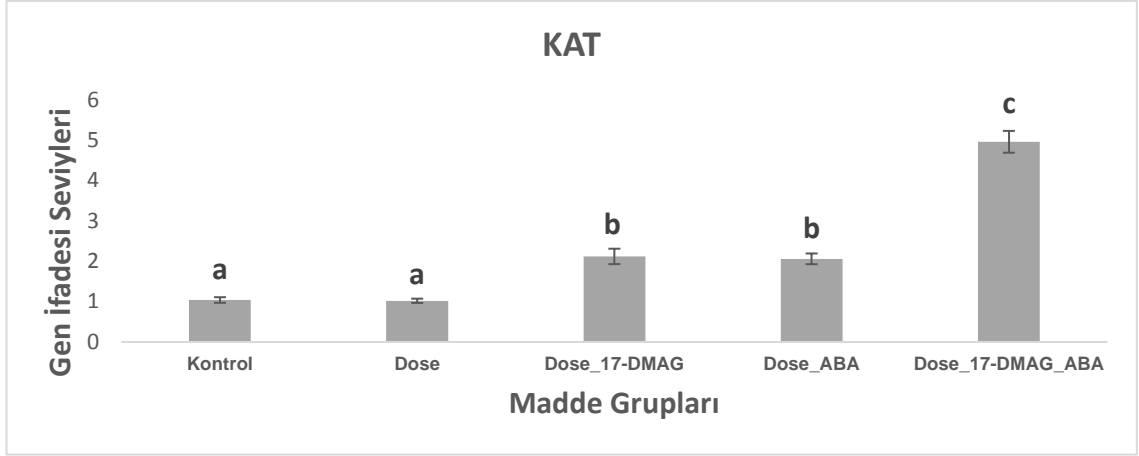
**Şekil 4.101.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Mn-SOD geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

KAT'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.102.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,92\pm0,03$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,87\pm0,06$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,72\pm0,16$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).



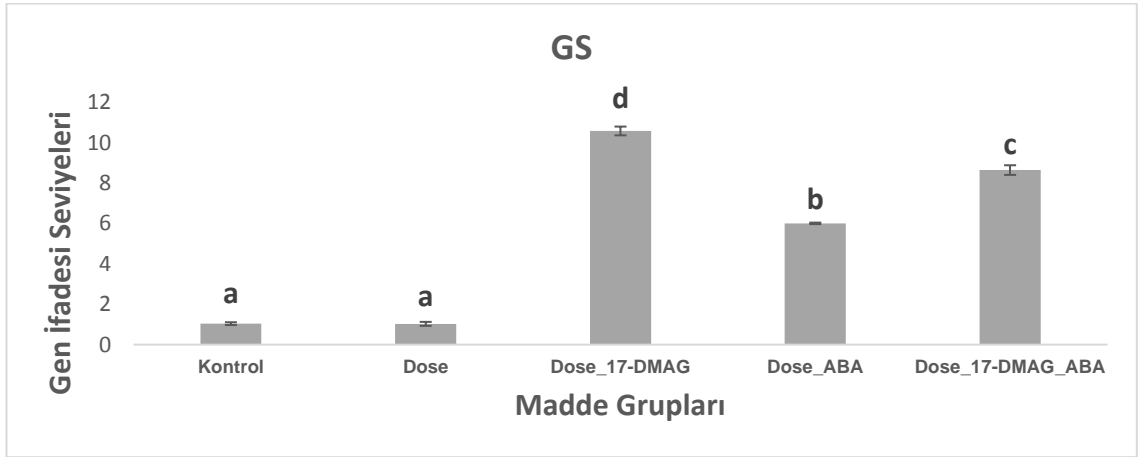
**Şekil 4.102.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı KAT geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

KAT'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.103.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,12\pm0,19$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,06\pm0,13$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $4,96\pm0,27$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).



**Şekil 4.103.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı KAT geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

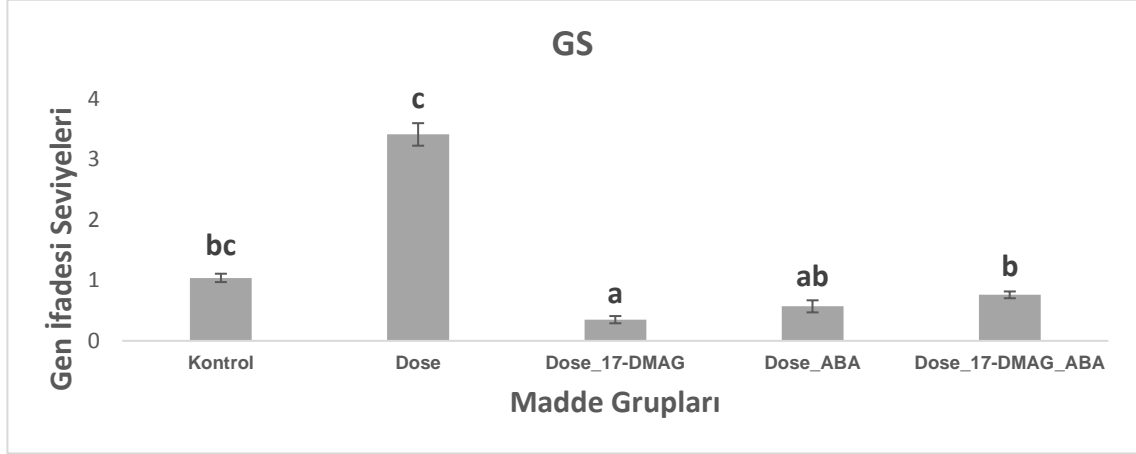
GS'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.104.'te gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $10,59 \pm 0,22$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $6 \pm 0,04$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $8,65 \pm 0,24$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.104.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı GS geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

GS'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.105.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel

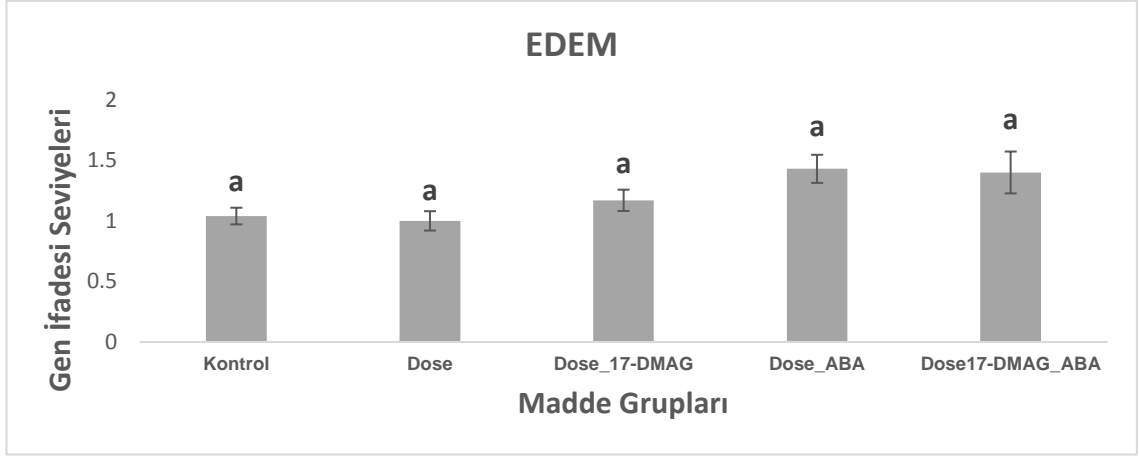
uygulanması için  $3,41 \pm 0,19$  kat istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $0,35 \pm 0,06$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $0,58 \pm 0,1$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $0,76 \pm 0,06$  kat istatistiksel olarak anlamlı azalmalar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.105.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı GS geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

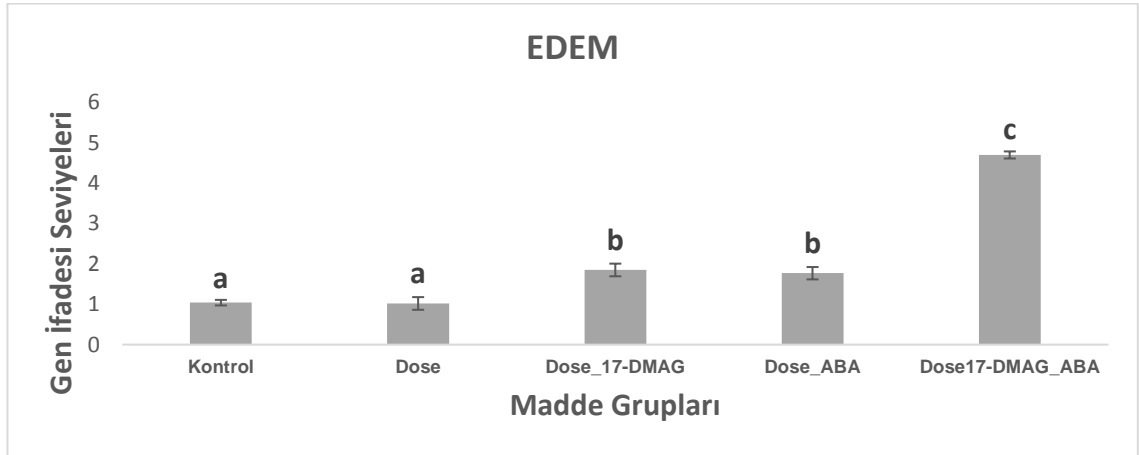
#### 4.3.4.4. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında ER Stresi Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması

EDEM'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.106.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre kontrole göre istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı değişme belirlenmemiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.106.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı EDEM geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

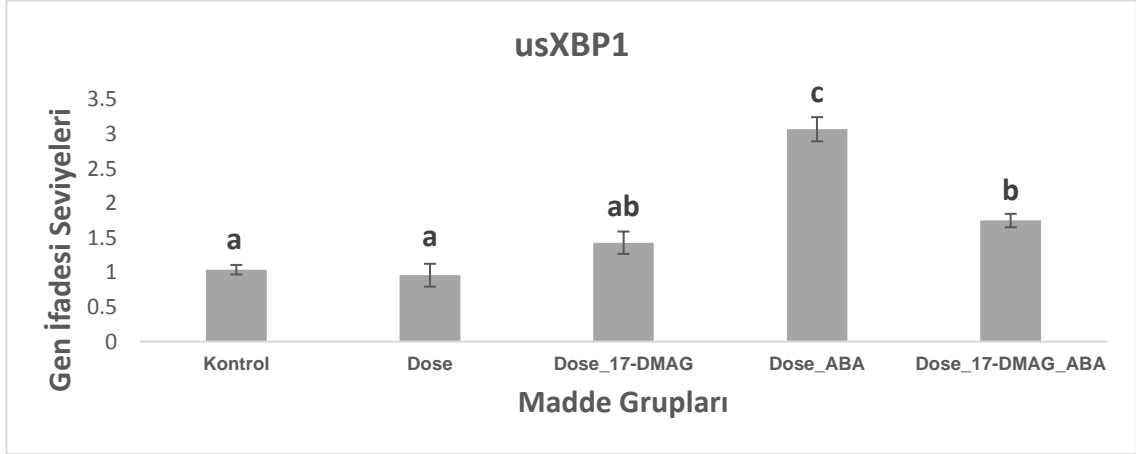
EDEM'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.107.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,85 \pm 0,16$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,77 \pm 0,15$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $4,7 \pm 0,09$  kat istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.107.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı EDEM geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

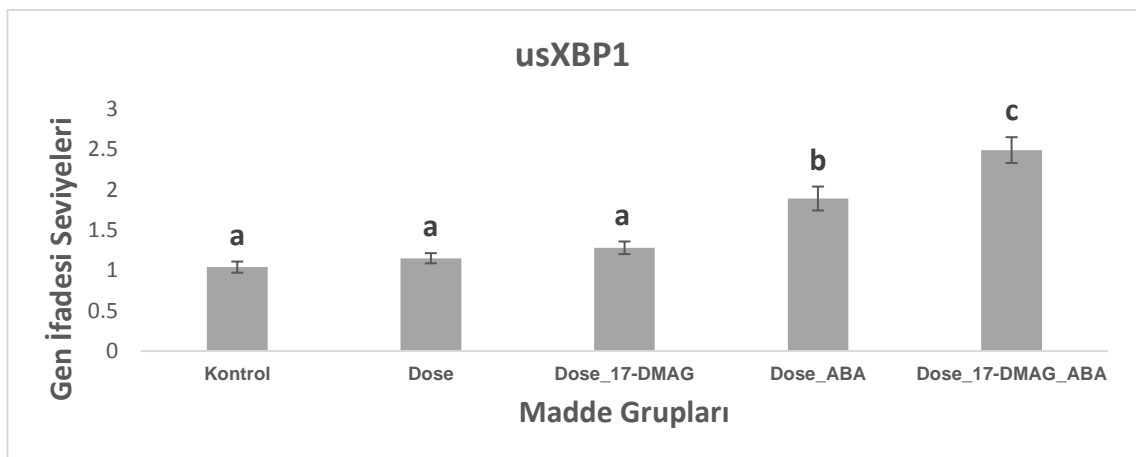
usXBP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.108.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-

DMAG uygulaması için  $1,43 \pm 0,16$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $3,07 \pm 0,18$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,75 \pm 0,1$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



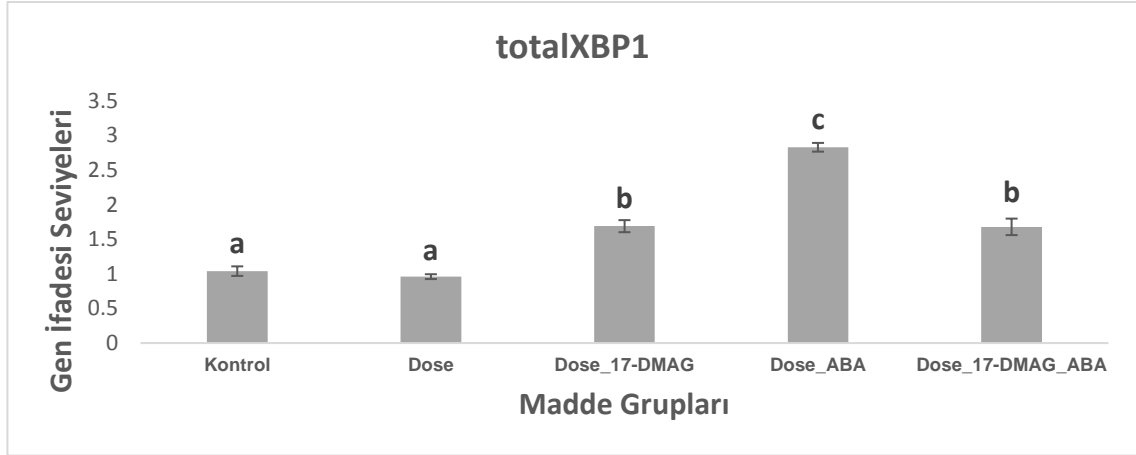
**Şekil 4.108.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı usXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

usXBP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.109.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $1,89 \pm 0,15$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,49 \pm 0,16$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.109.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı usXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

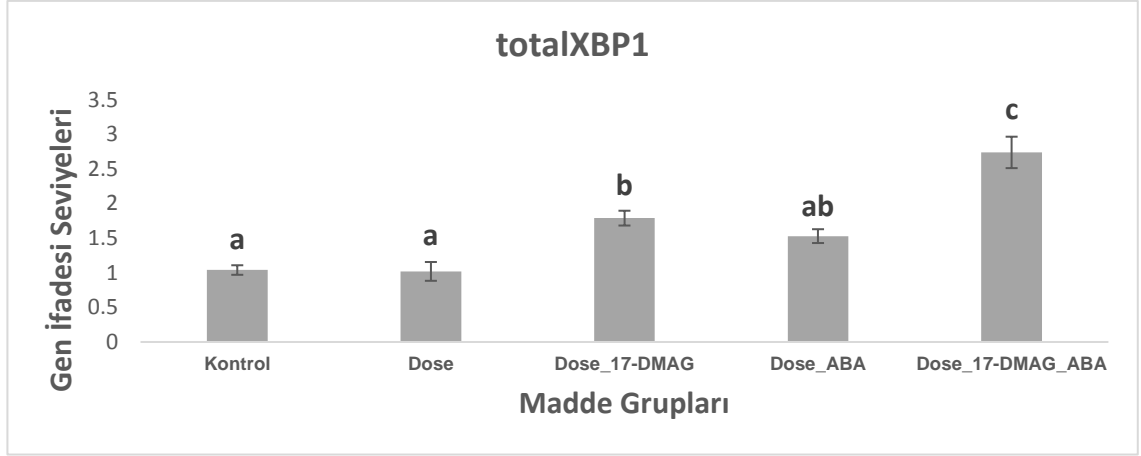
totalXBP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.110.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,69\pm0,09$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,83\pm0,06$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,68\pm0,12$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).



**Şekil 4.110.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı totalXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

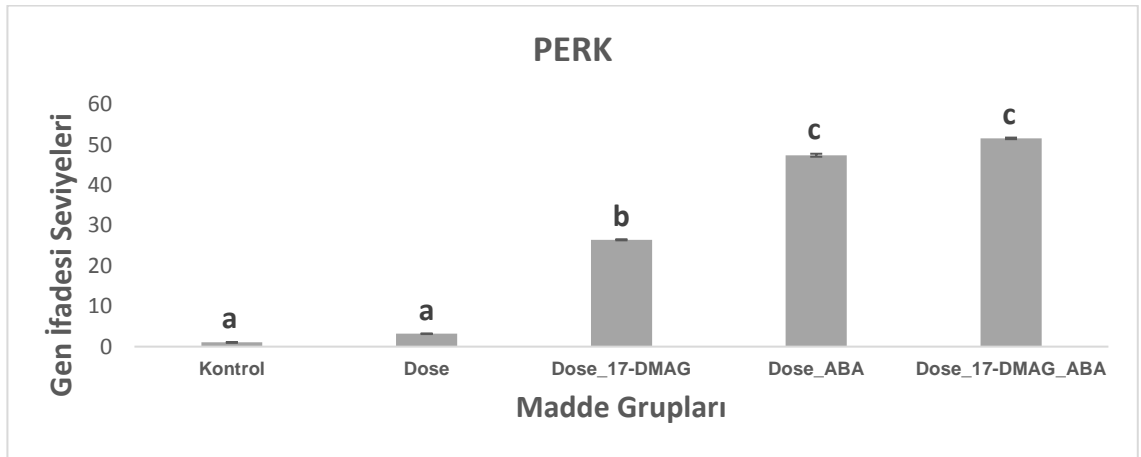
totalXBP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.111.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,79\pm0,11$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,53\pm0,1$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,74\pm0,23$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).





**Şekil 4.111.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı totalXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

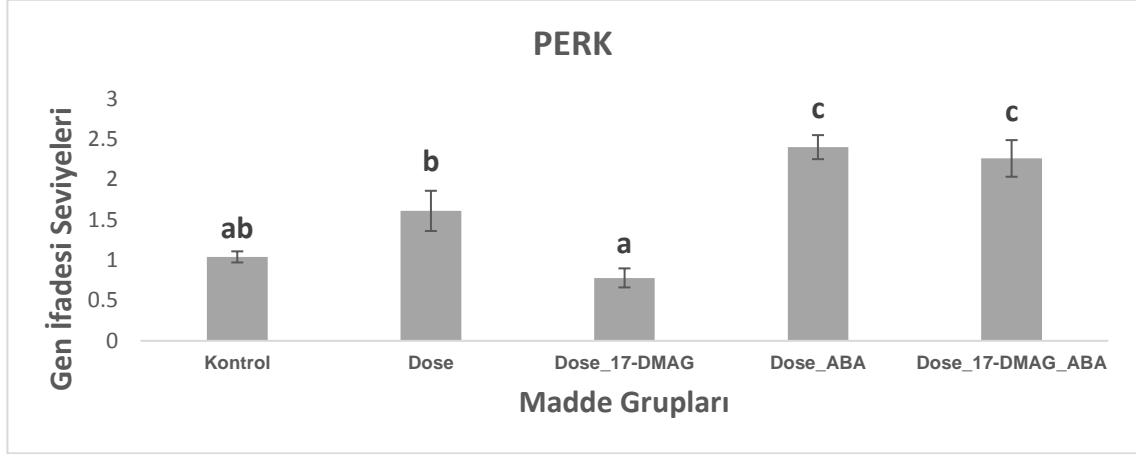
PERK'in gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.112.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $26,47 \pm 0,14$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $47,43 \pm 0,37$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $51,6 \pm 0,2$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.112.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı PERK geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

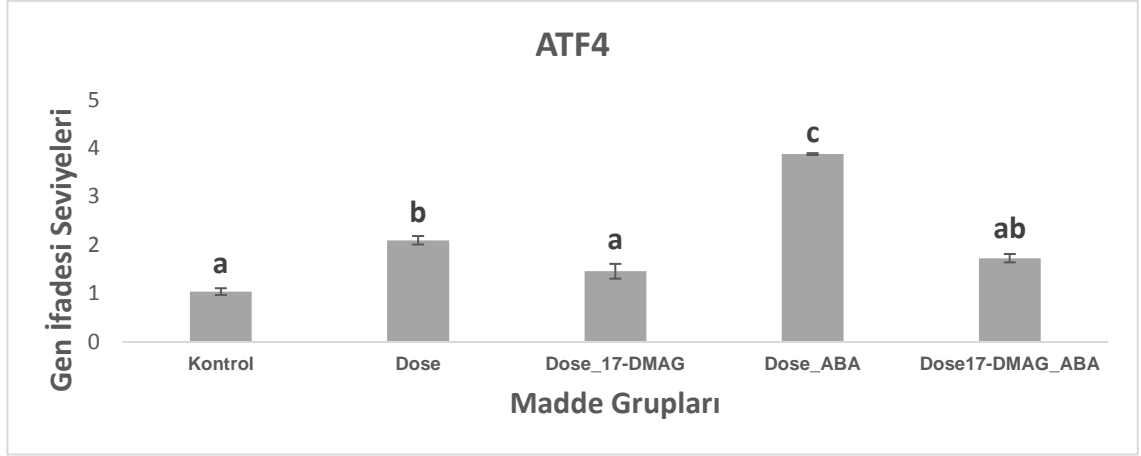
PERK'in gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.113.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel uygulaması için

1,61±0,25 kat, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA için 2,4±0,15 kat, üç maddenin birlikte uygulanması için 2,26±0,23 kat istatikselsel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için 0,78±0,12 kat istatikselsel olarak anlamlı azalmalar belirlenmiştir (P≤0,05).



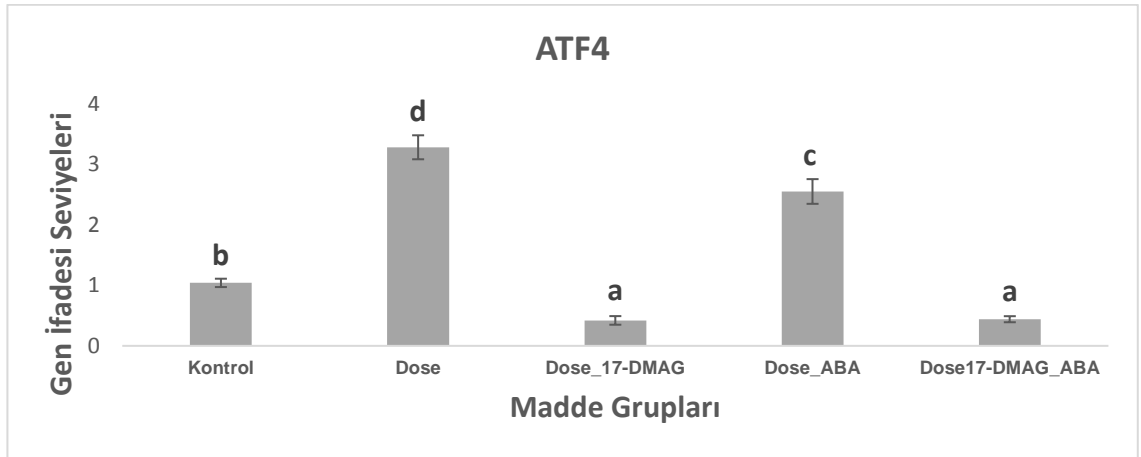
**Şekil 4.113.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı totalXBP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

ATF4'ün gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.114.'te gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel uygulaması için 2,1±0,09 kat, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA için 3,88±0,02 kat, üç maddenin birlikte uygulanması için 1,73±0,09 kat istatikselsel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir (P≤0,05).



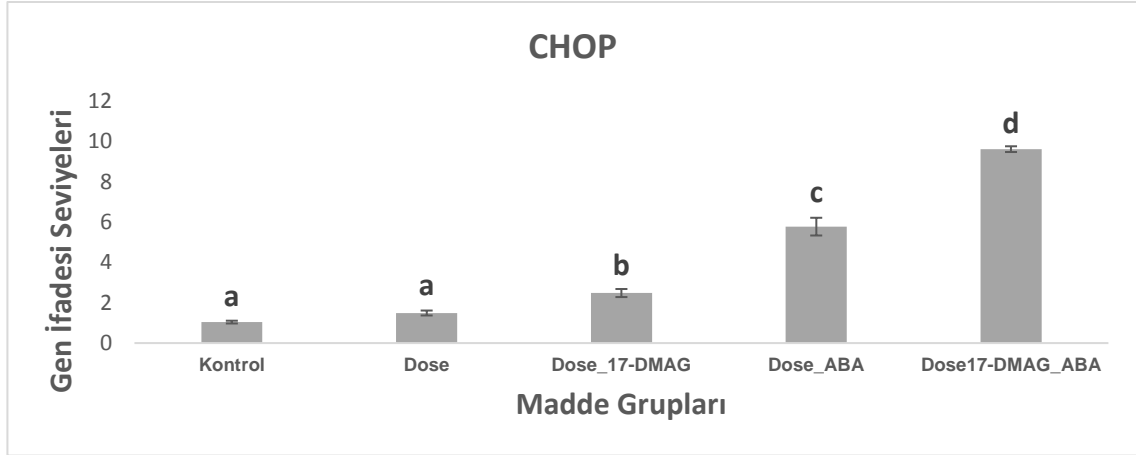
**Şekil 4.114.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı ATF4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

ATF4'ün gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.115.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel uygulaması için  $3,28 \pm 0,2$ , 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,55 \pm 0,2$  kat istatikselsel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $0,42 \pm 0,07$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $0,44 \pm 0,05$  kat istatikselsel olarak anlamlı azalmalar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



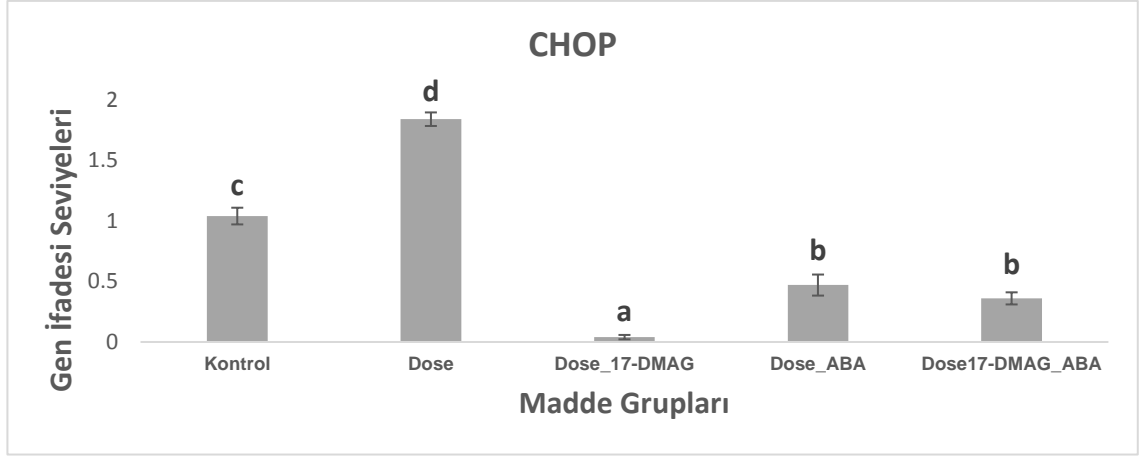
**Şekil 4.115.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı ATF4 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

CHOP'un gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.116.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,48 \pm 0,2$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $5,77 \pm 0,44$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $9,61 \pm 0,14$  kat istatikselsel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



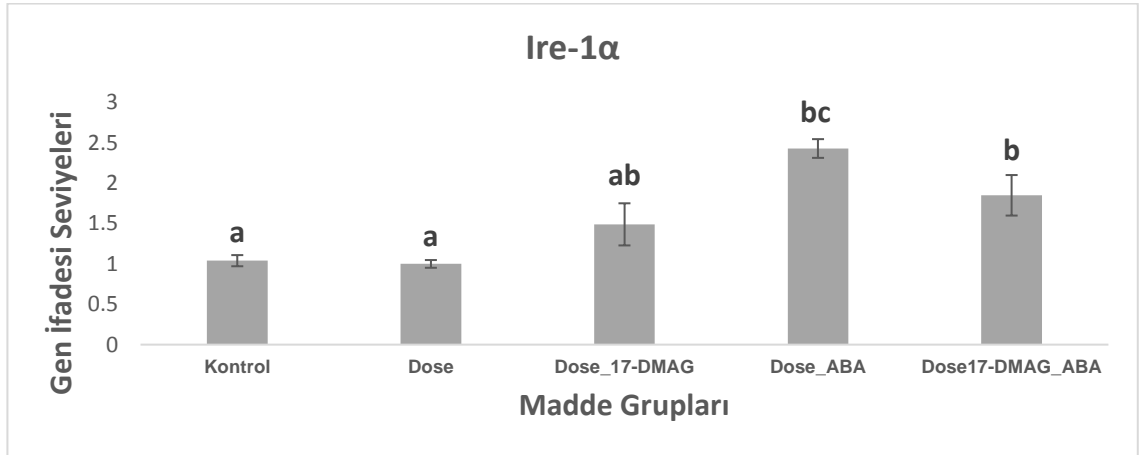
**Şekil 4.116.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı CHOP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

CHOP'un gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.117.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel uygulaması için  $1,84 \pm 0,06$  kat istatikselsel olarak anlamlı artış belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $0,04 \pm 0,02$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $0,47 \pm 0,09$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $0,36 \pm 0,05$  kat istatikselsel olarak anlamlı azalamalar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.117.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı CHOP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

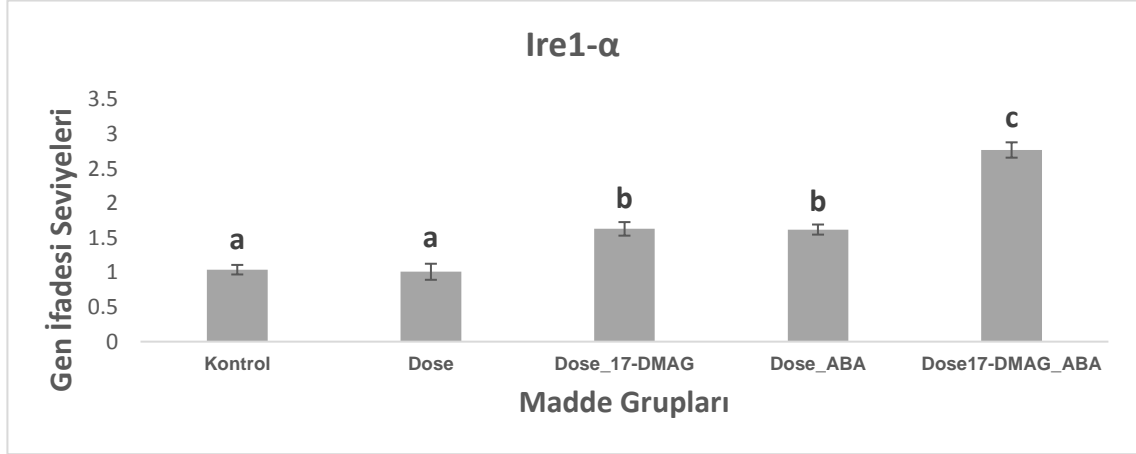
Ire1- $\alpha$ 'nın gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.118.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,49 \pm 0,26$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,43 \pm 0,12$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,85 \pm 0,25$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.118.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Ire1- $\alpha$  geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Ire1- $\alpha$ 'nın kontrole ve dosetaksel uygulamasına göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen anlamlı artışlar Şekil 4.119.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre

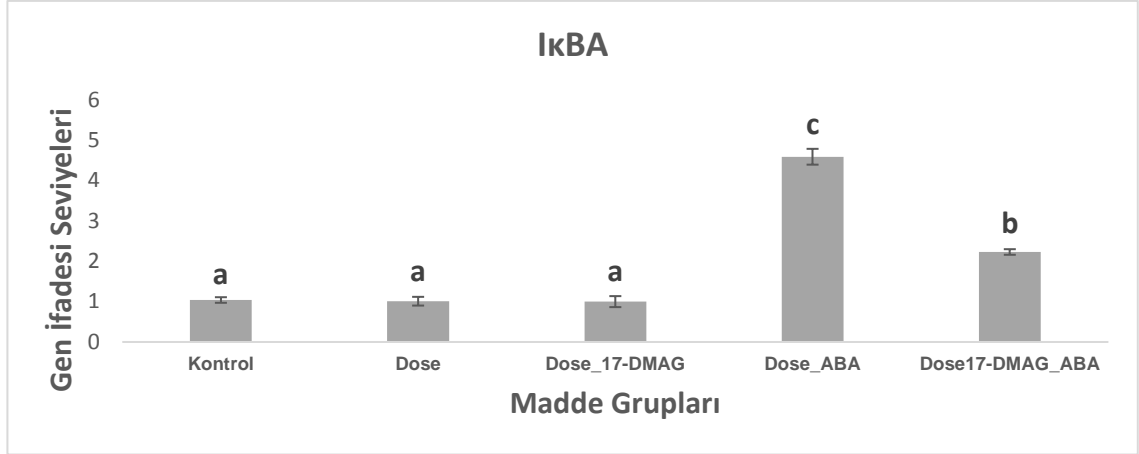
hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $1,63 \pm 0,1$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,62 \pm 0,07$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,77 \pm 0,11$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.119.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Ire1- $\alpha$  geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

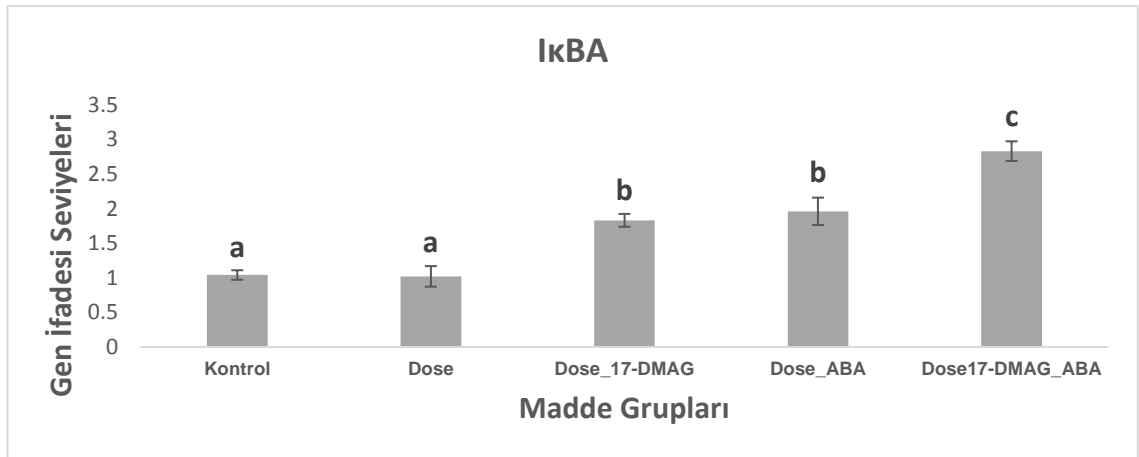
#### 4.3.4.5. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Sağ Kalım ve Ölüm Sinyali İnhibitörü Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması

I $\kappa$ BA'nın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.120.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $4,59 \pm 0,2$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,23 \pm 0,07$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.120.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı IκBA ifadesindeki değişimler.

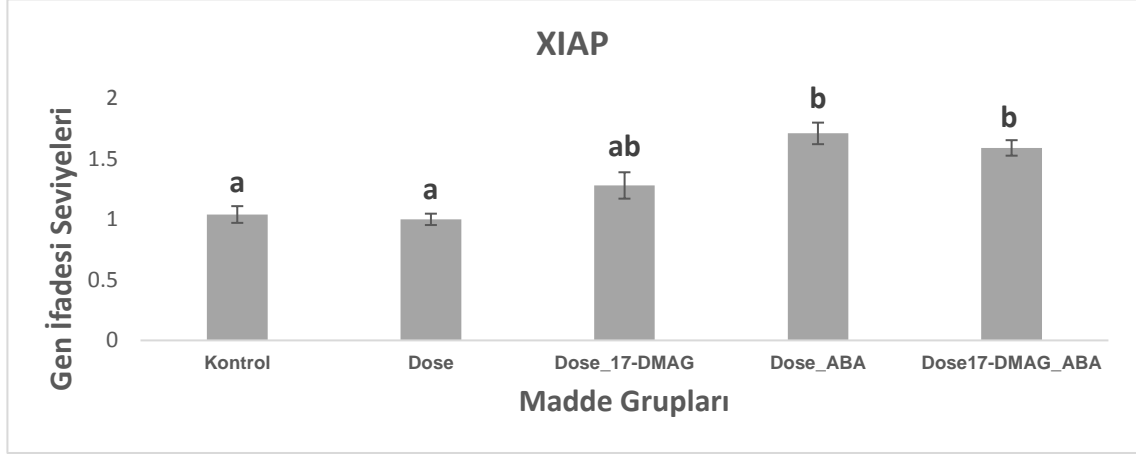
IκBA'nın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.121.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,83 \pm 0,1$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,96 \pm 0,2$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,83 \pm 0,14$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.121.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı IκBA geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

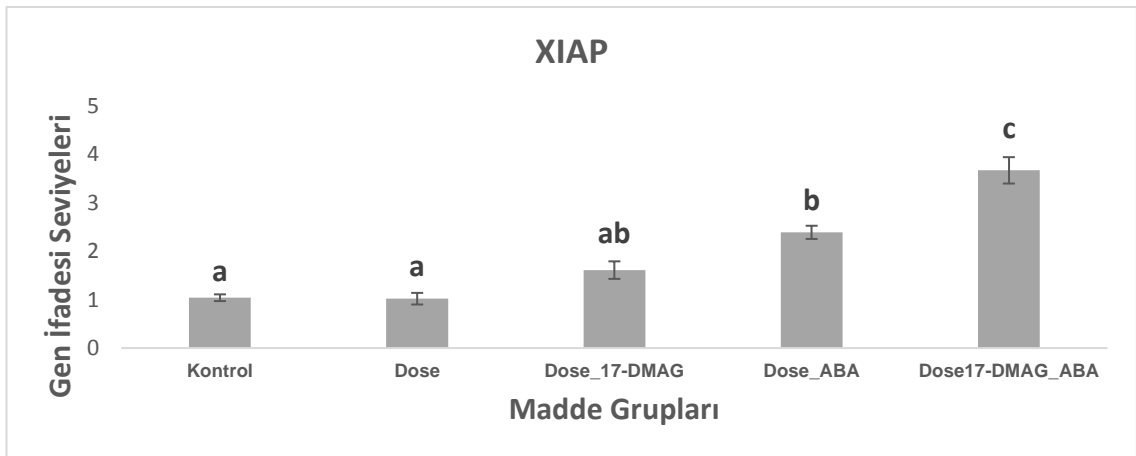
XIAP'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.122.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,28 \pm 0,11$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,71 \pm 0,09$

kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,59 \pm 0,06$  kat istatiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.122.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı XIAP ifadesindeki değişimler.

XIAP'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.123.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,61 \pm 0,18$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,39 \pm 0,14$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $3,67 \pm 0,27$  kat istatiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).

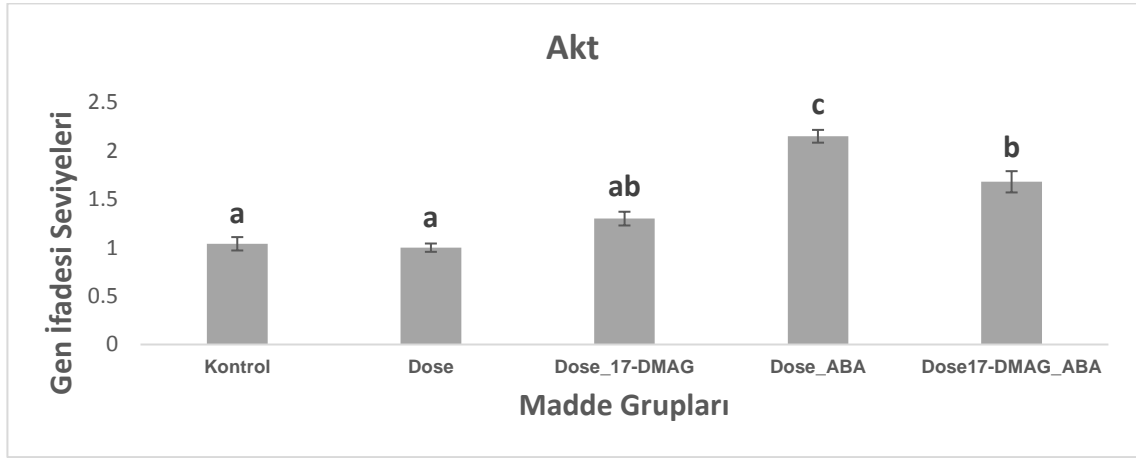


**Şekil 4.123.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı XIAP geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.



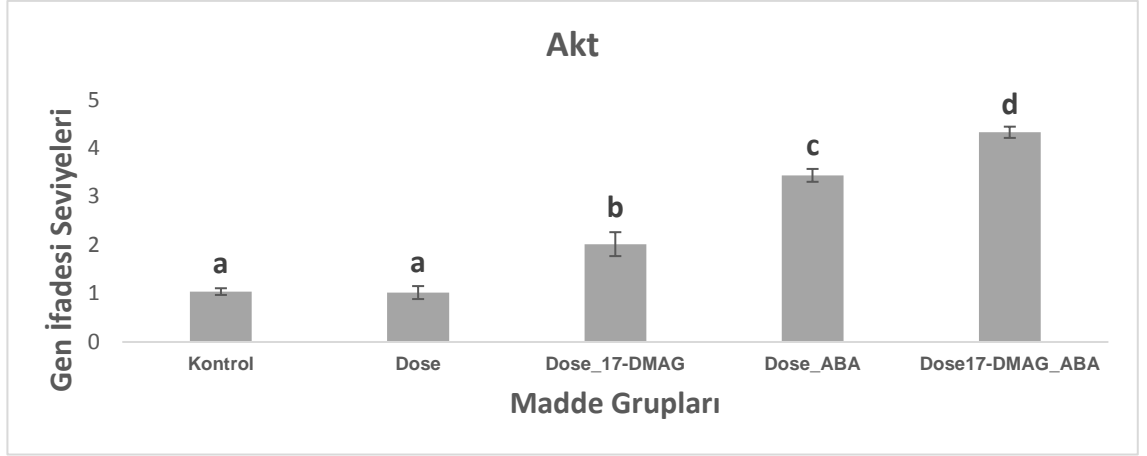
#### 4.3.4.6. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Onkogenlerin İfadelerinin Karşılaştırılması

Akt'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.124.'te gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,3\pm 0,07$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,15\pm 0,07$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,68\pm 0,11$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



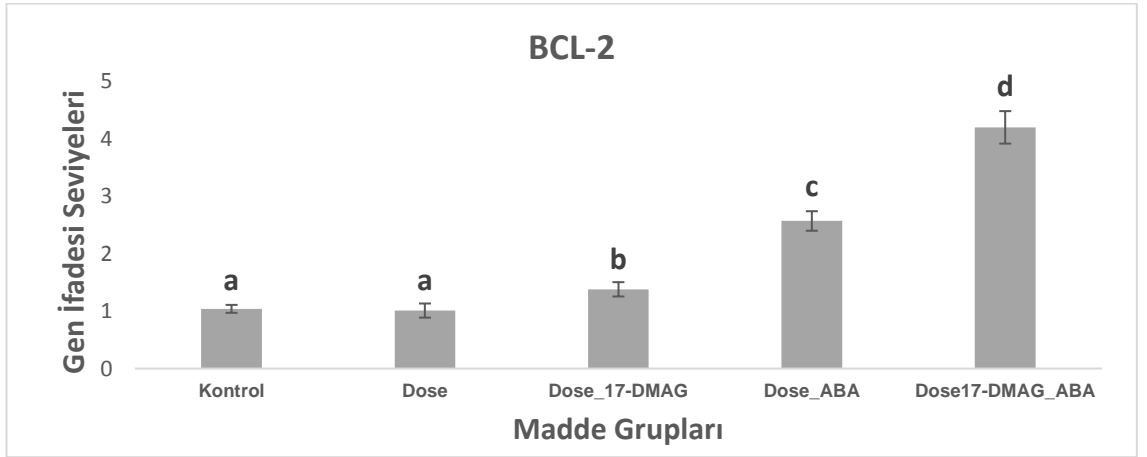
**Şekil 4.124.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Akt geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Akt'nin kontrole ve dosetaksel uygulamasına göre gen ifadesi seviyesinde meydana gelen anlamlı artışlar Şekil 4.125.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG için  $2,02\pm 0,25$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $3,44\pm 0,13$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $4,33\pm 0,12$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.125.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Akt geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

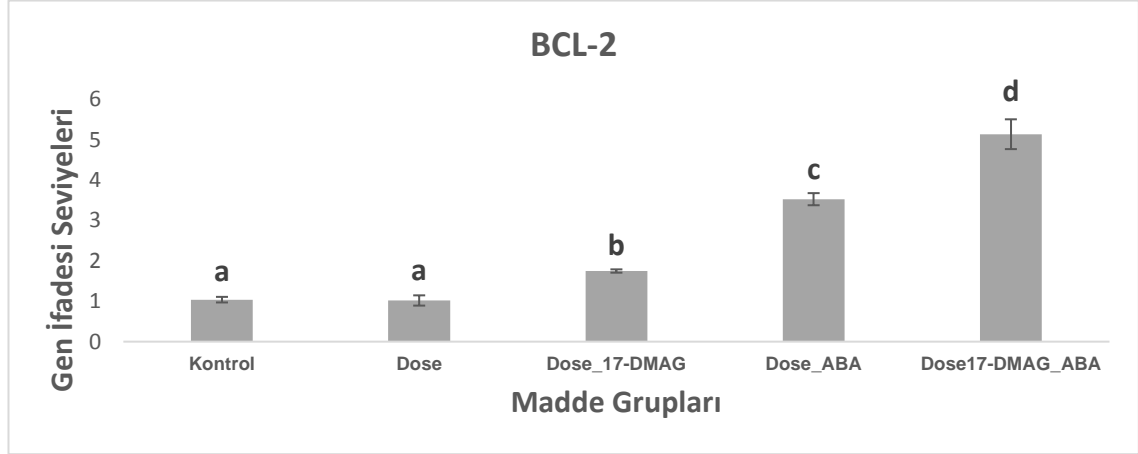
BCL-2'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.126.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,38 \pm 0,13$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,57 \pm 0,17$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $4,21 \pm 0,28$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.126.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

BCL-2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.127.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM

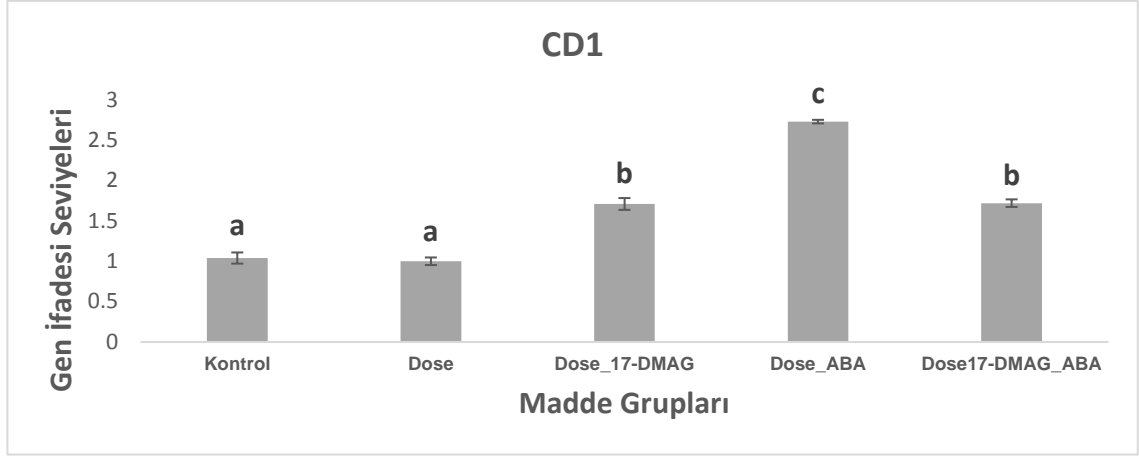
17-DMAG uygulaması için  $1,75 \pm 0,04$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $3,53 \pm 0,15$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $5,14 \pm 0,37$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.127.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BCL-2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

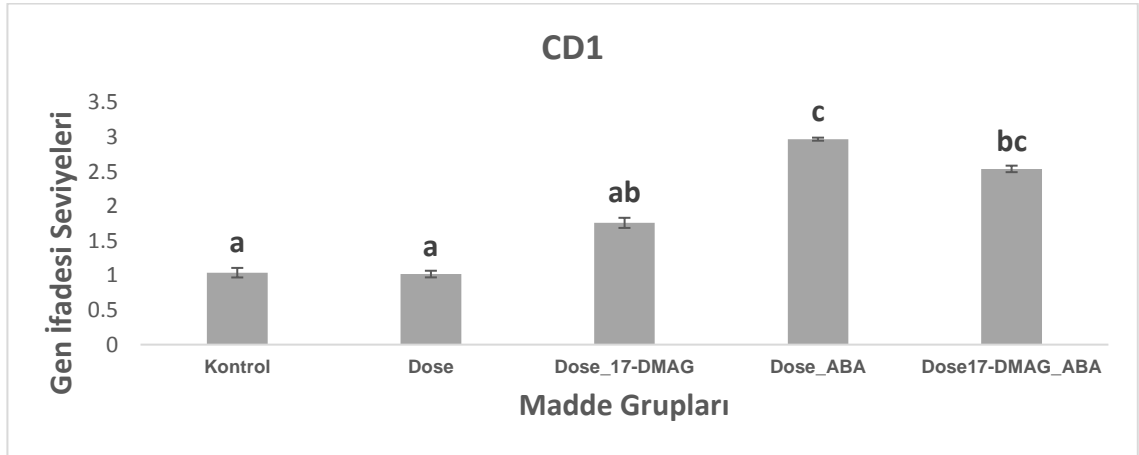
#### 4.3.4.7. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Hücre Bölünmesi ve Büyümesi Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması

CD1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.128.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,71 \pm 0,07$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,73 \pm 0,02$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,72 \pm 0,05$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.128.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı SiklinD1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

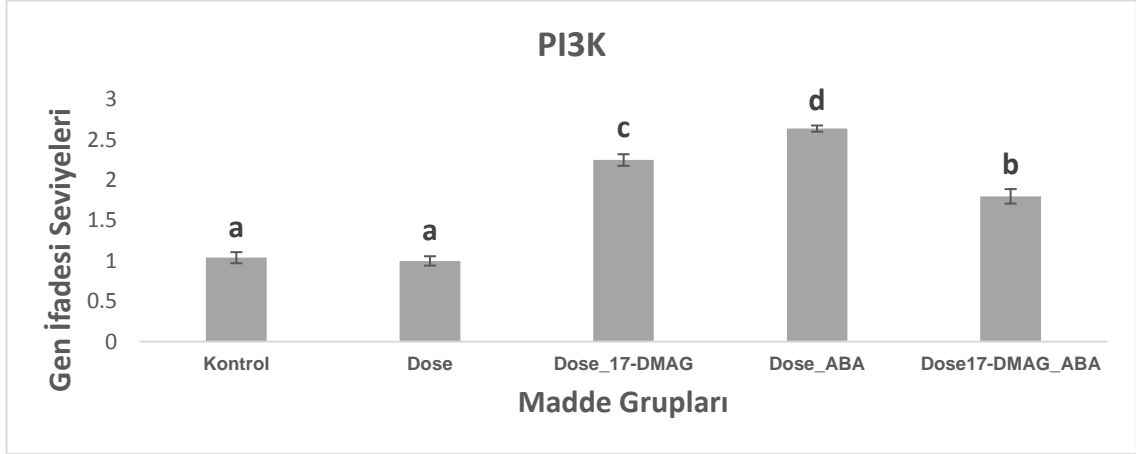
CD1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.129.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,76 \pm 0,07$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,97 \pm 0,02$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,54 \pm 0,05$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.129.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı SiklinD1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

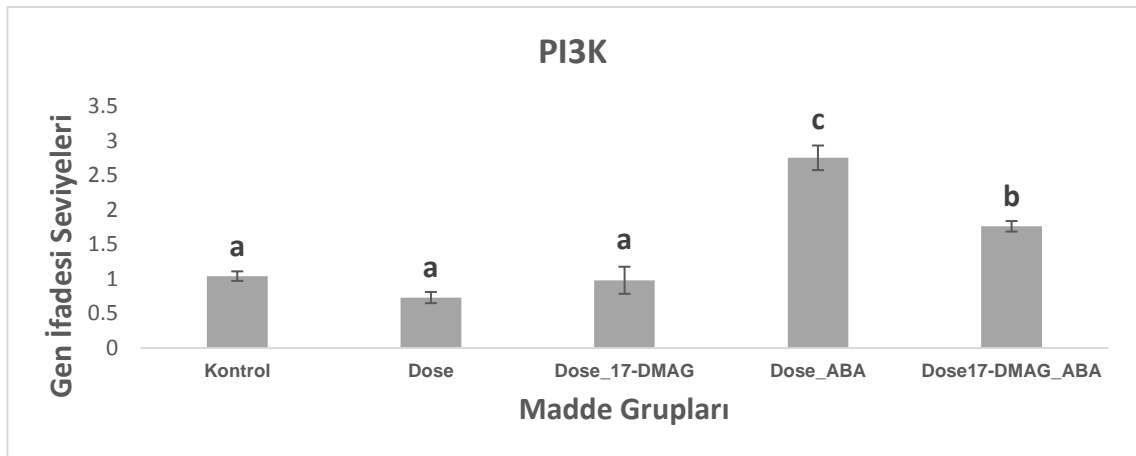
PI3K'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.130.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-

DMAG uygulaması için  $2,25 \pm 0,07$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,64 \pm 0,04$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,8 \pm 0,1$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



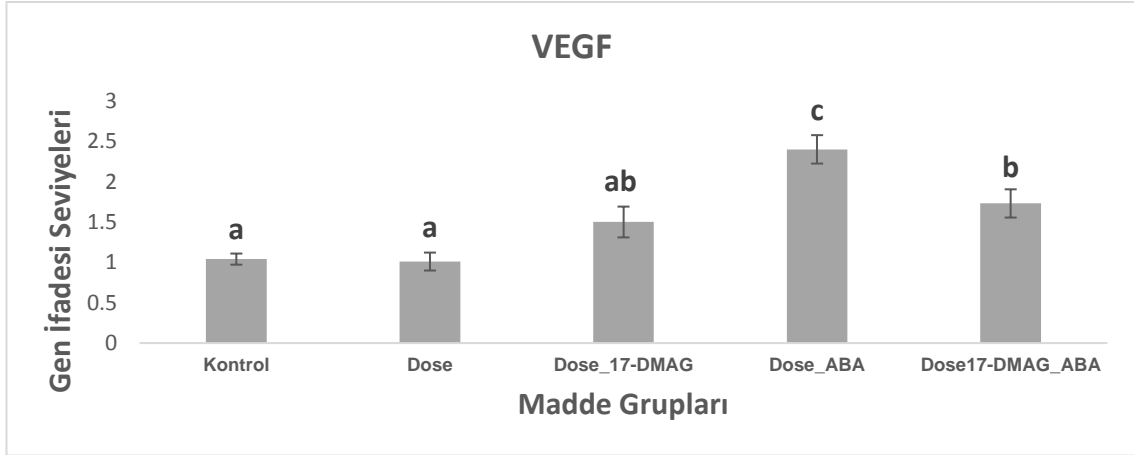
**Şekil 4.130.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı PI3K geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

PI3K'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.131.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $2,75 \pm 0,18$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,76 \pm 0,08$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



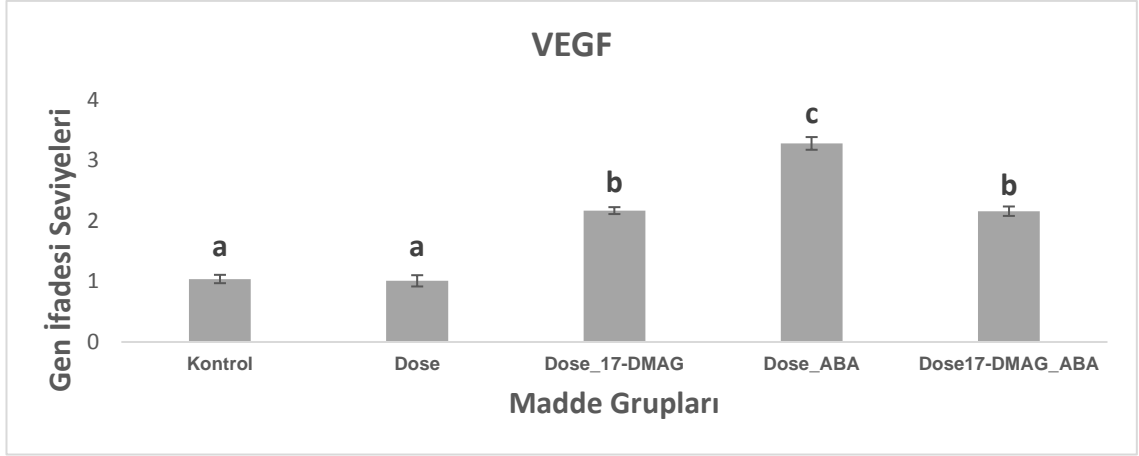
**Şekil 4.131.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı PI3K geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

VEGF'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.132.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,5\pm 0,19$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,4\pm 0,18$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,73\pm 0,18$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



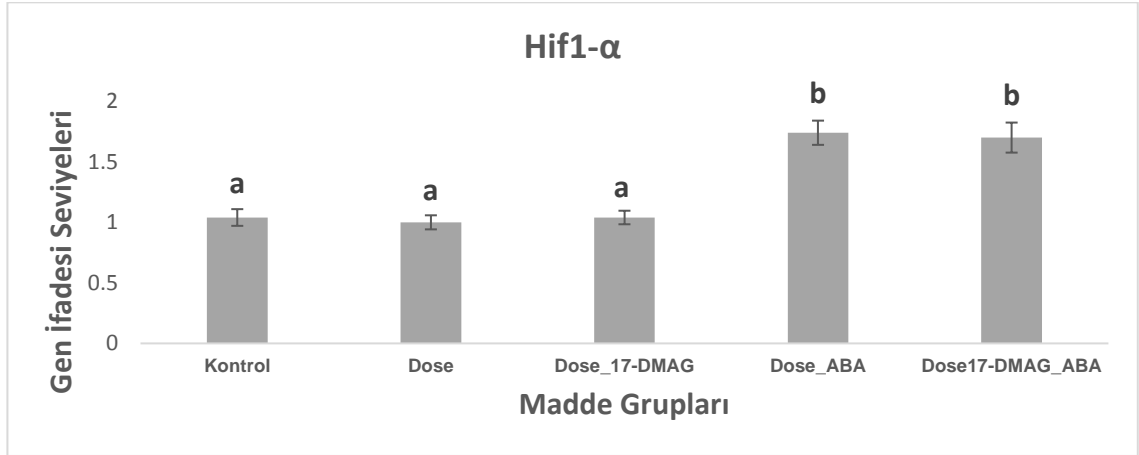
**Şekil 4.132.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı VEGF geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

VEGF'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.133.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,17\pm 0,06$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $3,28\pm 0,11$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,16\pm 0,08$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.133.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı VEGF geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

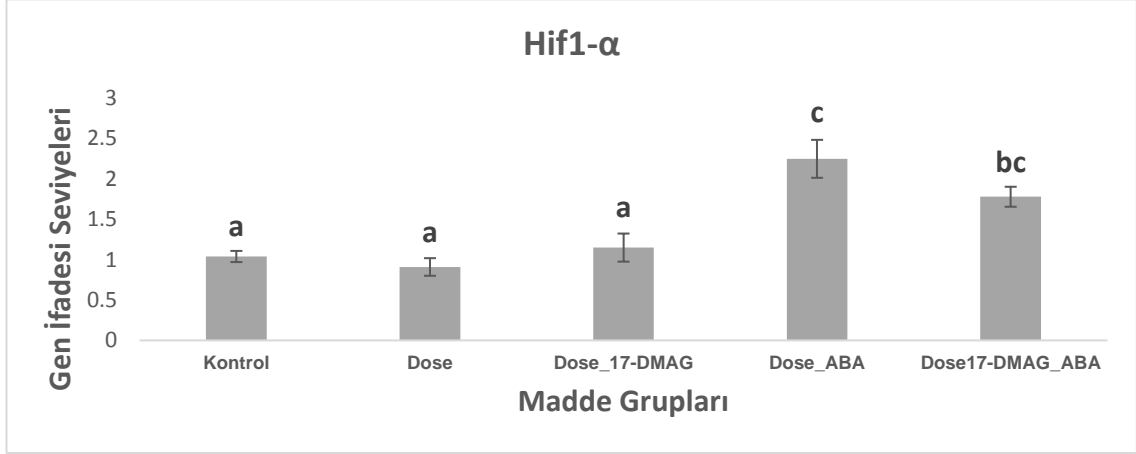
Hif1- $\alpha$ 'nın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.134.'te gösterilmiştir. Dirençsiz DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $1,74 \pm 0,1$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,7 \pm 0,12$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.134.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Hif1- $\alpha$  geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Hif1- $\alpha$ 'nın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.135.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500

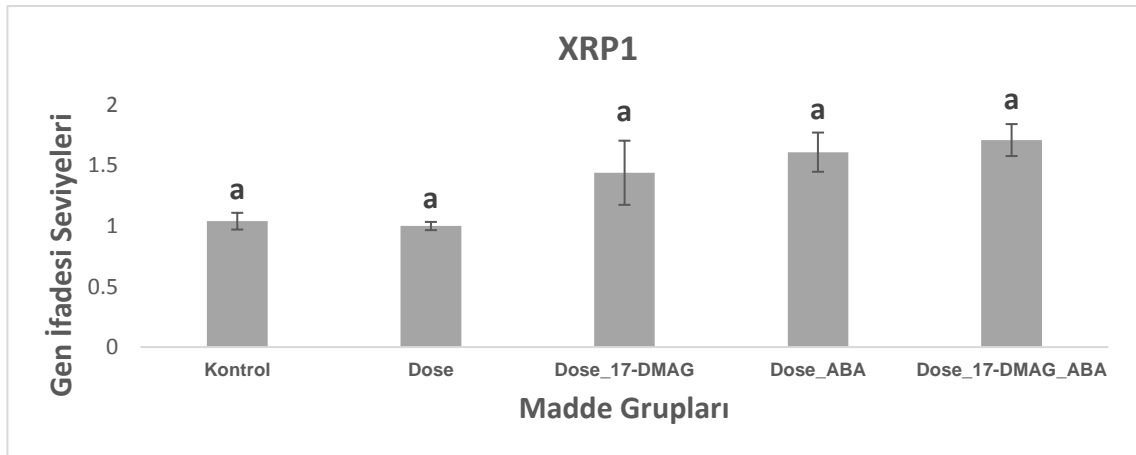
$\mu\text{M}$  ABA uygulaması için  $2,25 \pm 0,24$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,78 \pm 0,12$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.135.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Hif1- $\alpha$  geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

#### 4.3.4.8. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında DNA Tamir Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması

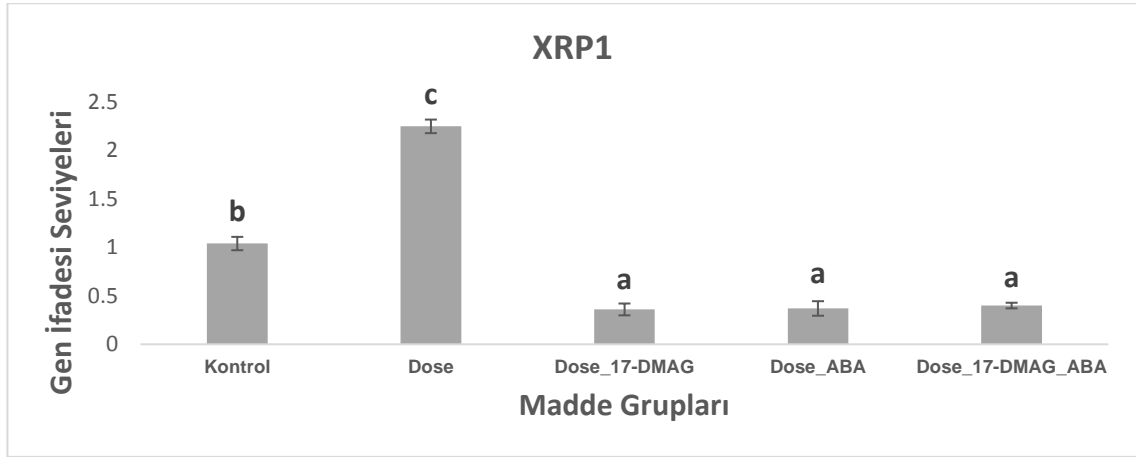
XRP1'in gen ifadesi seviyesinde anlamlı bir değişim olmadığı Şekil 4.136.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre herhangi bir anlamlı değişim belirlenememiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.136.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı XRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

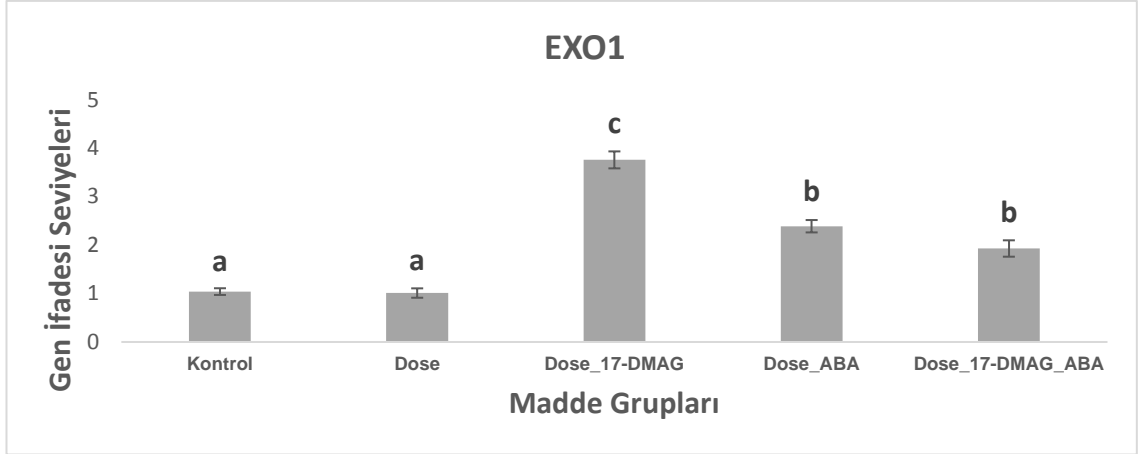


XRP1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.137.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel uygulaması için  $2,25\pm0,07$  kat istatikselsel olarak anlamlı artış belirlenmiştir. Buna karşılık kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $0,36\pm0,07$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA için  $0,38\pm0,06$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $0,4\pm0,03$  kat istatikselsel olarak anlamlı azalamalar belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).



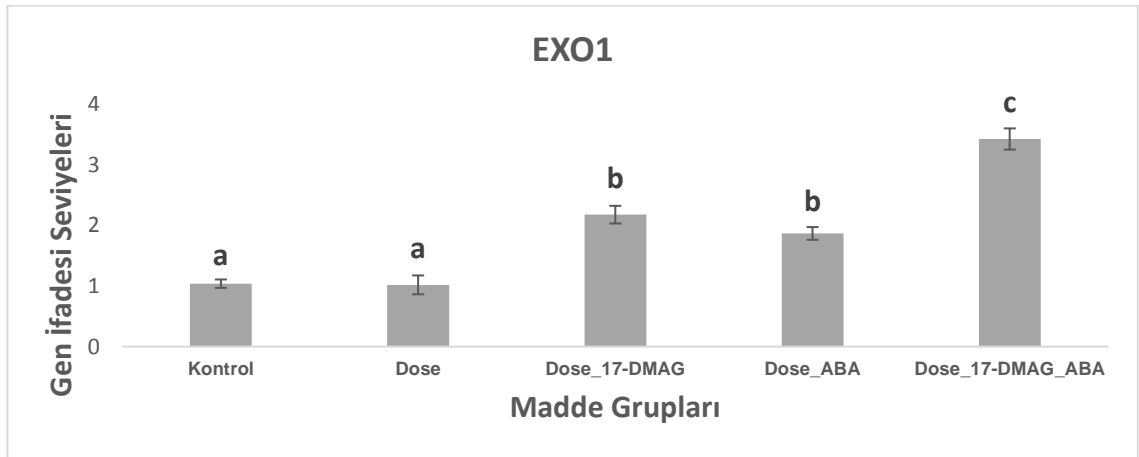
**Şekil 4.137.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı XRP1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

EXO1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.138.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $3,76\pm0,18$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA için  $2,39\pm0,13$ , üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,93\pm0,17$  kat istatikselsel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq0,05$ ).



**Şekil 4.138.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı EXO1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

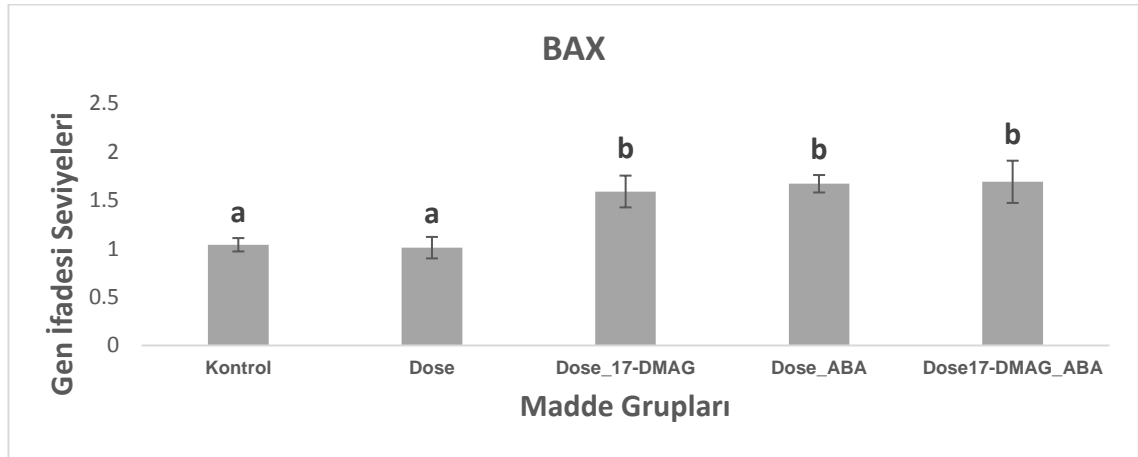
EXO1'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.139.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $2,18 \pm 0,15$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,88 \pm 0,1$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $3,43 \pm 0,18$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.139.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı EXO1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

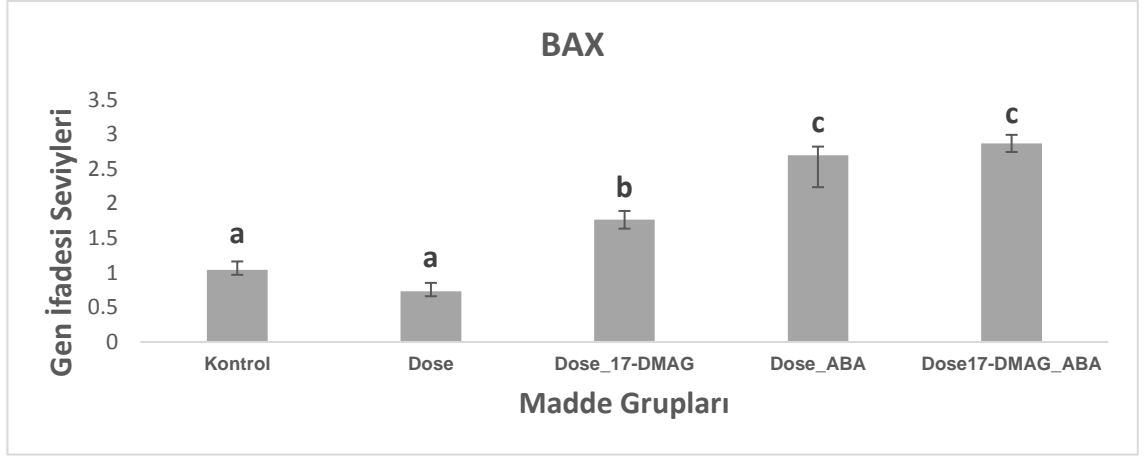
#### 4.3.4.9. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücre Hatlarında Apoptoz ve Diğer Ölüm Sinyal Yolu Genlerinin İfadelerinin Karşılaştırılması

BAX'ın gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.140.'ta gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,59 \pm 0,16$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,67 \pm 0,1$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,69 \pm 0,22$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



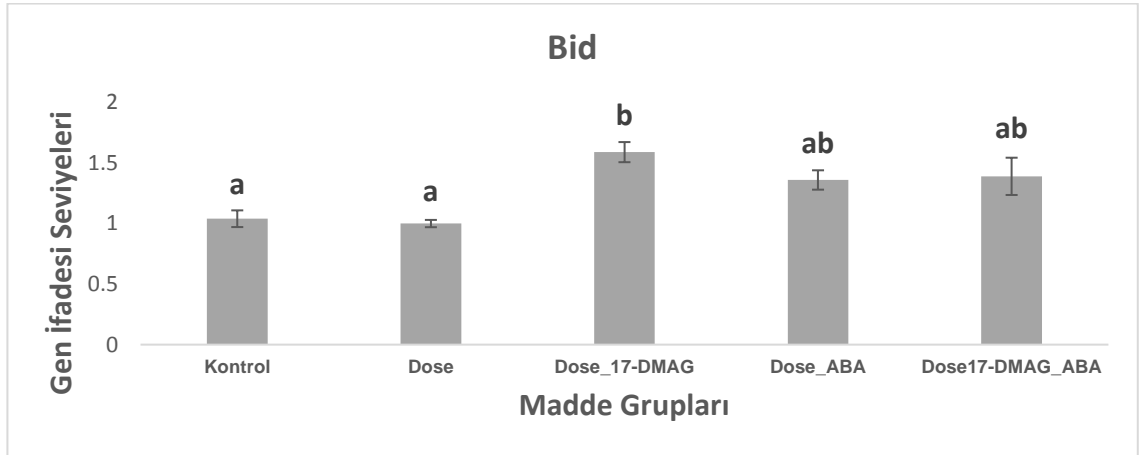
**Şekil 4.140.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı BAX geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

BAX'ın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.141.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,77 \pm 0,13$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,7 \pm 0,46$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,87 \pm 0,12$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.141.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı BAX geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

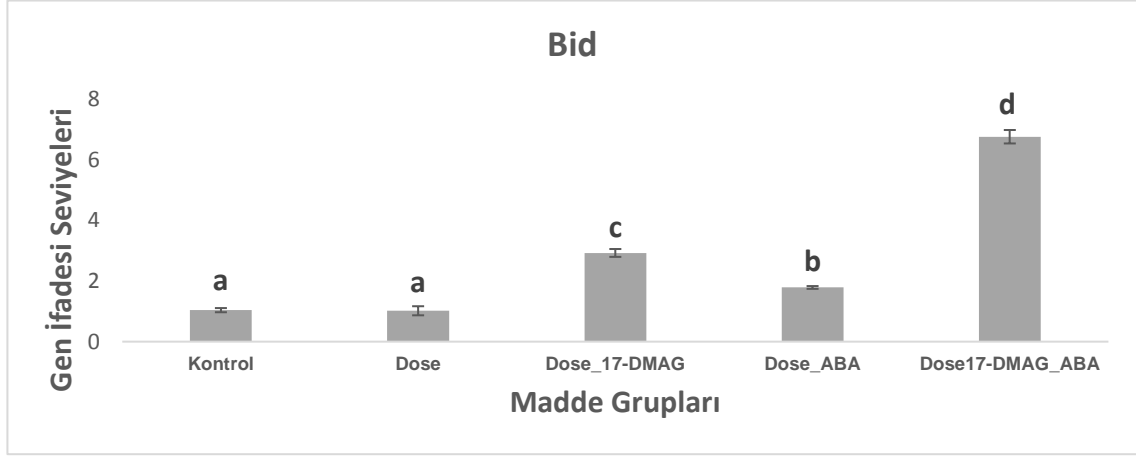
Bid'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.142.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,59 \pm 0,08$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,36 \pm 0,08$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,39 \pm 0,15$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.142.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Bid geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

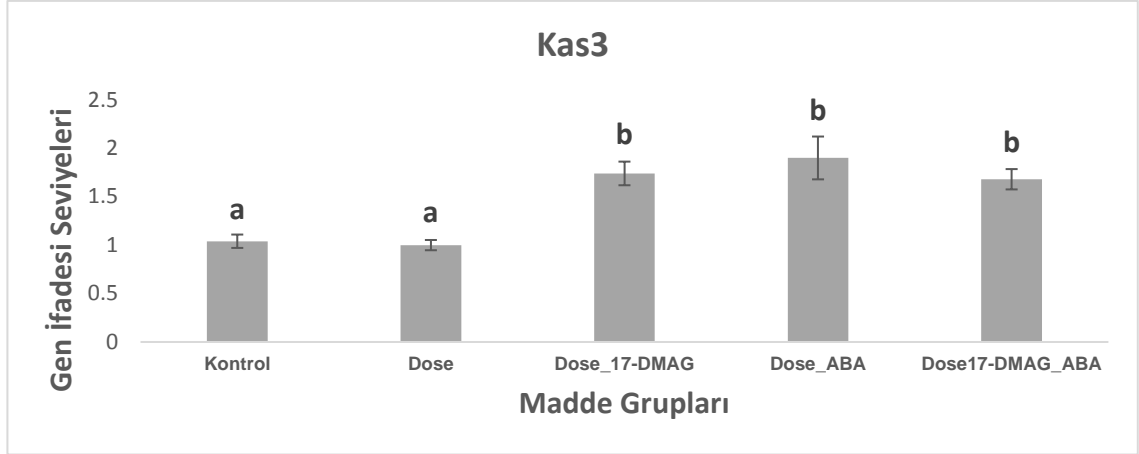
Bid'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.143.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM

17-DMAG uygulaması için  $2,93 \pm 0,13$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,79 \pm 0,05$ , üç maddenin birlikte uygulanması için  $6,77 \pm 0,22$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



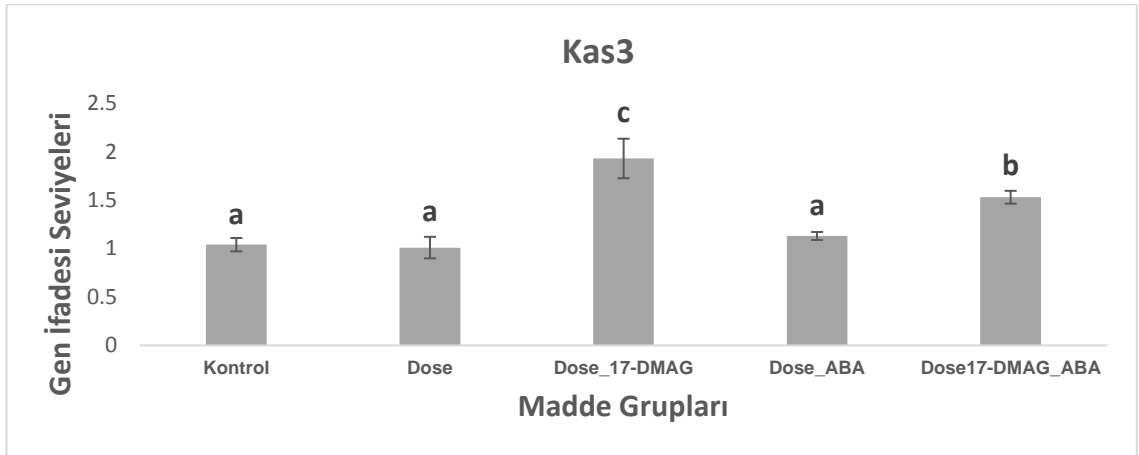
**Şekil 4.143.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Tnf- $\alpha$  geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Kas3'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.144.'te gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,74 \pm 0,12$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,9 \pm 0,22$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,68 \pm 0,11$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.144.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Kas3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

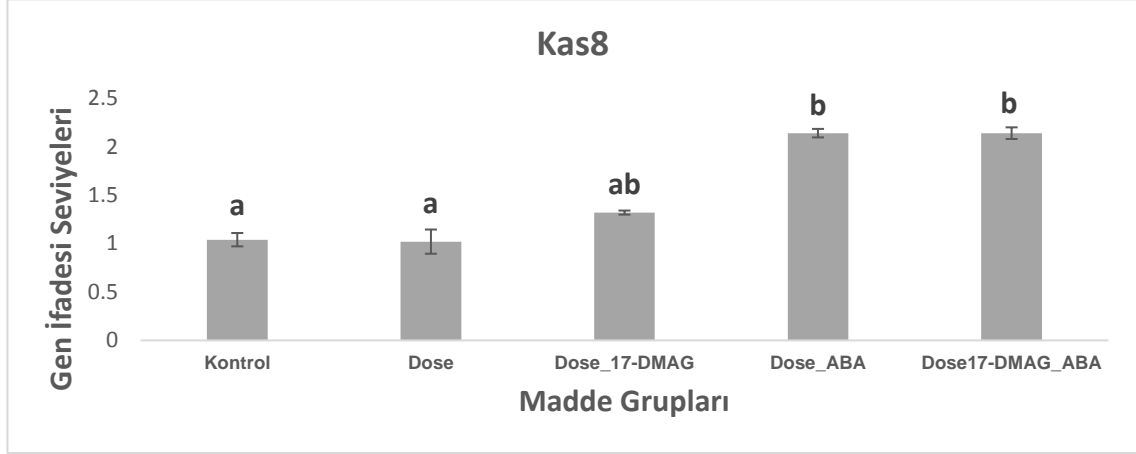
Kas3'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.145.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,93 \pm 0,2$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,53 \pm 0,06$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.145.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Kas3 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

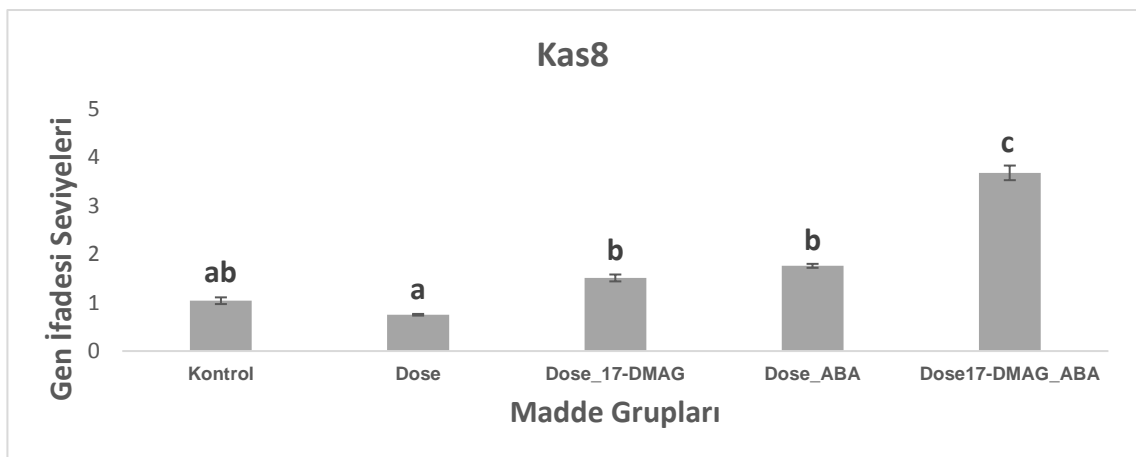
Kas8'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.146.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,32 \pm 0,02$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,14 \pm 0,04$

kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,14 \pm 0,06$  kat istatiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



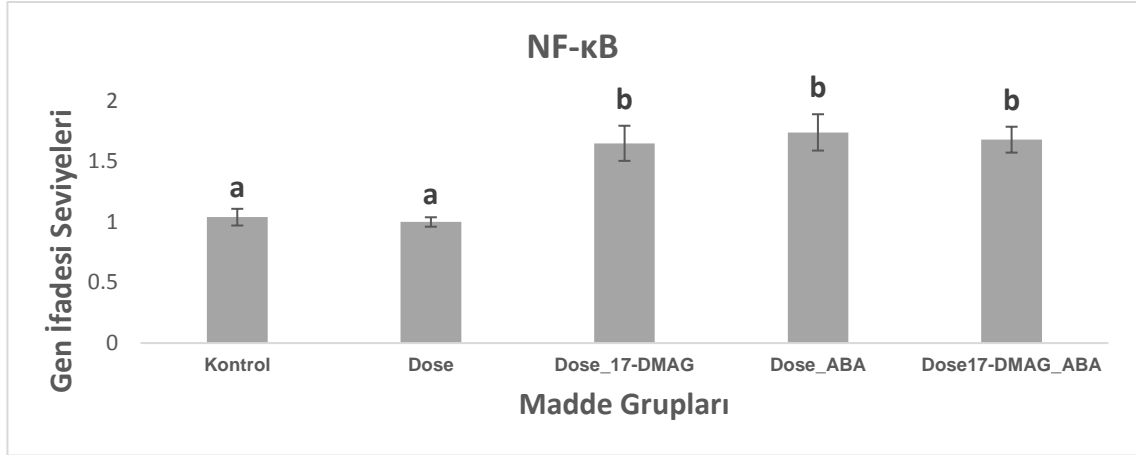
**Şekil 4.146.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Kas8 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Kas8'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.147.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,51 \pm 0,07$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,76 \pm 0,04$  kat, üç maddenin birlikte için  $3,68 \pm 0,15$  kat istatiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.147.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Kas8 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

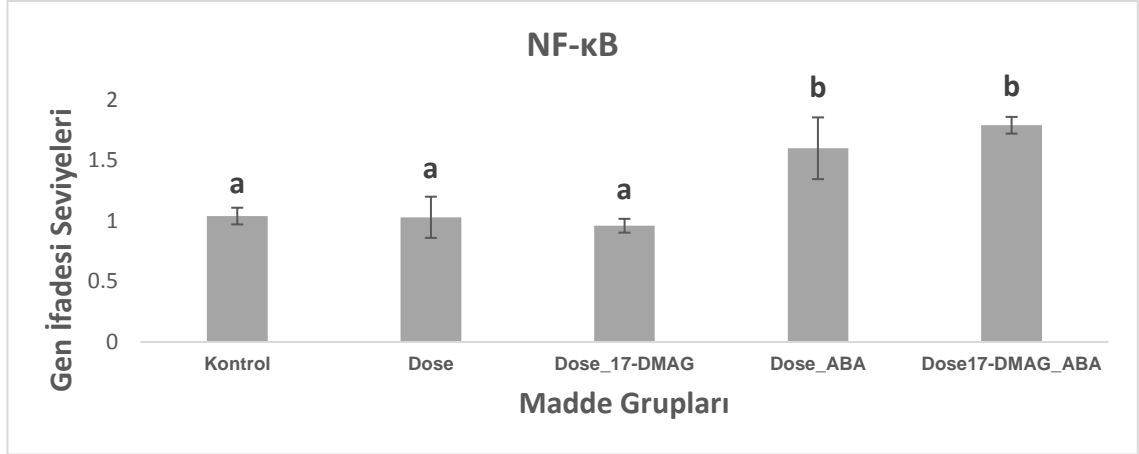
NF- $\kappa$ B'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.148.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,65\pm 0,15$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,74\pm 0,15$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,68\pm 0,11$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.148.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı NF- $\kappa$ B geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

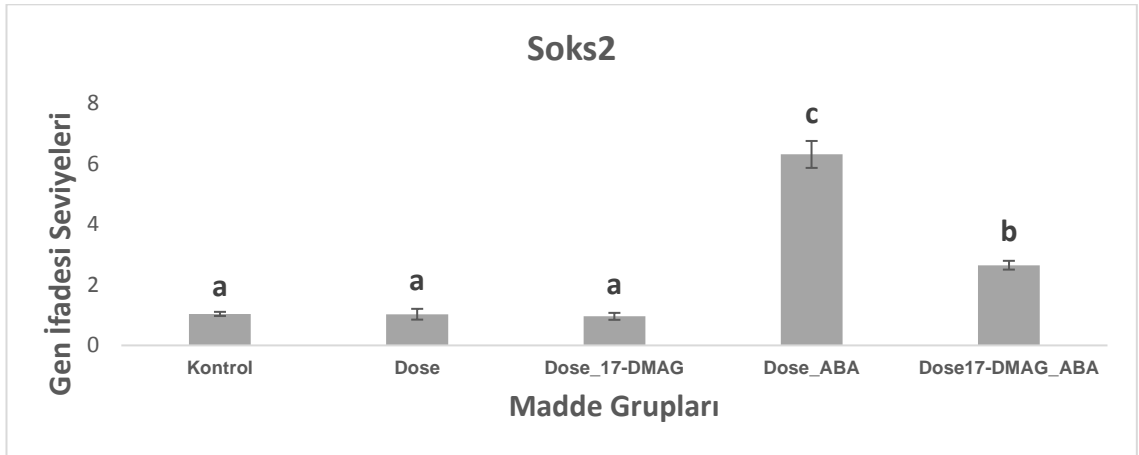
NF- $\kappa$ B'nin gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.149.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $1,6\pm 0,46$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,79\pm 0,07$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).





**Şekil 4.149.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı NF-κB geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

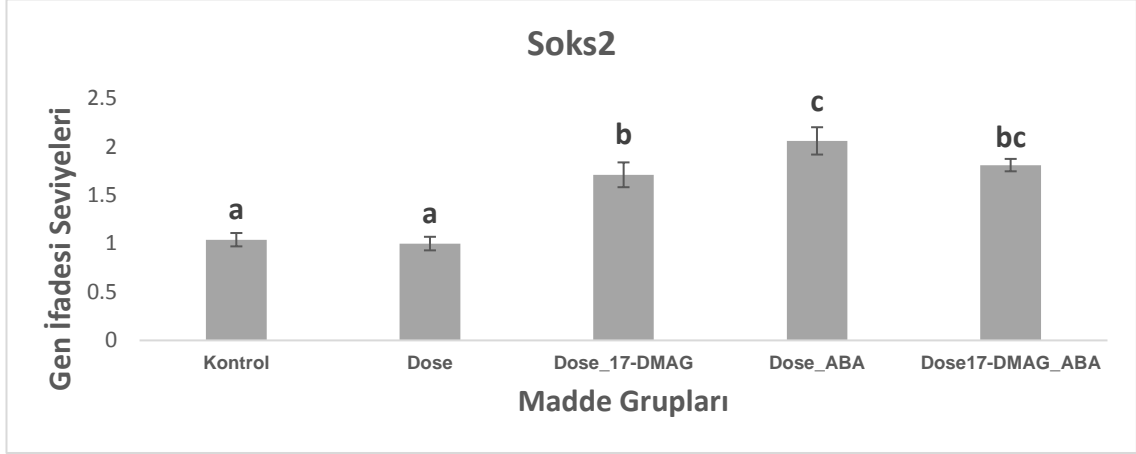
Soks2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.150.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulaması için  $6,31 \pm 0,45$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,65 \pm 0,15$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.150.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Soks2 ifadesindeki değişimler.

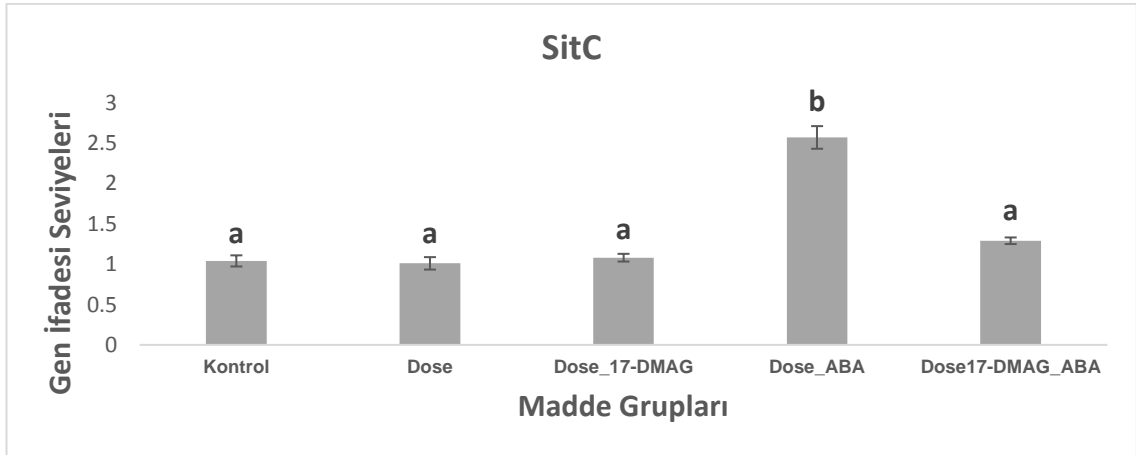
Soks2'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.151.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,71 \pm 0,13$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA için

2,06±0,14 kat, üç maddenin birlikte uygulanması için 1,81±0,06 kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



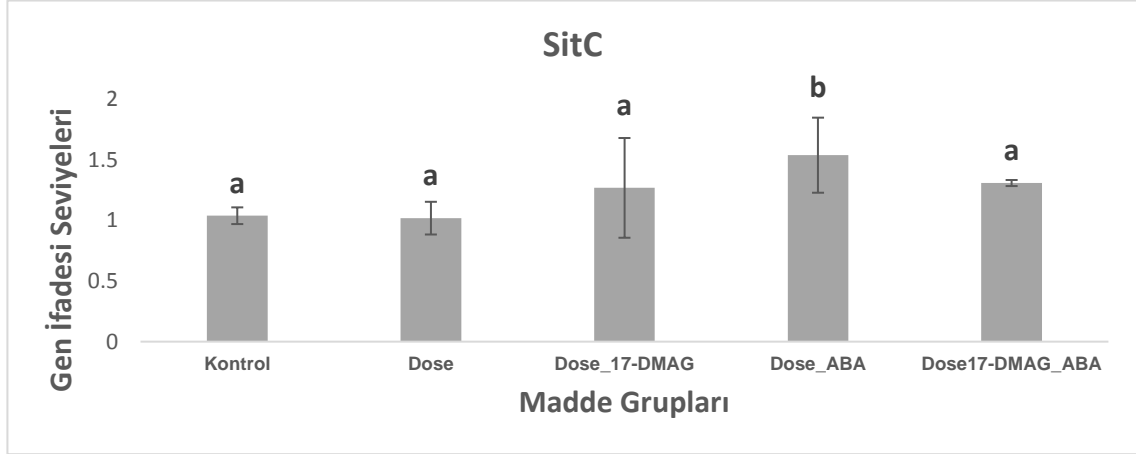
**Şekil 4.151.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Soks2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

SitC'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.152.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulaması için 2,57±0,14 kat, üç maddenin birlikte uygulanması için 1,29±0,04 kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



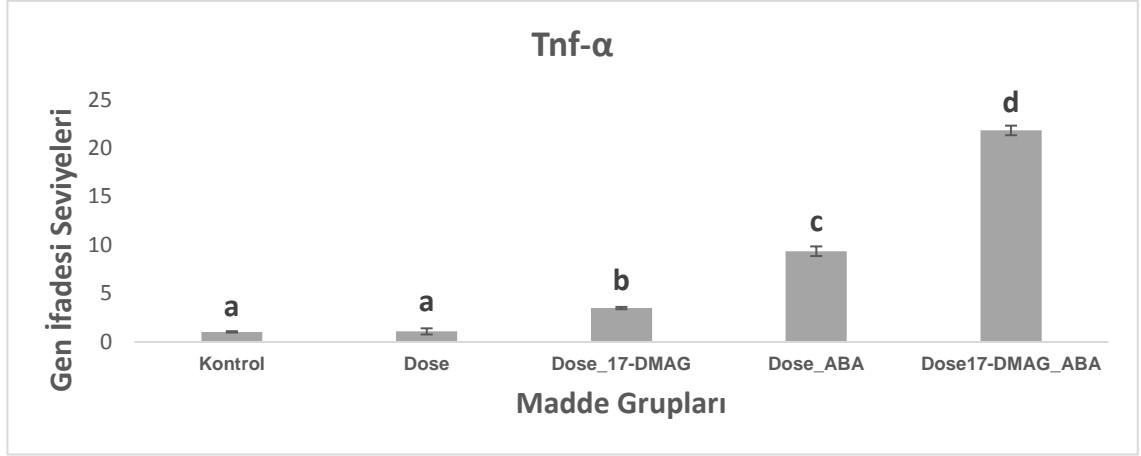
**Şekil 4.152.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı SitC geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

SitC'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.153.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulaması için  $1,54\pm 0,31$  kat istatiksels olarak anlamlı artış belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



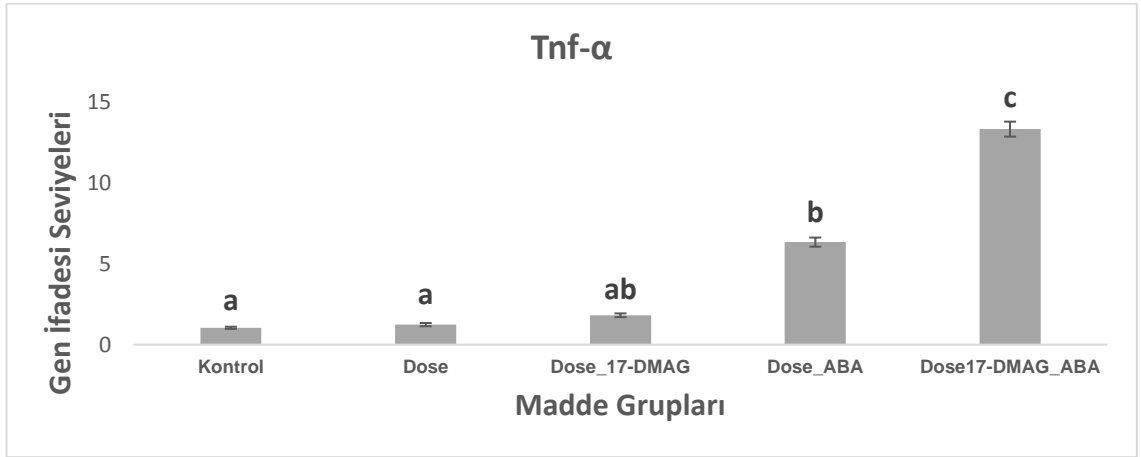
**Şekil 4.153.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı SitC geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Tnf- $\alpha$ 'nın gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.154.'te gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $3,5\pm 0,12$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA için  $9,37\pm 0,5$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $21,84\pm 0,5$  kat istatiksels olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P\leq 0,05$ ).



**Şekil 4.154.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı Tnf- $\alpha$  geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

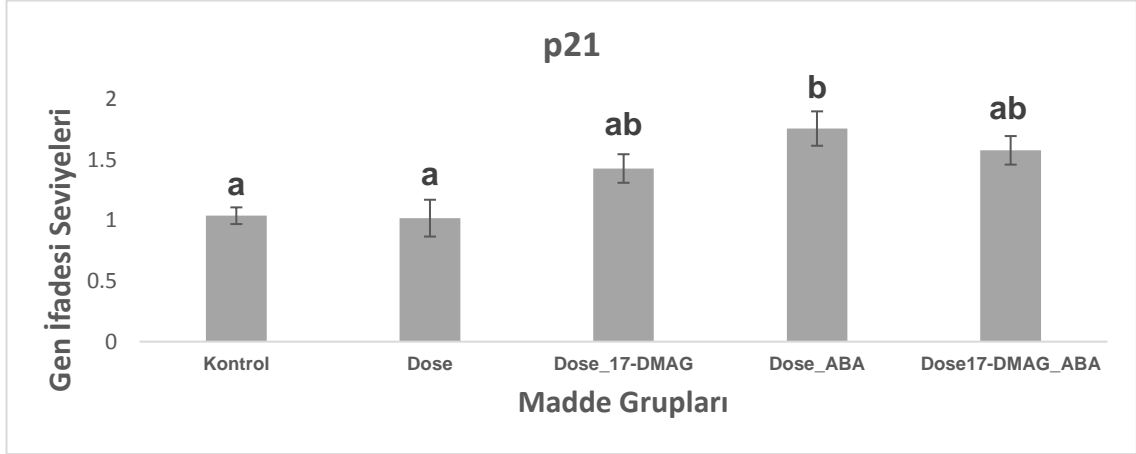
Tnf- $\alpha$ 'ün gen ifadesi seviyesindeki değişimler Şekil 4.155.'te gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,82 \pm 0,12$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $6,35 \pm 0,28$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $13,35 \pm 0,46$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.155.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı Tnf- $\alpha$  geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

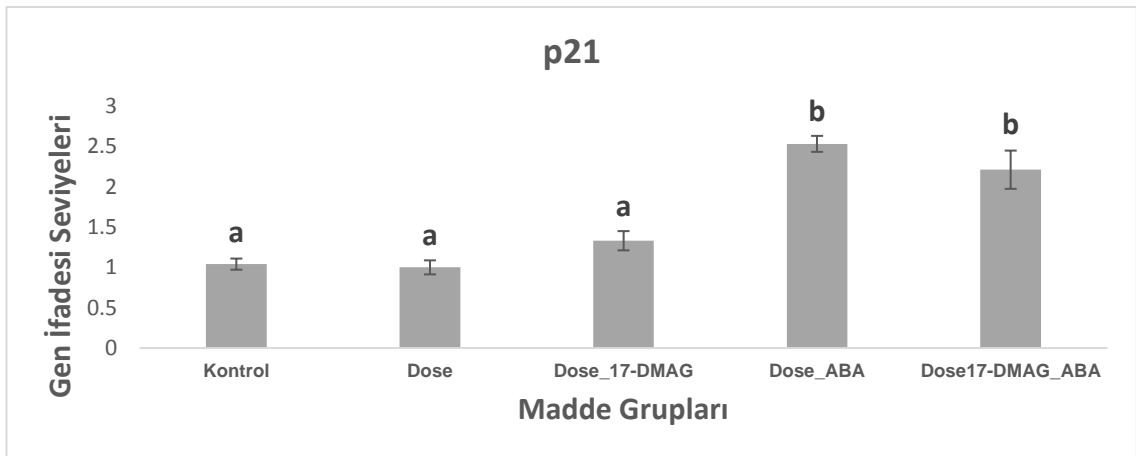
p21'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.156.'da gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-

DMAG uygulaması için  $1,43 \pm 0,12$  kat, 50 nM dosetaksiel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,76 \pm 0,14$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,58 \pm 0,12$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



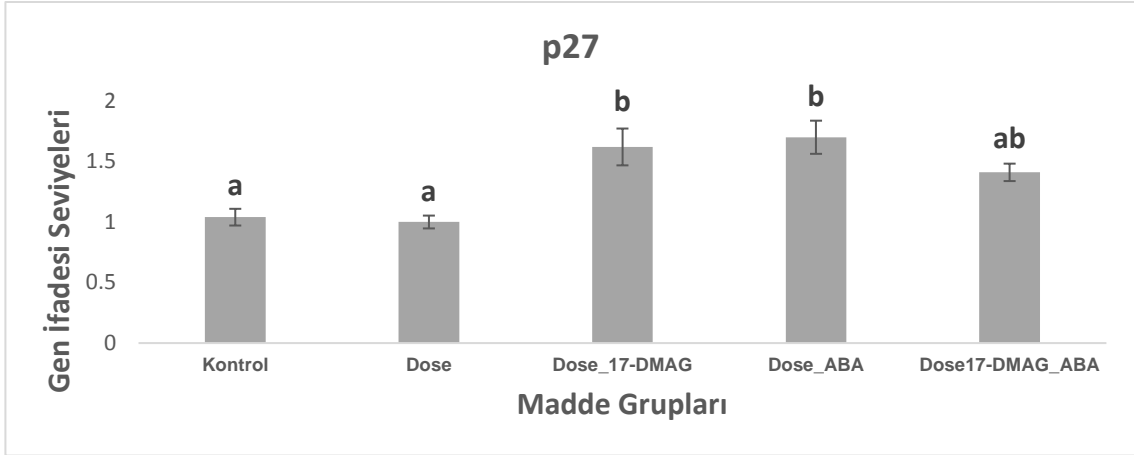
**Şekil 4.156.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı p21 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

p21'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.157.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksiel ile 500  $\mu$ M ABA uygulaması için  $2,53 \pm 0,1$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $2,21 \pm 0,24$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



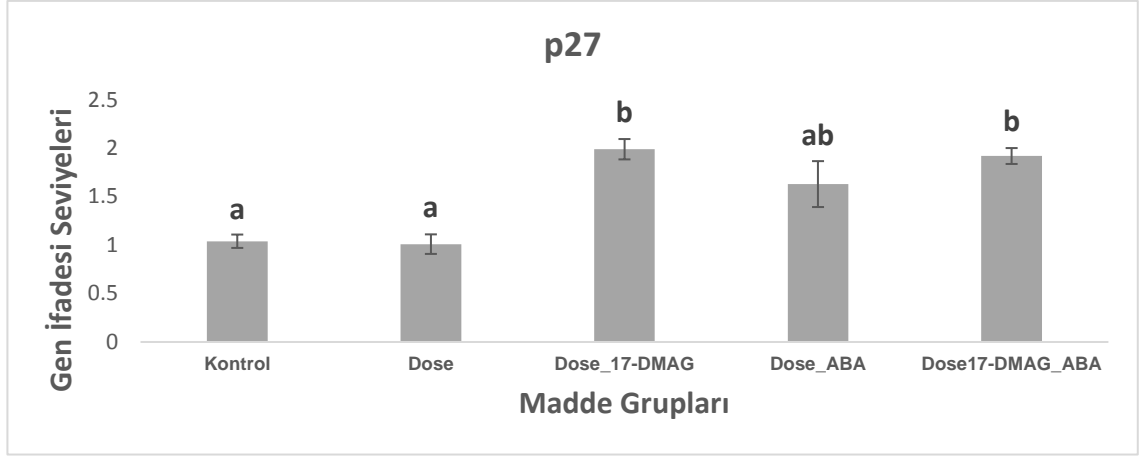
**Şekil 4.157.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı p21 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

p27'in gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.158.'de gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,62 \pm 0,15$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,7 \pm 0,14$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,41 \pm 0,07$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



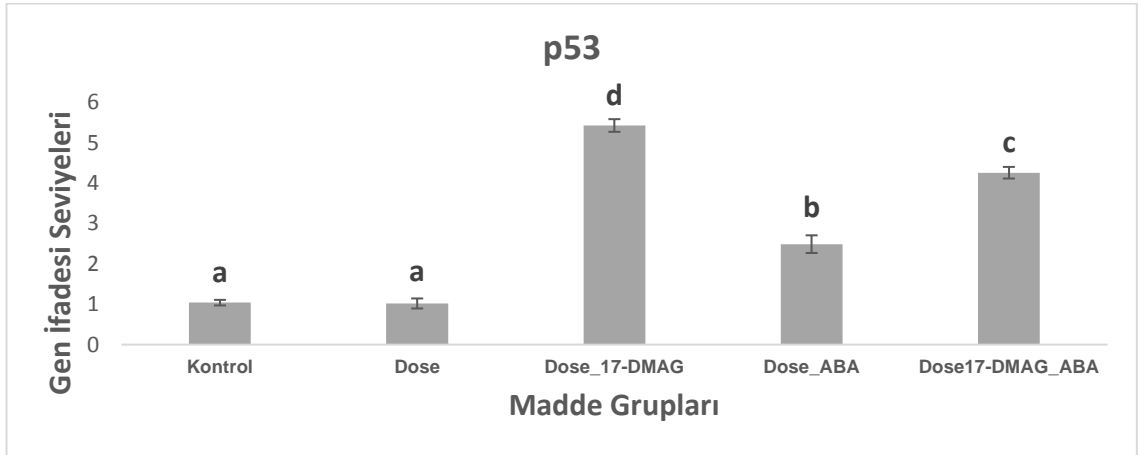
**Şekil 4.158.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı p27 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

p27'nin gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.159.'da gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $1,99 \pm 0,11$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,63 \pm 0,24$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $1,92 \pm 0,08$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.159.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı p27 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

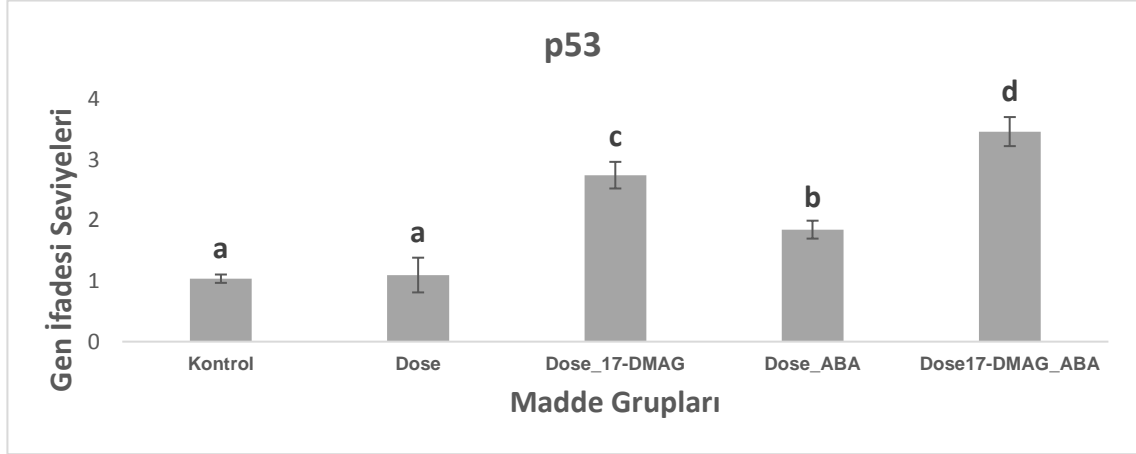
p53'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.160.'ta gösterilmiştir. DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulaması için  $5,43 \pm 0,16$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $2,49 \pm 0,22$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $4,26 \pm 0,14$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.160.** DU-145 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı p53 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler.

p53'ün gen ifadesi seviyesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.161.'de gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre 50 nM dosetaksel ile 35 nM

17-DMAG uygulaması için  $2,75 \pm 0,22$  kat, 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA için  $1,85 \pm 0,15$  kat, üç maddenin birlikte uygulanması için  $3,47 \pm 0,24$  kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar belirlenmiştir ( $P \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.161.** Dirençli DU-145 hücre hattında uygulanan maddelere bağlı p53 ifadesindeki değişimler.

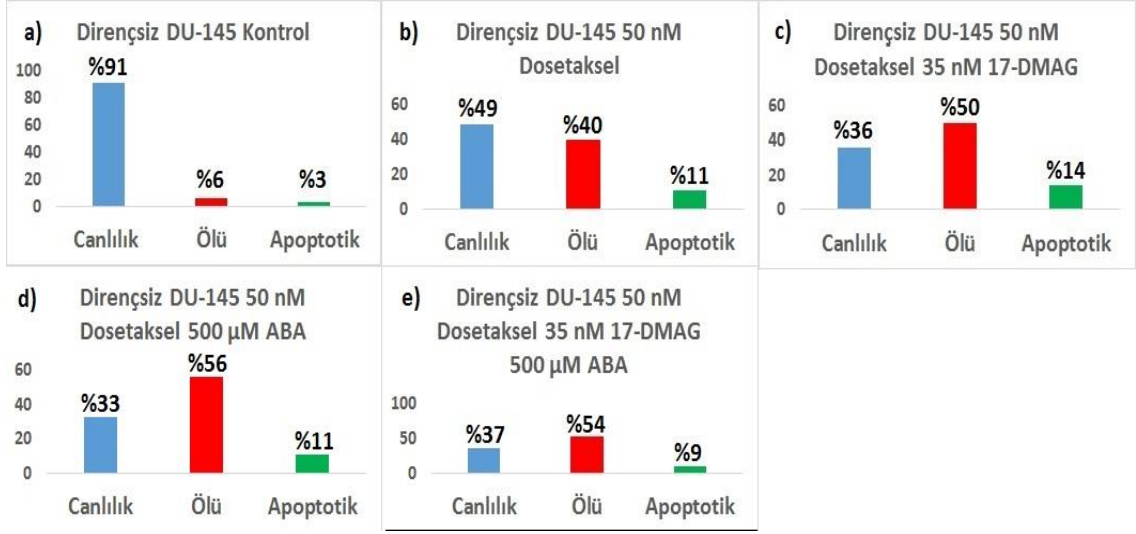
#### 4.4. TALI Görüntüleme Tabanlı Sitometre Analizleri

Çalışmada dirençsiz ve MDR'li DU-145 hücre hatlarına dosetakselin tek başına, dosetaksel ve 17-DMAG'ın birlikte, dosetaksel ve ABA'nın birlikte, dosetaksel ve 17-DMAG ve ABA'nın birlikte IC50 dozlarının uygulanmasına bağlı canlı ve ölü hücreleri hem görüntülemek hemde miktarlarını hesaplamak amacıyla TALI görüntü temelli sitometre analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler aşağıda gösterilmiştir.

##### 4.4.1. Dirençsiz DU-145 Hücre Hattında TALI Görüntü Temelli Sitometre Analizleri

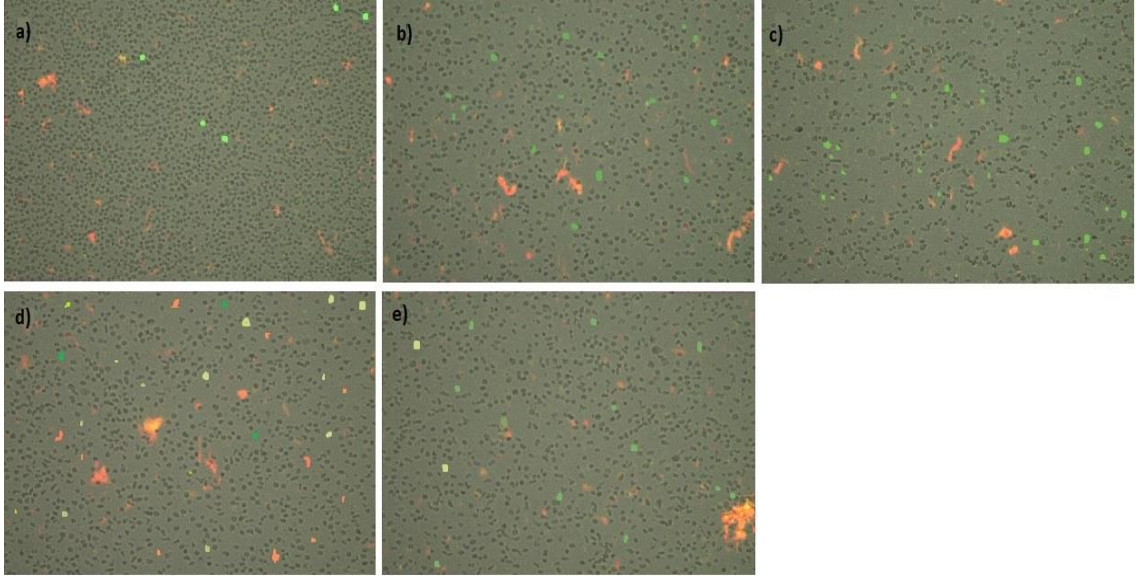
Dirençsiz DU-145 hücre hattına; 50 nM dosetaksel tek başına, 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG birlikte, 50 nM dosetaksel ve 500  $\mu$ M ABA birlikte, 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG ve 500  $\mu$ M ABA birlikte 24 saat süreyle uygulanmıştır. 24 saat sonunda TALI görüntü temelli sitometre analizleri yapılmıştır. Analiz neticeleri Şekil 4.162. ve Şekil 4.163.'te gösterilmiştir.





**Şekil 4.162.** a) Kontrol, b) 50 nM dosetaksel, c) 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG, d) 50 nM dosetaksel ve 500 µM ABA, e) 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500 µM ABA 24 saat süreyle uygulanmış dirençsiz DU-145 hücre hattında canlı, ölü ve apoptotik hücre miktarları.

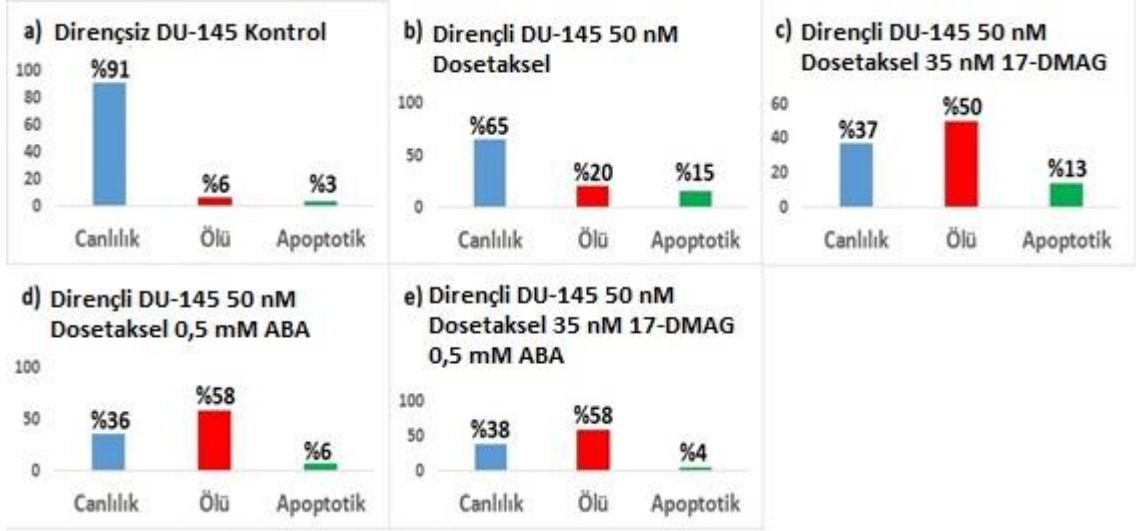
Şekil 4.162.'de görüldüğü gibi dirençsiz DU-145 hücre hattı üzerinde dosetaksel ile 17-DMAG'ın birlikte %50 ölüm, %14 apoptotik etkisi, dosetaksel ile ABA'nın birlikte %56 ölüm, %11 apoptotik etkisi varken üç maddenin birlikte uygulanmasına bağlı %54 ölüm ve %9 apoptotik etki görülmektedir. 17-DMAG ile ABA'nın birlikte kullanılmasına bağlı ölüm etkisi, ABA'nın tek başına kullanılmasına bağlı ölüm etkisinden daha düşük ve birlikte gösterdikleri apoptotik etki her iki maddenin ayrı ayrı kullanılmasına bağlı apoptotik etkiden daha düşüktür.



**Şekil 4.163.** a) Kontrol, b) 50 nM dosetaksel, c) 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG, d) 50 nM dosetaksel ve 500  $\mu$ M ABA, e) 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG ve 500  $\mu$ M ABA 24 saat süreyle uygulanmış dirençsiz DU-145 hücre hattında canlı hücreler koyu renkli, ölü hücreler kırmızı- sarı renkli, apoptotik hücreler yeşil renkli görülmektedir.

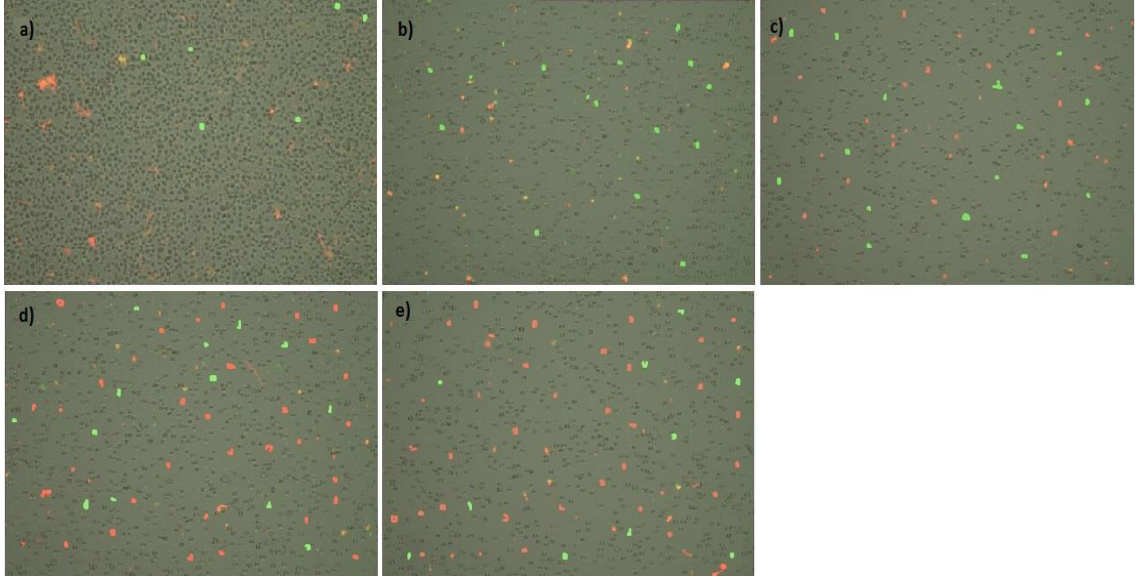
#### **4.4.2. MDR'li DU-145 Hücre Hattında TALI Görüntü Temelli Sitometre Analizler**

Dirençli DU-145 hücrelerine; 50 nM dosetaksel tek başına, 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG birlikte, 50 nM dosetaksel ve 500  $\mu$ M ABA birlikte, 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG ve 500  $\mu$ M ABA birlikte 24 saat süreyle uygulanmıştır. 24 saat sonunda TALI görüntü temelli sitometre analizleri yapılmıştır. Kontrol olarak dirençsiz DU-145 hücre hattına madde uygulanması yapılmayan analiz neticesi kullanılmıştır. Analiz neticeleri Şekil 4.164. ve Şekil 4.165.'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.164.** a) Kontrol, b) 50 nM dosetaksel, c) 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG, d) 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA, e) her üç maddenin 24 saat süreyle dirençli DU-145 hücre hattına uygulanmasına bağlı canlı, ölü ve apoptik hücre miktarı.

Şekil 4.164.'te dirençli DU-145 hücre hattı üzerinde dosetaksel ile 17-DMAG birlikte %50 ölüm, %13 apoptotik etki, dosetaksel ile ABA birlikte %58 ölüm, %6 apoptotik etkileri gösterilmiştir. 17-DMAG ve ABA'nın birlikte kullanılmasıyla %58 ölüm ve %4 apoptotik etki görülmektedir. 17-DMAG ile ABA'nın birlikte kullanılmasına bağlı ölüm etkisi, ABA'nın tek başına kullanılmasına bağlı ölüm etkisiyle aynı ve birlikte gösterdikleri apoptotik etki her iki maddenin ayrı ayrı kullanılmasına bağlı apoptotik etkiden daha düşüktür.

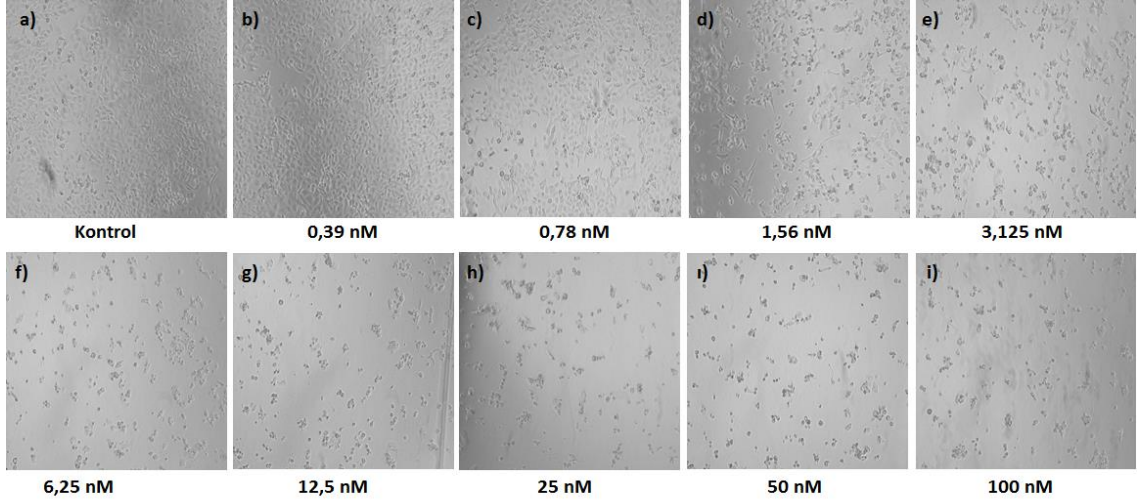


**Şekil 4.165.** a) Kontrol, b) 50 nM dosetaksel, c) 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG, d) 50 nM dosetaksel ve 500  $\mu$ M ABA, e) 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG ve 500  $\mu$ M ABA 24 saat süreyle uygulanmış dirençli DU-145 hücreleri.

#### **4.5. Mikroskop Görüntüleri**

##### **4.5.1. Dosetaksel ve Mitoksantronun Dirençsiz DU-145 Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin Işık Mikroskopunda Gösterilmesi**

Dirençsiz DU-145 hücre hattı üzerinde 0-100 nM dosetaksel ile mitoksantronun birlikte 72 saat uygulanmasına bağlı hücre miktarında meydana gelen değişimler Şekil 4.166.'da verilmiştir.



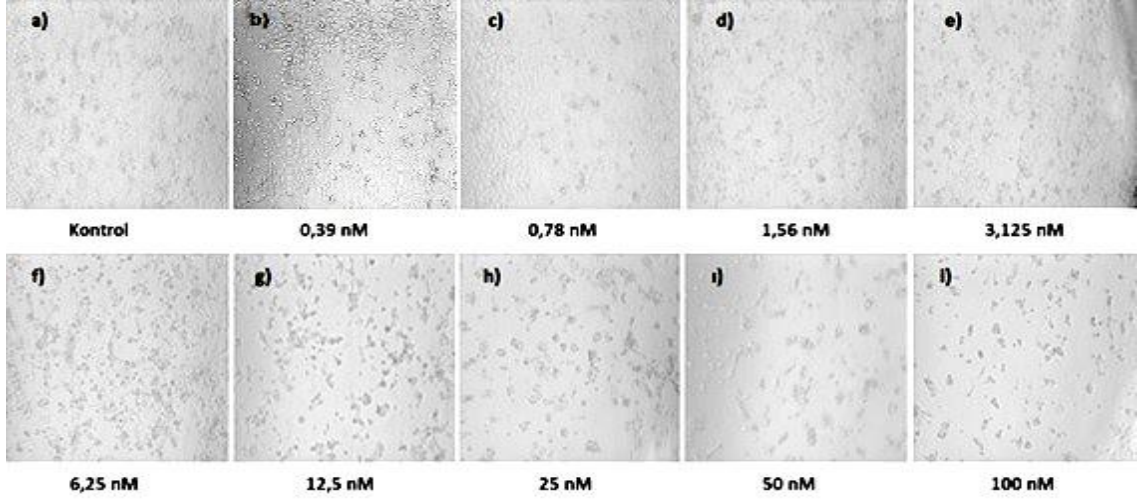
**Şekil 4.166.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 0,39-100 nM dozetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanması neticesinde hücre miktarlarının ışık mikroskobunda görüntülenmesi (20X).

MTT analizi sonuçlarına göre dozetaksel ve mitoksantronun birlikte farklı dozlarının 72 saat süreyle uygulanması neticesinde IC50 değeri 6,25 nM (Şekil 4.166. f) olarak tespit edilmiştir.

#### **4.5.2. DU-145 Hücre Hattında Direnç Oluşturma Çalışmalarının Işık Mikroskobu Görüntüleri**

Dirençsiz DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca dozetaksel ile mitoksantronun 6,25 nM'lık dozu birlikte uygulanmıştır. 5. pasajın sonunda her iki ilacın birlikte uygulanmasına bağlı hücre miktarında meydana gelen değişimler Şekil 4.167.'da gösterilmiştir.





**Şekil 4.167.** Dirençsiz DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca 6,25 nM dosetaksel ile mitoksantron birlikte uygulanmıştır. 5. pasaj sonunda 72 saat süreyle 0,39-100 nM dosetaksel ile mitoksantronun birlikte dirençli DU-145 hücre hattına uygulanmasına bağlı hücre miktarlarının ışık mikroskobunda görüntülenmesi (20 X).

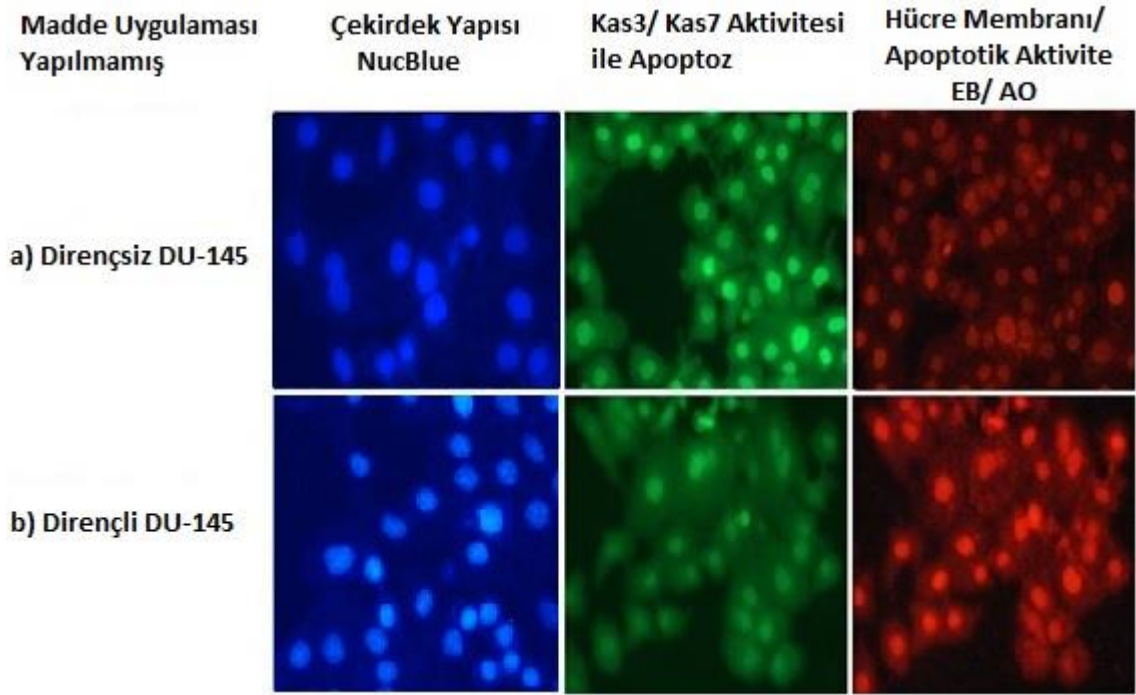
MTT analizi sonuçlarına göre dirençsiz DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasından sonra dirençli hücre hattında oluşan IC50 dozu 50 nM (Şekil 4.167. 1) olarak hesaplanmıştır.

#### **4.5.3. Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması**

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerine madde uygulanmadan ve 48 saat süreyle madde kombinasyonlarının uygulanmasına bağlı olarak sağ kalım, apoptoz ve kaspaz aktivitesini araştırmak amacıyla floresan mikroskop analizleri yapılmıştır.

##### **4.5.3.1. Madde Uygulaması Yapılmadan Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması**

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerine madde uygulaması yapılmadan, hücrelerin çekirdek ve membran yapılarının floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.168.'de gösterilmiştir.

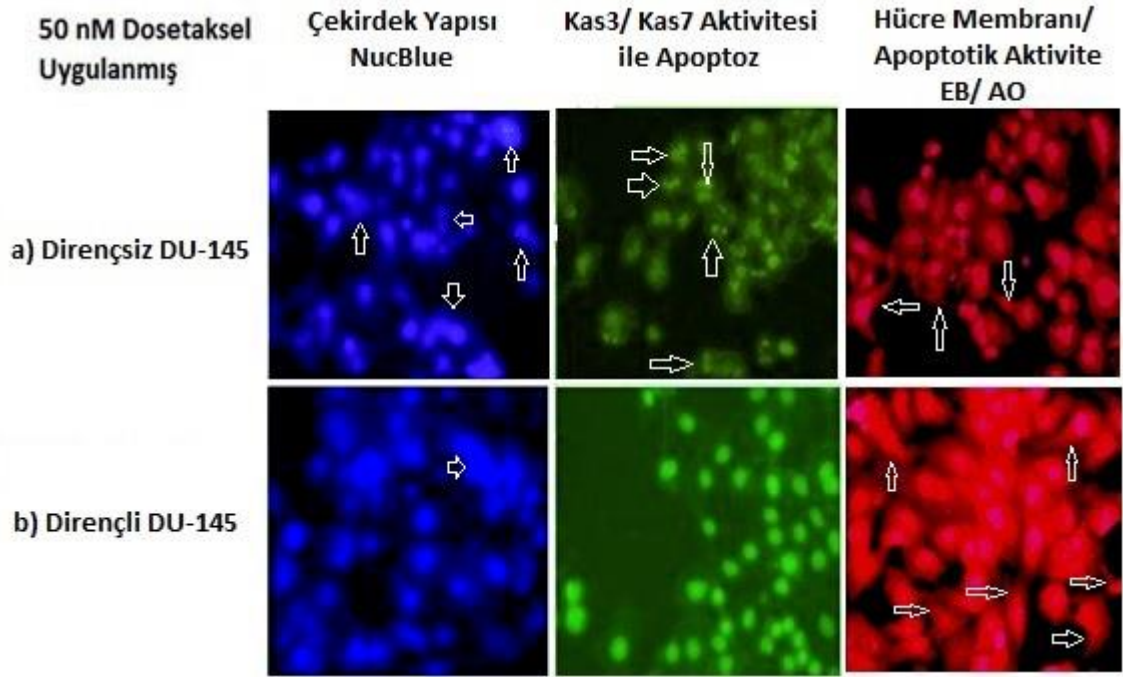


**Şekil 4.168.** Madde uygulaması yapılmamış dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarının floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması (20X).

Şekil 4.168. a) ve b)'de birinci sırada hücrelerin çekirdek yapısını gösteren Nucblue, ikinci sırada kaspaz aktivitesine bağlı apoptozun meydana gelip gelmediğini gösteren Kas 3/ Kas7, üçüncü sırada hücre membran yapısında meydana gelen apoptotik aktiviteyi gösteren Ethidium Bromide/Acridine Orange (EB/AO) boya ile boyanmıştır. Hücrelere herhangi bir madde uygulaması yapılmadığı için hem çekirdek yapısının hemde hücre membran yapısının bozulmadığı görülmektedir.

#### 4.5.3.2. 50 nM Doksetel Uygulanması Neticesinde Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarına 50 nM dosetaksel 48 saat süreyle uygulanmasına bağlı hücre yapılarında meydana gelen değişimlerin karşılaştırılması Şekil 4.169.'da gösterilmiştir.



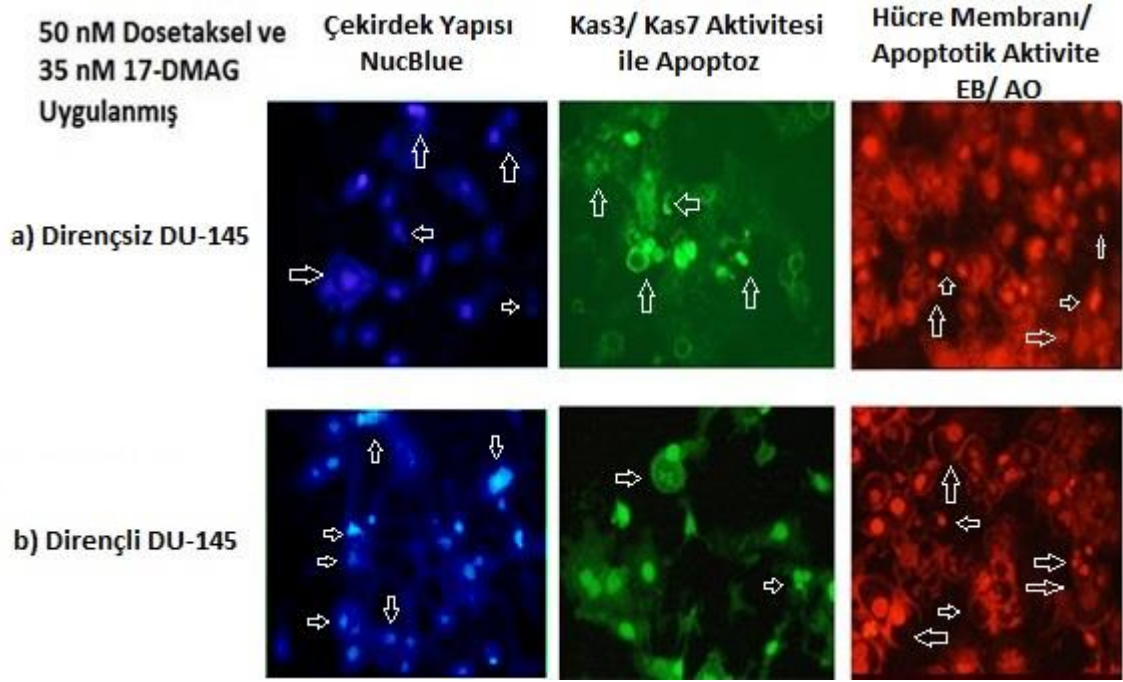
**Şekil 4.169.** 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel uygulaması yapılmış dirençsiz ve dirençli hücre hatlarının floresan mikroskobu görüntülerinin karşılaştırılması (20X).

Şekil 4.169 a)'da dirençsiz DU-145 hücre hattında dosetaksel uygulamasına bağlı çekirdekte dağınıklar görülürken b)'de çekirdek yapısının korunmuş olduğu görülmektedir. Bununla birlikte kaspaz aktivitesine bağlı hücre membranı yapısında hem dirençsiz hemde dirençli hücre hattında bozulmalar görülmektedir.

#### 4.5.3.3. 50 nM Doksetaksel ve 35 nM 17-DMAG'ın Birlikte Uygulanması Neticesinde Dirençli ve Dirençsiz DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması

Dirençsiz ve MDR'li DU-145 hücre hatlarına 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG'ın birlikte 48 saat süreyle uygulanmasına bağlı hücre yapılarında meydana gelen değişimlerin karşılaştırılması Şekil 4.170.'te gösterilmiştir.



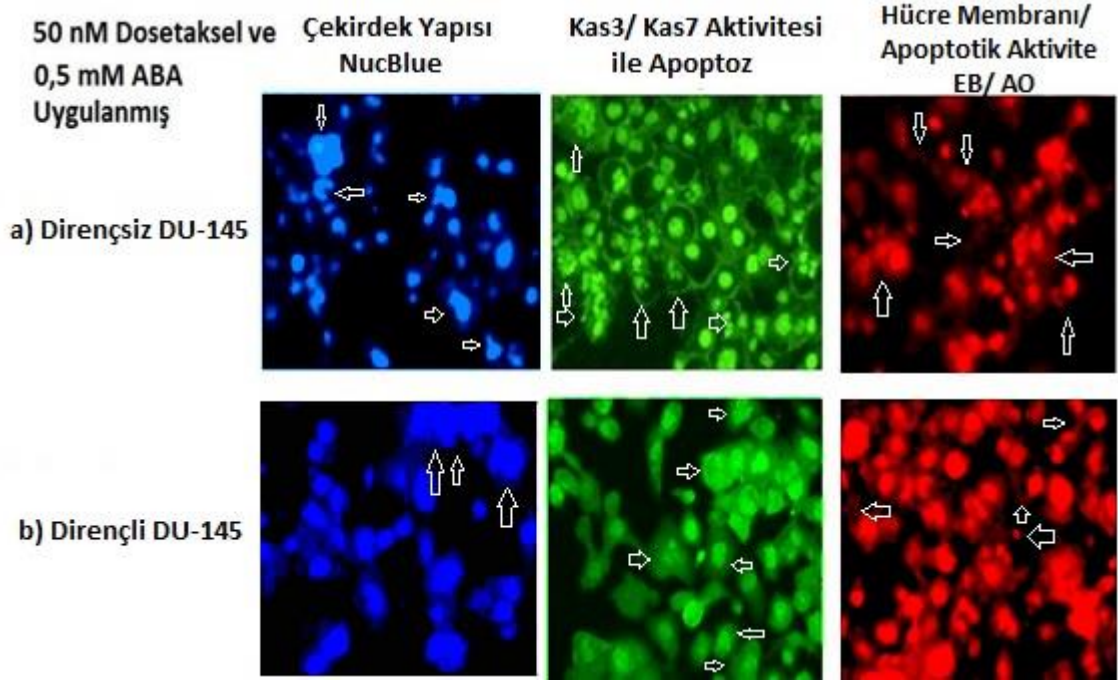


**Şekil 4.170.** 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG'ın birlikte uygulamasına bağlı dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması (20X).

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarında dosetaksel ve 17-DMAG'ın birlikte uygulanmasına bağlı hem çekirdek yapısında hemde hücre membranında meydana gelen bozulmalar görülmektedir.

#### 4.5.3.4. 50 nM Doksetaksel ve 500 µM ABA'nın Birlikte Uygulanması Neticesinde Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması

Dirençsiz ve dirençlili DU-145 hücre hatlarına 50 nM dosetaksel ve 500 µM ABA'nın birlikte 48 saat süreyle uygulanmasına bağlı hücre yapılarında meydana gelen değişimlerin karşılaştırılması Şekil 4.171.'de gösterilmiştir.

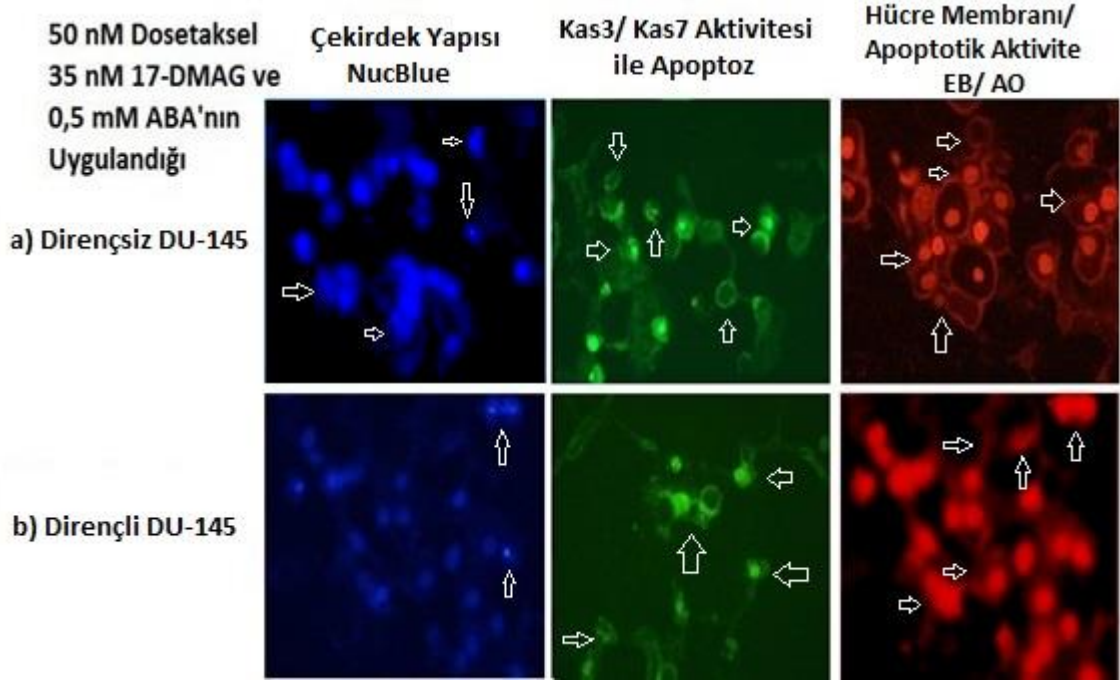


**Şekil 4.171.** 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel ve 500 µM ABA'nın birlikte uygulamasına bağlı dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması (20X).

Şekil 4.171.'de dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarında dosetaksel ve ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı hem çekirdek yapısında hemde hücre membranında meydana gelen bozulmalar görülmektedir.

#### 4.5.3.5. 50 nM Doksetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500 µM ABA'nın Birlikte Uygulanması Neticesinde Dirençsiz ve Dirençli DU-145 Hücrelerinin Floresan Mikroskop Görüntülerinin Karşılaştırılması

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarına 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500 µM ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı hücre yapılarında meydana gelen değişimlerin karşılaştırılması Şekil 4.172.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.172.** 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500 µM ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı olarak dirençsiz ve dirençli DU-145 hücrelerinin floresan mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması (20X).

Doksetsel, 17-DMAG ve ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı özellikle dirençsiz DU-145 hücre hattının hücre membranında bozulma görülmekle birlikte bu bozulma dirençli hücre hattında daha az görülmektedir. Buna karşın bu üç maddenin birlikte uygulanmasına bağlı hem dirençsiz hemde dirençli hücre hattının çekirdek yapısındaki bozulmalar görüldüğü gibi son derece azdır.

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Son zamanlarda batı ülkelerinde prostat kanseri teşhisinde azalma olmasına rağmen bu kanser türü halen beş erkekte bir görülmekte ve ölüme neden olmaktadır (Siegel, Miller & Jemal, 2018). Dünyada prostat kanseri vakası gelişmekte olan ülkelerde artarken, coğrafik bölgelerde en az görülme sıklığı Asya'ya aittir (Zhou vd., 2016).

Tipik olarak prostat kanserine ilk müdahale olarak androjenden yoksun bırakma tedavisi (ADT) uygulanmaktadır. Birçok hasta başlangıçta ADT'ye olumlu yanıt verirken sonradan bu tedaviye karşı direnç gelişimi ile kısır edici dirençli prostat kanseri meydana gelmekte ve bu hastalar için diğer tedavi metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Bluemn vd., 2017; Edlind & Hsieh, 2014; Pening, 2015; Zhu vd., 2015). Çoğu zaman tedavi yöntemi olarak mikrotübülleri sabit hale getiren taksanlara başvurulmaktadır. Taksanlar hücre döngüsünü G2/M evresinde durdurarak apoptozu teşvik ederler (Fitzpatric & de Vit, 2014; Gan vd., 2009; Lee vd., 2007). Dosetaksel birinci sınıf taksanlar arasında yer almaktadır. Dosetaksel, prednizon ile kombine edilerek prostat kanserli bireylerde yaşam süresini uzatmak amacıyla geliştirilmiş bir taksandır (Tannock vd., 2004). Taksanlar toksik (özellikle nötropenya ve periferik nöropatiye neden olduklarından) etkili olduklarından ve bu ilaçlara direnç geliştirilebildiğinden dolayı halen tedavide yeterli etkiye sahip değildirler (Bumbaca & Li, 2018).

Mitoksantron prostat kanseri tedavisinde tamamlayıcı etkisinden dolayı taksanlarla birlikte kullanılmaktadır. Ancak kanser hücrelerinin zamanla mitoksantrona karşı direnç geliştirmesinden (özellikle P-gP aracılığı ile mitoksantronu hücre dışına

pompalama) ve son derece hepatotoksik etkiye sahip olmasından dolayı tedavi açısından her zaman yeterli olamamaktadır (Llesuy & Arnaiz, 1990).

Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda dosetaksel ve mitoksantrona karşı birlikte çoklu ilaç direnci geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için ilk önce dosetaksel ve mitoksantronun DU-145 hücreleri üzerinde ayrı ayrı ve birlikte ölümcül etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat süreyle dosetakselin 0,39-200 nM aralığındaki dozları uygulanmıştır. Uygulamalar sonunda yapılan MTT analizlerinden elde edilen veriler probit istatistiksel analiziyle değerlendirilmiştir. Probit analizine göre IC50 değerleri; 24 saatlik uygulama için 326,94 nM, 48 saat için 64,28 nM ve 72 saat için 54,57 nM olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalarda en uygun sürenin 72 saat olmakla birlikte IC50 dozunun bu çalışmalara göre 0,47-8,2 nM aralığında değiştiği bildirilmiştir (Kuçukzeybek vd., 2008; Mansour vd., 2018; Tsakalozou, Eckman & Bae, 2012). Çalışmaya, bu kaynaklarda belirtilen ortak süre olan 72 saat için elde edilen IC50 dozuyla devam edilmiştir.

Mitoksantron için de aynı şekilde 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar yapılmıştır. IC50 dozu 24 saat için 89,22 nM, 48 saat için 52,85 nM ve 72 saat için 51,12 nM olarak hesaplanmıştır. Hui-Ping ve arkadaşlarının, prostat kanseri hücre hatları olan LNCap, PC3 ve DU-145 hücre hatları üzerinde mitoksantron, vinblastin, etopozid, paklitaksel, AG1478, LY294002, sarakatinib ve BCL-2 inhibitör ajanlarının etkilerini araştırmak üzere yaptıkları bir çalışmada, mitoksantronun DU-145 hücreleri için IC50 dozunu 72 saatlik uygulama için 8,47 nM olarak hesaplamışlardır (Hui-Ping vd., 2013).

Çalışmanın ilk amacı çoklu ilaç direnci meydana getirmek olduğu için her iki ilaca karşı da direnç geliştirilmesi planlanmıştır. Bunun için doestaksel ve mitoksantronun her birinin eşit konsantrasyonda olacağı bir karışım hazırlanmıştır. Karışım DU-145 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat süreyle 0,39-100 nM doz aralığında uygulanmıştır. IC50 değerleri 24 saatlik uygulama için 10,92 µM, 48 saat için 47,55 nM ve 72 saat için 6,39 nM olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle 6,25 nM dozu 5 pasaj boyunca Şekil 3.11.'de belirtildiği biçimde DU-145 hücre hattına uygulanılarak çoklu ilaç direnci oluşturulması hedeflenmiştir. 5. pasaj sonunda yapılan MTT analizi neticesinde dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulanmasına bağlı IC50 değeri 54,87 nM olarak

hesaplanmıştır. 6,25 nM'dan 54,87 nM'a olan bu artış DU-145 hücre hattında çoklu ilaç direnci oluşturulduğunu göstermektedir. Mohr ve arkadaşları da DU-145 hücre hattında dosetaksel ile ilaç direnci geliştirmek amacı ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, ilk olarak DU-145 hücre hattına dosetakselin 1-1000 nM dozlarını 72 saat süre ile uygulamaları neticesinde IC50 değerini 5 nM olarak hesaplamışlardır. İki hafta boyunca 72 saatte bir taze besiyeriyle değiştirilmek üzere 5 nM dostaksel-besiyeri karışımını DU-145 hücre hattına uygulamışlardır. İki haftanın sonunda bir kez 24 saat süreyle 5 nM dosetaksel-besiyeri karışımı uyguladıktan hemen sonra 2X IC50 değeri olan 10 nM dosetaksel-besiyeri karışımı uygulamışlardır. Bu işlemlerin sonunda direnç oluşturulduğu düşünülen DU-145 hücre hattına 72 saat süre ile 500 nM dosetaksel uyguladıklarında %90, 1000 nM uygulamada ise %20 canlılık gözlemlemişlerdir (Mohr vd., 2017). Bu durum tez çalışmamızda DU-145 hücre hattına düzenli aralıklar ile dosetaksel ve mitoksantron uygulanmasına bağlı gelişen direnç ile benzerlik göstermektedir.

Oluşturulan bu direncin sürekli olup olmadığını araştırmak için direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca herhangi bir madde uygulanmamıştır. 5. pasaj sonunda yapılan MTT analizi neticesinde IC50 değeri 50,7 nM olarak hesaplanmıştır. İlaç uygulamasına devam edilirken IC50 değerinin, ilaç uygulaması bırakıldıktan sonraki IC50 değerine bu kadar yakın olması, hücre hatında meydana gelen çoklu ilaç direncinin sürekli olduğunu göstermektedir. Bu durumu ispatlamak için çoklu ilaç direnci oluşturulan DU-145 hücre hattına 72 saat süreyle 1-500 nM dosetaksel ve mitoksantron ayrı ayrı uygulanmıştır. Yapılan MTT analizi sonucunda 500 nM dosetaksel uygulamasında %55,42 oranında canlılık olduğu tespit edilmiştir. Dosetakselin direnç meydana geldiği düşünülen DU-145 hücre hattının IC50 değerini hesaplamak için probit analizi yapılmıştır. IC50 değeri 808,54 nM olarak hesaplanmıştır. Mohr ve arkadaşları da DU-145 hücre hattına 72 saat süre ile dosetakselin farklı konsanrasyonlarını uygulamışlardır. Bu uygulama neticesinde IC50 değerinin 5 nM olduğunu, buna karşılık direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına 500 nM dosetaksel uygulanmasında %90 canlı hücre varlığını rapor etmişlerdir (Mohr vd., 2017). Bununla birlikte dirençsiz DU-145 hücre hattında mitoksantronun 72 saatlik uygulaması neticesinde elde edilen IC50 değeri 51,12 nM iken çoklu ilaç direnci geliştirildiği düşünülen DU-145 hücre hattında bu değer 61,53 nM'a yükselmiştir. Calcagno ve arkadaşları MCF-7 göğüs kanseri hücre hattına 72 saat süre ile mitoksantron uygulamasına bağlı IC 50 değerini 15,6±6 nM olarak

hesaplamışlardır. Calcagno ve ekibi tekrarlı olarak MCF-7 hücre hattına 72 saat süre ile 14 ve 21 nM mitoksantron uygulayarak dirençli klonlar oluşturmuşlar ve bu klonları; 14 nM clone 1, 14 nM clone 2, 14 nM clone 6, 14 nM clone 11, 14 nM clone 13, 14 nM clone 16 ve 21 nM clone 1 olarak isimlendirmişlerdir. Bu klonların IC50 değerlerini sırasıyla; 33,1, 15,4, 319,1, 158,6, 220,1, 172,4, 1407 nM olarak hesaplamışlardır (Calcagno vd., 2008). Görüldüğü gibi MCF-7 hücre hattında 14 nM clone 2 haricinde diğer bütün uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı artışlar mevcuttur. Tez çalışmamızda da DU-145 hücre hattına 72 saat süre ile 5 pasaj boyunca mitoksantron uygulamanmasına bağlı IC50 değerinde artış olmasına rağmen, bu artış miktarının (51,12 nM'dan 61,53 nM'a). Calcagno ve arkadaşlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmalardan elde edilen değerler kadar yüksek olmadığı görülmektedir. Bu durumun farklı kanser hücrelerinin mitoksantrona verdiği yanıtta kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarına dosetaksel ve mitoksantron uygulanarak; çoklu ilaç direnci, sağ kalım genleri ve onkogenlerin ifadelerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır.

Dirençsiz DU-145 hücre hattına dosetaksel ve mitoksantronun 24 saatlik uygulaması neticesinde çoklu ilaç direnci genlerinden; BCRP/ MXR1'in ( $2,26 \pm 0,5$  kat), P-gP/MDR1'in ( $32,14 \pm 0,21$  kat), MRP1'in ( $1,64 \pm 0,28$  kat), MRP2'nin ( $2,82 \pm 0,58$  kat), MRP3'ün ( $1,96 \pm 0,29$  kat), MRP4'ün ( $1,58 \pm 0,78$  kat), MVP/LRP'nin ( $2,06 \pm 0,48$  kat) ifadelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar görülmüştür. Ayrıca 6 saatlik uygulama neticesinde P-gP/MDR'in (kontrole göre  $2,15 \pm 0,39$  kat) gen ifadesi seviyesinde artış olduğu saptanırken; 0, 3 ve 6 saatlik uygulamalar neticesinde diğer direnç genlerinin ifadelerinde anlamlı değişimler olmamıştır. Zuylen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, rahim kanseri türü olan A2780 hücrelerine 48 saat süre ile dosetaksel ve mitoksantron uygulanmasına bağlı P-gP/MDR1 ve MRP1 çoklu ilaç direnci genlerinin ifade seviyelerinde kontrole göre 2,4 kat artış olduğu rapor edilmiştir (van Zuylen vd., 2000). Machioka ve arkadaşları dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süre ile dosetakselin farklı dozlarını uygulamaları neticesinde IC50 dozunu 7,06 nM olarak hesaplamışlardır. Machioka ve ekibi, 7,06 nM dosetakseli hem dirençli olmayan hemde dosetakselle karşı dirençli olan DU-145 hücre hattına 48 saat süre ile uygulayarak çoklu ilaç direnci genlerinin ifadelerinde meydana gelen değişimleri mikroarray çalışmaları aracılığı ile araştırmışlardır. Yapılan çalışmada dirençsiz DU-145 hücre hattı, kontrol

hücre hattıyla karşılaştırıldığında; P-gP/MDR1 ifadesi'nin 0,02 kat, MRP1'in 1,24, MRP2'nin 7,57 kat, MRP3'ün 5,45 kat, MRP4'ün 0,37 kat, MRP5'in 2,45 kat ifade olduğu tespit etmişlerdir. Buna karşılık dosetaksele karşı dirençli olan DU-145 hücre hattında kontrole göre; P-gP/MDR1'in 12,63 kat, MRP1'in 0,71 kat, MRP2'nin 0,22 kat, MRP3'ün 5,45 kat, MRP4'ün 0,45 kat, MRP5'in 1,61 kat ifade olduğu bildirilmiştir (Machioka vd., 2018). Buna karşılık kabazitaksel ile dosetakselin birlikte uygulamasına bağlı kontrole göre P-gP/MDR1'in 14,7 kat, MRP1'in 0,69 kat, MRP2'nin 1,22 kat, MRP3'ün 3,58 kat, MRP4'ün 0,47 kat ifade olduğu belirtilmiştir (Machioka vd., 2018). Bu çalışmada özellikle MRP2 ve MRP3'ün ifadelerine bakıldığında; MRP2'nin ifadesinde dosetaksel ve kabazitakselin birlikte kullanılmasına bağlı bir artış mevcut iken MRP3'te tam tersi bir etki olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu veriler; DU-145 hücre hattında çoklu ilaç direnci oluşturmak için dosetaksel ile mitoksantronun birlikte, dosetaksel ile kabazitakselin birlikte uygulamasına göre çoklu ilaç direnci genlerini aktif hale getirmesi açısından daha etkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda dirençsiz DU-145 hücre hattına 5 pasaj boyunca 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantronun birlikte uygulandıktan sonra çoklu ilaç direnci genlerinin ifadeleri araştırılmıştır. 24 saatlik uygulama neticesinde kontrole göre BCRP/ABCG2'nin ( $2,94 \pm 0,22$  kat), P-gP/MDR1'in ( $7,15 \pm 0,07$  kat), MRP1'in ( $1,33 \pm 0,002$  kat), MRP2'nin ( $3,22 \pm 0,1$  kat), MRP3'ün ( $2,96 \pm 0,27$  kat), MRP4'ün ( $3,78 \pm 0,54$  kat), MVP/LRP'nin ( $1,98 \pm 0,54$  kat) gen ifadelerinde artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca 6 saatlik uygulama neticesinde kontrole göre P-gP'nin ( $3 \pm 0,07$  kat), MRP2'nin ( $1,77 \pm 0,35$  kat) ve MRP4'ün ( $1,38 \pm 0,04$  kat) gen ifadelerinde de istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu görülmüştür. Bununla birlikte kontrole göre P-gP/MDR1'in ( $2,52 \pm 0,15$  kat) 3 saatlik uygulama neticesinde gen ifadesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında görüldüğü gibi bütün çoklu ilaç direnci genlerinin ifadesinde artış mevcut iken; Machiako ve ekibinin DU-145 hücre hattına 72 saat dosetaksel uygulaması neticesinde; MRP1 gen ifadesini kontrole göre 0,71 kat, MRP2'yi 0,22 kat, MRP4'ü 0,45 kat olarak hesaplamışlardır (Machiako vd., 2018).

Çoklu ilaç direnci genlerinin ifadeleri incelendikten sonra; dirençsiz, direnç oluşturulan ve oluşturulan direncin korunduğu DU-145 hücre hatlarında; onkogen, sağ kalım ve apoptoz inhibitör genlerinin ifadeleri de araştırılmıştır. Dirençsiz DU-145 hücre hattına dosetaksel ve mitoksantronun 6,25 nM konsantrasyonunun 24 saat uygulanması



neticesinde kontrole göre BCL-2 ( $3,24\pm0,5$  kat), Survivin ( $3,01\pm0,64$  kat), CIAP1 ( $12,88\pm4,28$  kat) ve XIAP ( $9,69\pm2,97$  kat) gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmuştur. Buna karşılık kontrole göre Livin ( $0,34\pm0,14$  kat) gen ifadesinde azalma olmuştur. Bununla birlikte 6 saatlik uygulama neticesinde kontrole göre CIAP1 ( $3,19\pm0,3$  kat) ve XIAP ( $5,12\pm0,71$  kat) gen ifadelerinde artışlar olurken Livin ( $0,62\pm0,18$  kat) gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana gelmiştir. Direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına yapılan 24 saatlik uygulama neticesinde kontrole göre BCL-2 ( $5,9\pm0,2$  kat), Livin ( $4,87\pm0,42$  kat), Survivin ( $4,04\pm0,23$  kat), CIAP1 ( $4,15\pm0,88$  kat) ve XIAP ( $4,15\pm0,1$  kat) gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmuştur. Dirençli DU-145 hücrelerine yapılan 6 saatlik uygulamada kontrole göre BCL-2 ( $3,8\pm0,1$  kat), Livin ( $3,02\pm0,56$  kat), Survivin ( $1,47\pm0,1$  kat) ve CIAP1 ( $1,47\pm0,05$  kat) gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmuştur. 3 saatlik uygulamada kontrole göre BCL-2 ( $3,15\pm0,36$  kat) ve Livin ( $1,52\pm0,13$  kat) gen ifadeleri artmıştır. Dirençsiz DU-145 hücre hattına yapılan dosetaksel ve mitoksantron uygulamasına bağlı Livinin gen ifadesinde düşüş gözlemlenirken direnç oluşturulmuş DU-145 hücre hattında Livinin gen ifadesinin artması uygulanan maddelere karşı sağ kalım genlerinin dirençli hücre hattında daha etkin olduğunu göstermektedir. Direnç oluşturulduktan sonra herhangi bir uygulama yapılmaksızın 5 pasaj boyunca dirençli hücre hattı pasajlandıktan sonra dosetaksel ve mitoksantronun IC50 dozu 24 saat süreyle uygulandıktan sonra; BCL-2'nin gen ifadesinde anlamlı bir değişim saptanamamıştır. Buna karşılık 24 saatlik uygulamaya bağlı kontrole göre Livinin ( $24,94\pm0,82$  kat), Survivinin ( $4,68\pm1,08$  kat), CIAP1'in ( $9,39\pm0,18$  kat) ve XIAP'ın ( $4,06\pm0,12$  kat) gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Üstelik bu artışlar 3 ve 6 saatlik uygulamalar için de benzer özellik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda CIAP1, XIAP ve Survivinin yakın ilişki içinde olduğu ve bu üç genin karsinogenezi teşvik ederek kemoterapiye karşı direnç oluşturdukları ileri sürülmüştür (Arora, 2007; Nachimas, Ashhab& Ben-Yehuda, 2004; Nomura vd., 2003). Bu çalışma, tez çalışmamızda CIAP1, XIAP ve Survivinin gen ifadelerindeki artışlarla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte taksanlarla ilgili yapılan diğer bir çalışmada ilginç olarak DU-145 hücrelerinin paklitaksele karşı doğal dirençli oldukları ve BCL-2'nin gen ifadesinde bu ilaca karşı herhangi bir değişim meydana gelmediği belirtilmiştir (Haldar, Chintapalli & Croce, 1996). Direnç oluşturulduktan sonra 5 pasaj herhangi bir madde uygulanmadıktan sonra

dirençli DU-145 hücre hattına IC50 dozunun uygulanmasına bağlı BCL-2'nin gen ifadesinde herhangi bir değişimin olmaması bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

Dirençsiz ve direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına 24 saat 0,39-100 nM dosetaksel ve mitoksantronun uygulanmasından sonra elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.166. ve Şekil 4.167.'de karşılaştırılmıştır. Bu görüntülerde dirençsiz ve direnç oluşturulan hücre hatlarına aynı dozlarda uygulanan dosetaksel ve mitoksantrona bağlı hücre miktarındaki değişimler mevcuttur. Buna göre dirençsiz DU-145 hücre hattı için IC50 dozunun 6,25 nM olduğu Şekil 4.166. f)'de, direnç oluşturulan DU-145 hücre hattında IC50 dozunun 50 nM olduğu Şekil 4.167. ı)'da gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda prostat kanseri tedavisinde kullanılan dosetakselin; çoklu ilaç direnci ailesi genlerinden olan P-gp'yi ve ABCC4 (MRP4)'ün ifade seviyesini arttırarak dosetakselle karşı direnç olduğu gösterilmiştir (Oprea-Lager vd., 2013; Sissung vd., 2008). Fukushima ve arkadaşları, insan lenfoblast K-562 hücrelerine 0,2-0,4 µM mitoksantron uygulamışlardır. Bu uygulama neticesinde, hücre içinde mitoksantron birikmesinde kontrole göre 3- 43,9 kat azalma olmasına karşılık P-gp'nin aşırı ifade olduğunu bildirmişlerdir (Fukushima vd., 2000). Bununla birlikte mürin transgenik hücrelerinin alternatif topoizomeraz II aktivitesi oluşturarak, P-gp/MDR1 tarafından mitoksantronu hücre dışına pomalayarak ona karşı direnç geliştirdikleri rapor edilmiştir (Errington vd., 1999; Harker vd., 1995a; Harker vd., 1995b; Harker vd., 1991; Zhou vd., 1999). Bu tez çalışmasında da; dirençsiz DU-145 hücre hattına 6,25 nM dosetaksel ve mitoksantron birlikte uygulandığında Şekil 4.39.'da görüldüğü gibi P-gp ifadesi 6. ve 24. saatlerde artmıştır. Buna karşılık Şekil 4.51.'de dirençli DU-145 hücre hattında 6. ve 24. saatlerde artış meydana gelmesiyle birlikte 3. saatte de P-gp'nin ifadesinde artma olmuştur. Ayrıca Şekil 4.43.'te dirençsiz DU-145 hücre hattında MRP4 ifade seviyesinde 24. saatte artış görülmesine karşılık Şekil 4.55.'te dirençli hücre hattında 6. ve 24. saatlerde MRP4 ifadesinde artışlar gösterilmiştir. Bu durumlar dirençsiz DU-145 hücre hattında IC50 dozunun 6,25 nM olmasına karşı dirençli DU-145 hücre hattında bu dozun neden 50 nM'a yükseldiğini açıklamaktadır.

Şekil 4.169.'da dirençsiz ve direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel uygulanmasına bağlı elde edilen floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir. Dirençsiz DU-145 hücre hattında apoptotik aktiviteye bağlı olarak hem

çekirdek yapısında, hem de hücre membranında dağılıma görülürken direnç oluşturulan hücre hattının çekirdek yapısının korunduğu, buna karşılık hücre membran yapılarında bozulmalar olduğu gösterilmiştir.

Yapılan TALI görüntü temelli sitometre analizlerine göre Şekil 4.162.'de dirençsiz kontrol DU-145 hücre hattında %91 canlılık, %6 ölüm, %3 apoptotik hücre miktarının varlığı gösterilmiştir. Buna karşılık 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel uygulamasına bağlı %49 canlılık, %40 ölüm ve %11 apoptotik hücre tespit edilmiştir. Gan ve ekibi DU-145 hücre hattı üzerinde dosetakselin apoptotik etkilerini araştırmışlardır. İlk olarak dosetakselin 48 saat süreyle DU-145 hücre hattına uygulanmasında 20 nM için %60, 100 nM'lık uygulamada ise %80 apoptoz tespit etmişlerdir. Daha sonra dosetakselin 10 nM sabit konsantrasyonunu 24, 48 ve 72 saat süreler ile DU-145 hücre hattına uygulamışlardır. 24 saatlik uygulama için %30, 48 saat için %40 ve 72 saat için %70 apoptoz meydana geldiğini gözlemlemişlerdir (Gan, Wang, Xu & Yang, 2011). Buna karşılık Liu ve arkadaşları, DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle dosetakselin 2,5, 5 ve 7,5 nM sabit konsantrasyonlarının uygulamışlardır. Uygulama sonunda uygulama sırasıyla %80, %70 ve %60 canlı hücre miktarı gözlemlenmiştir. Ayrıca 2,5 nM için %10, 5 nM için %10 ve 7,5 nM için %15 apoptotik hücre olduğu tespit edilmiştir (Liu vd., 2013). Küçükzeybek ve arkadaşları DU-145 hücre hattına 72 saat süre ile 0,1-100 nM dosetaksel uygulamasına bağlı IC50 değerini 8,2 nM olarak hesaplamışlardır (Kucukzeybek vd., 2008). Mansour ve arkadaşları DU-145 hücre hattına 72 saat süre ile dosetaksel uygulamaları neticesinde ise IC50 değerini 507,6 nM olarak hesaplamışlardır (Mansour vd., 2018). Tsakalozou ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada ise DU-145 hücre hattına 72 saat süre ile dosetakselin farklı dozlarının uygulaması neticesinde IC50 değerini 0,47 nM olarak hesaplamışlardır (Tsakalozou vd., 2012). Yapılan bu çalışmalar sonucunda dosetakselin DU-145 hücre hattı için ölümcül ve apoptotik etkilerinde istatistiksel olarak anlamlı farkların olması dikkat çekicidir. Bu çalışmalarda görüldüğü gibi dosetakselin DU-145 hücre hattı için IC50 değerlerinde anlamlı farklar mevcuttur. Tez çalışmamızda da DU-145 hücre hattı için yapılan MTT analizi neticesinde dosetakselin IC50 değeri 54,57 nM olarak hesaplanmıştır ve yapılan diğer çalışmalar ile istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmektedir. Ancak tez çalışmamızda TALI görüntü temelli sitometre analiziyle MTT analiz neticelerinin birbirini doğruladığı görülmektedir.

Şekil 4.164.'te direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel uygulanmasına bağlı %65 canlı, %20 ölü ve %15 apoptotik hücrenin mevcut olduğu gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattına 50 nM dosetaksel uygulanmasına bağlı %65 canlılık görülmesine karşı dirençsiz DU-145 hattında %49 canlılığın olması dosetakselle karşı gelişen direnci kanıtlamaktadır. Lee ve arkadaşları da dirençsiz DU-145 hücre hattına 24 saat süre ile dosetakselin; 1 nM uygulamasına bağlı olarak %90, 10 nM uygulamasına bağlı %60, 100 nM uygulamasına bağlı %40 canlı hücre varlığı tespit etmişlerdir. Buna karşılık dosetaksel ile direnç oluşturdukları DU-145 hücre hattına 24 saat süreyle 10 nM dosetaksel uygulamasına bağlı %80, 100 nM uygulamaya bağlı %60 canlı hücre varlığını rapor etmişlerdir (Lee vd., 2014). Zhao ve arkadaşları da dirençsiz ve dirençli PC3 prostat kanseri hücre hattına 48 saat süre ile dosetakselin 1-10000 nM konsantrasyonunu uygulamışlardır. Dirençsiz PC3 hücre hattına; 1 nM uygulama neticesinde %70, 10 nM için %50, 100 nM için %40, 1000 ve 10000 nM için %35 canlı hücre tespit etmişlerdir. Buna karşılık dirençli PC3 hücre hattına; 1 nM uygulama neticesinde %80, 10 nm için %70, 100 nM için %50, 1000 ve 10000 nM için %40 canlı hücre tespit etmişlerdir (Zhao vd., 2009). Gerek tez çalışmamızda DU-145 hücre hatlarında, gerekse Lee ve ekibinin DU-145 hücre hatlarında ve Zhao ve ekininin PC3 hücre hatlarında; dirençsiz ve dirençli canlı hücre sayısı arasındaki farklar oluşan direnci göstermektedir.

MTT, gen ifadesi, mikroskop görüntüleri ve TALI görüntü temelli sitometresinden elde edilen veriler doğrultusunda DU-145 hücre hattında çoklu ilaç direnci oluşturulduğu belirlendikten sonra bu hücre hattı üzerinde 17-DMAG ve ABA'nın etkileri araştırılmıştır. Bunun için ilk olarak direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına 48 ve 72 saat süreyle 1,95 nM-1 µM 17-DMAG uygulandıktan sonra MTT analizleri yapılmıştır. 17-DMAG'ın 48 saat süreyle uygulanmasına bağlı IC50 değeri 338,82 nM olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık 72 saat süreyle uygulanmasına bağlı IC50 değeri 70,64 nM olarak hesaplanmıştır. Yu vd tarafından yapılan bir çalışmada 17-DMAG'ın 72 saat süreyle farklı göğüs kanseri hücre hatlarına uygulanması sonucunda IC50 değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmaya göre dirençli T47D hücre hattına uygulanması neticesinde IC50 değeri 327,7 nM, dirençli MCF7 hücre hattında 119,8 nM, dirençli olmayan MDA-MB-231'de 45,7 nM, dirençli olmayan BT549'da 17,1 nM, dirençli olmayan Hs578T'de 8,4 nM olarak hesaplanmıştır (Yu vd., 2017). Başka bir çalışmada ise PC3 hücre hattı

üzerinde 17-DMAG'ın 48 saat süreyle uygulanması ile IC50 değerinin 5 nM olduğu rapor edilmiştir (Bull vd., 2004). Yapılan bu çalışmalarda 17-DMAG için hem 48 saat hemde 72 saatlik uygulamalara bağlı IC50 değerleri hesaplanmıştır. Tez çalışmamızda, 72 saatlik uygulamada dirençli DU-145 hücrelerinin canlılık miktarında meydana gelen azalma (Şekil 4.27), 48 saatlik uygulanmaya (Şekil 4.29.) göre daha doğrusal olduğu için 70,64 nM uygulama dozu olarak seçilmiştir.

Wilairat ve arkadaşları, çalışmalarında; en yüksek konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde ABA'yı seri sulandırılıp 48 saat süreyle MCF-7 göğüs kanseri, NCI-H460 akciğer kanseri ve SF-286 merkezi sinir sistemi kanser hücre hatlarına uygulamışlardır. Bu çalışma neticesinde en yüksek konsantrasyon olan 100 µM'da bile IC50 dozunu elde edememişlerdir (Wilairat vd., 2006). Suzuki ve arkadaşları L5178Y fare lösemi hücre hattında yaptıkları bir çalışmada ABA'nın farklı dozlarının 5 gün süreyle uygulanması neticesinde IC10 değerini 60 µM, IC20 değerini 78 µM, IC30 değerini 92 µM, IC50 değerini 130 µM olarak hesaplamışlardır (Suzuki, Ezure & Ishida, 1998). Bu verilerden yola çıkılarak tez çalışmamızda, direnç oluşturulan DU-145 hücre hattına ABA'nın; 24, 48 ve 72 saat sürelerle 3,9 µM-2 mM doz aralığının uygulanmasına bağlı etkileri araştırılmıştır. 24 saatlik uygulama neticesinde MTT analizlerine göre en çok ölüm 500 µM için %5,18 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık 1 ve 2 mM'lık doz uygulamalarında ölüm miktarında azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.31.). 48 saatlik uygulamada en çok ölüm 500 µM için %25,22 oranında hesaplanmıştır. 1 ve 2 mM'lık uygulamalarda ölüm miktarı 24 saatlik uygulama ile benzer şekilde azalmıştır (Şekil 4.32.). 72 saatlik uygulama için en çok ölüm 125 µM için %9,59 oranında hesaplanmıştır. Daha yüksek dozlara bağlı uygulamalar için ölüm miktarında azalma görülmüştür. Ölüm miktarında üç uygulama için de doza bağımlı doğrusal azalma görülmemesinden dolayı probit analizi aracılığıyla IC50 değeri hesaplanamamıştır. Bundan dolayı ABA için en etkin süre ve doz; 48 saatlik uygulama için 500 µM olarak seçilmiştir.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarına 17-DMAG, ABA ve prostat kanseriyle mücadelede birinci sınıf taksanlar arasında yer aldığı için dosetaksel ile devam edilmiştir. Bunun için önce dosetakselin dirençsiz DU-145 hücre hattı üzerindeki etkin dozu olan 50 nM ile ABA'nın etkin dozu olan 500 µM ve karşılaştırmak maksadıyla iki katı olan 1 mM ABA seçilmiştir. Süre olarak ABA'nın en etkili olduğu süre olan 48 saat seçilmiştir. 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA'nın birlikte dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle

uygulanması sonucunda ortalama %35,6'lık ölüm meydana gelmiştir. 50 nM dosetaksel ile 1 mM ABA uygulanmasında ise %31,32 oranında ölüm görülmüştür (Şekil 4.34.). Bu verilere göre 50 nM dosetaksel ve 500 µM ABA'nın birlikte daha etkili olduğu görülmektedir. ABA'nın tek başına dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanmasına bağlı ölüm oranı %25,22 olarak hesaplandığı daha önceden belirtilmiştir. Buradan dosetaksel ve ABA'nın sinerjistik ilişkili olduğu anlaşılmaktadır.

Dosetaksel ve 17-DMAG arasındaki ilişkiyi araştırmak için; dosetakselin dirençsiz DU-145 hücre hattı üzerindeki etkin IC50 dozu olan 50 nM ile 17-DMAG'ın IC50 dozu olan 70 nM ve 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG dirençli DU-145 hücre hattına uygulanmıştır. Bu kombinasyonlardan verimli olanının daha sonra ABA ile birlikte üçlü etkisi araştırılacağı için uygulama süresi, ABA'nın en etkili olduğu süre olan 48 saat seçilmiştir. Yapılan MTT analizleri sonucunda 50 nM dosetaksel ve 35 nM 17-DMAG'ın birlikte uygulanmasına bağlı %49,66, 50 nM dosetaksel ve 70 nM 17-DMAG'ın birlikte uygulanmasına bağlı ise ortalama %50,84 ölüm saptanmıştır (Şekil 4.35.).

50 nM dosetakselin 35 nM ve 70 nM 17-DMAG ile dirençli DU-145 hücre hattına uygulanmasına bağlı ölüm miktarları birbirine çok yakın olduğu için bu iki uygulama 500 µM ve 1 mM ABA ile birleştirilerek üçlü sinerjistik/antagonistik etki araştırılmıştır. Dirençli DU-145 hücre hattına 48 saat süreyle 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA ve 50 nM dosetaksel, 70 nM 17-DMAG ile 1 mM ABA uygulanmıştır. 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA uygulamasına bağlı %44,34, 50 nM dosetaksel, 70 nM 17-DMAG ile 1 mM ABA uygulamasında ise %39,92 hücre ölümü gözlemlenmiştir (Şekil 4.36.). 17-DMAG ve ABA'nın birlikte uygulanmasında konsantrasyonun artmasına karşın ölüm miktarında meydana gelen azalma dikkat çekmektedir. 500 µM ABA'nın olmadığı durumda 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG'ın %49,66 ölüm etkisi olmasına rağmen ABA'nın varlığında bu oranın %44,34'a düştüğü dikkat çekmektedir. Yine 1 mM ABA'nın olmadığı 50 nM dosetaksel ile 70 nM 17-DMAG uygulamasında %50,84 ölüm meydana gelirken ABA ilave edilince bu oranın %39,92'ye düştüğü görülmüştür.

17-DMAG ile ABA arasındaki sinerjistik veya antagonistik ilişkiyi açıklayabilmek için CDI, BLISS (CI) ve HSA istatistiksel hesaplamalarından

yararlanılmıştır. Bu üç hesaplama sonucunda da 17-DMAG ile ABA arasında antagonistik ilişki olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca TALI görüntü temelli sitometre analizlerine göre dirençsiz DU-145 hücre hattına 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulandığında %50 ölü ve %14 apoptotik hücre, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulandığında %56 ölü ve %11 apoptotik hücre, 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA uygulandığında %54 ölü ve %9 apoptotik hücre olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.162.). Her üç maddenin uygulanmasındaki ölüm miktarı dosetaksel ile ABA'nın birlikte uygulanmasından daha az ve üç maddenin uygulanmasına bağlı apoptotik oran ise dosetaksel ile 17-DMAG ve dosetaksel ile ABA'nın ikili uygulamalarından daha az olduğu için 17-DMAG ve ABA'nın antagonistik ilişkili olduğunu bir kez daha açıklamaktadır. Dirençli DU-145 hücre hattındaki benzer durum Şekil 4.164.'te sütun grafiğinde gösterilmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattına 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulandığında %50 ölü ve %13 apoptotik hücre, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulandığında %58 ölü ve %9 apoptotik hücre, 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA uygulandığında %58 ölü ve %4 apoptotik hücre tespit edilmiştir. Buna göre her üç maddenin uygulanmasına bağlı gözlemlenen apoptotik hücre miktarı hem dosetaksel ile 17-DMAG hemde dosetaksel ile ABA ikili kombinasyonundan daha azdır. Üç maddenin uygulanmasına bağlı ölüm miktarı ise dosetaksel ile ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı ölüm miktarıyla karşılaştırıldığında ise aditif etki göstermektedir. Ayrıca apoptoz ve kaspaz aktivitelerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda Şekil 4.170.'de dosetaksel ile 17-DMAG'ın ve Şekil 4.171.'de dosetaksel ile ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı hem dirençsiz hem dirençli hücre hatlarında çekirdekte ve hücre membranında meydana gelen bozulmalar gösterilmiştir. Şekil 4.172.'de dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın birlikte dirençsiz ve dirençli hücre hatlarında hücre membranı üzerinde yıkım etkilerinin görülmesine rağmen çekirdek yapısı üzerindeki etkileri daha zayıftır.

Buna karşılık 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG'ın (Şekil 4.170.), 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA'nın (Şekil 4.171) hem çekirdek hemde hücre iskeletinde yıkım etkilerinin son derece yüksek olduğu görülmektedir. TALI görüntü temelli sitometre analizlerinde de herhangi bir madde uygulaması yapılmamış dirençsiz DU-145 hücre hattı kontrol olarak ele alındığında %91 canlı, %6 ölü, %3 apoptotik hücre varlığı tespit edilmiştir. Buna karşılık dirençsiz DU-145 hücre hattına 50 nM dosetaksel

uygulandığında %40 ölü ve %11 apoptotik hücre gözlemlenirken, 35 nM 17-DMAG eklenince ölü %50'ye ve apoptotik hücre miktarı %14'e yükselmiştir. 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulamasında ölüm miktarı %56'ya yükselmiş ve apoptotik hücre miktarı aynı kalmıştır (Şekil 4.162.). Dirençli hücre hattına 50 nM dosetaksel uygulandığında %20 ölüm ve %15 apoptotik hücrenin varlığı tespit edilmiştir. Aynı hücre hattına 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulandığında %50 ölü ve %13 apoptotik hücre belirlenmiştir. 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulanmasında ise ölüm %58'e artmakta ancak apoptotik hücre miktarı %6'ya azaldığı tespit edilmiştir. 17-DMAG ve ABA'nın bu verilerden dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatları üzerinde dosetakselle katkı sağladıkları belirgin bir şekilde görülmektedir. Ancak apoptotik hücre miktarı henüz ölmemiş, apoptoza giden canlı hücreleri kapsadığından ve TALI görüntü temelli sitometre analizi yapılmadan önce maddeler 24 saat uygulandığından bu süre içinde apoptoza giden hücrelerde ölüm meydana gelmiş olabileceği durumu göz önünde bulundurulmalıdır.

Çoklu ilaç direnci genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler; MTT, TALI görüntü temelli sitometre ve floresan mikroskopu aracılığı ile apoptotik aktivitede dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı antagonistik ilişkiyi açıklar niteliktedir. Dirençsiz DU-145 hücre hattında bu uygulamaya bağlı kontrole göre ABCB1/P-gP (2,11±0,07 kat), ABCC1 (1,89±0,05 kat), ABCC2 (1,78±0,1 kat), BCRP/ABCG2 (2,16±0,1 kat), GST (2,16±0,19 kat) genlerinin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar meydana gelmiştir. Dirençli DU-145 hücre hattında kontrole göre ABCB1/P-gP (7,17±0,24 kat), ABCC1 (3,16±0,11 kat), ABCC2 (2,79±0,04 kat), BCRP/ABCG2 (6,73±0,45 kat), MVP/LRP (2,16±0,2 kat), GST (2,54±0,25 kat) genlerinin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar meydana gelmiştir. Januchowski ve arkadaşları da yumurtalık kanseri A2780 hücre hattından; sisplatin dirençli A2780CR1, A2780CR2, paklitaksel dirençli A2780PR1, A2780PR2, doksorubisine dirençli A2780DR1, A2780DR2 ve topotekana dirençli A2780TR1, A2780TR2 hücre hatları oluşturmuşlardır. Bu hücre hatlarına 72 saat süre ile ayrı ayrı; sisplatinin 0,1-100 nM, paklitakselin 5-10000 nM, doksorubisinin 10-50000 nM ve topotekanın 5-10000 nM dozlarını uygulayarak IC50 değerlerini ve P-gP/MDR1, MRP1, MRP2, BCRP, MVP/LRP ifadelerini karşılaştırmışlardır. Sisplatin uygulamasına bağlı IC50 değerini A2780 hücre hattı için 1,83, A2780CR1 için 7,49, A2780CR2 için 4,09 nM, paklitaksel



uygulanmasına bağı A2780 için 3,37, A2780PR1 için 491, A2780PR2 için 4052 nM, doksorubisin uygulanmasına bağı A2780 için 6,34, A2780DR1 için 1,08, A2780DR2 için 58 nM, topotekan uygulanmasına bağı A2780 için 10,8, A2780TR1 için 2,86, A2780TR2 için 59,6 nM olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada, görüldüğü gibi dirençli olmayan A2780 hücre hattıyla belirtilen ilaçlara karşı direnç oluşturulmuş A2780 hücre hatlarına, direnç oluşturulan maddeler uygulandığında IC50 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar bildirilmiştir. Doğal olarak IC50 değerlerindeki bu artışlar ile birlikte direnç geliştirmekte ve bu gelişen dirence bağı, uygulanacak kemoterapi ajanlarına karşı daha fazla canlılık tespit edilmesi kaçınılmazdır. Ayrıca doksorubisin uygulanmasına bağı A2780 hücre hattıyla karşılaştırıldığında; A2780DR1 hücre hattında 4000 kat, A2780DR2 hücre hattında 6000 kat, A2780TR1 hücre hattında 40 kat, A2780PR1 hücre hattında 5500 kat, A2780PR2 hücre hattında 14000 kat ifade artışı tespit etmişlerdir. Paklitaksel uygulamasında, MRP1 gen ifadesi incelendiğinde ise A2780 hücre hattına göre sadece A2780PR1’de 1,2 kat artış gösterilmiştir. Sisplatin uygulamasında, MRP2 için kontrole göre A2780CR1’de 12 kat, A2780CR2’de 10 kat, A2780TR2’de 2 kat artış tespit edilmiştir. Topotekan uygulanmasına bağı BCRP gen ifadesi için kontrole göre A2780TR1 ifadesi 1000 kat, A2780TR2 ifadesi 500 kat artmıştır. Bu dört maddenin A2780 hücre hattına uygulanmasıyla oluşturulmuş dirençli A2780 hücre hatlarına, ilgili maddelerin uygulanmasına bağı MVP/LRP ifadesi için kontrole göre A2780CR1 2 kat, A2780CR2 2,5 kat, A2780TR1 2,5 kat, A2780TR 2 kat, A2780PR1 6 kat, A2780PR2 5,5 kat arttığı bildirilmiştir (Januchowski vd., 2016). Tez çalışmamızda da Januchowski ve arkadaşlarının bulgularına benzer olarak; dosetaksel, 17-DMAG ve ABA’nın beraber kullanılmasına bağı olarak, bunların ayrı ayrı kullanılmasına göre daha az ölüm görülmesinin nedeni, bu üç maddeye göre direnç genlerinin ifadelerinde meydana gelen anlamlı artışlardan kaynaklanmaktadır.

Dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarına madde uygulanması neticesinde oksidatif stres genlerinin ifade seviyeleri karşılaştırıldığında; 50 nM dosetaksel uygulanmasına bağı dirençli hücre hattında CuZn-SOD ( $2,18\pm 0,13$  kat), Mn-SOD ( $1,49\pm 0,14$  kat) ve GS ( $3,41\pm 0,19$  kat) ifadelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar olurken dirençsiz hücre hattında bu artışlar gözlemlenmemiştir. 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG’ın birlikte uygulanmasına bağı dirençli hücre hattında kontrole göre GS ( $0,35\pm 0,06$  kat) hariç diğer bütün genlerin ifadelerinde hem

dirençsiz hem dirençli hücre hattı için istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmuştur. Gastrik kanserlere 17-DMAG'ın 10, 25, 50, 100, 200 nM dozlarının uygulaması üzerine yapılan bir çalışmada, doza bağımlı olarak Mn-SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz antioksidan enzim genlerinin ifadelerinde değişimler saptanmıştır (Kim vd., 2017). Bu çalışmada 17-DMAG'ın konsantrasyonu arttıkça bu üç enzimin ifadesinde azalma olduğu, ancak 25 nM doz uygulamasında kontrole göre her üç enziminde ifadesinin yaklaşık 4 kat arttığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonuçları, tez çalışmamızda 17-DMAG'ın 35 nM dozunun kullanılmasıyla dirençli DU-145 hücre hattında GS ( $0,35\pm 0,06$  kat) hariç diğer bütün oksidatif stres genlerinin ifadelerindeki artışlarla benzerlik göstermektedir. 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA'nın birlikte uygulanmasına bağlı dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarında, dirençli DU-145 GS (kontrole göre  $0,58\pm 0,1$  kat) hariç bütün oksidatif stres genlerinin ifadelerinde anlamlı artışlara neden olmuştur. Guan ve ekibi ABA'nın antioksidan savunma sisteminde aktivasyona neden olduğunu rapor etmiştir (Guan, Zhao & Scandalios, 2000). Çalışmamızdan elde edilen veriler Guan ve ekibinin çalışmasından elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500  $\mu$ M ABA'nın birlikte kullanılmasına bağlı dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hattında tüm oksidatif stres genlerinin ifadelerinde kontrole göre artış olmakla birlikte bu artışlar hem dosetaksel ile 17-DMAG kombinasyonuna göre hemde dosetaksel ile ABA kombinasyonuna göre daha fazladır. Bu durum CuZn-SOD, Mn-SOD, CAT ve GS oksidatif stres genleri için 17-DMAG ile ABA'nın sinerjistik ilişkili olduğunu göstermektedir.

Uygulanan kemoterapik ajanlara karşı DNA tamir mekanizması genlerinin ifadelerindeki değişimlere bakıldığında XRP1 geni için dirençsiz DU-145 hücre hattında 50 nM dosetaksel uygulaması hariç diğer bütün uygulamalar için gen ifadesi seviyesinde anlamlı artışlar mevcutken dirençli hücre hattında ise dosetaksel uygulaması hariç diğer ikili ve üçlü madde kombinasyonlarına bağlı gen ifadesi seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Buna karşılık dosetaksel uygulaması hariç diğer tüm kemoterapik ajan kombinasyonlarının uygulanmasına bağlı hem dirençsiz hemde dirençli hücrelerde EXO1 geninin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. 17-DMAG'ın HSP90'ı, ABA'nın da hem HSP70'i hemde HSP90'ı hedef almasından dolayı ortamda katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinler oluşup, bu proteinler oksidatif strese neden olmakta ve DNA hasarları meydana getirebilmektedirler. HSP90

ve HSP70 koşaperonunun inaktif hale gelmesiyle ya DNA tamir genleri aktif hale gelmekte ve hücreleri apoptozdan kurtarmakta ya da bu genler yetersiz kalıp hücreler apoptoza gitmektedir (Dezwaan & Freeman, 2008; Echtenkamp vd., 2011; Kumar vd., 2012). Tez çalışmamızda dirençli DU-145 hücre hattına 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG ( $0,36\pm 0,07$  kat), 50 nM dosetaksel ile 500  $\mu$ M ABA ( $0,38\pm 0,06$  kat) ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ve 500  $\mu$ M ABA ( $0,4\pm 0,03$  kat) uygulamalarına bağlı XRP1 geninin ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalamalar tespit edilmiştir. Buna karşılık 50 nM dosetaksel uygulaması hariç diğer bütün uygulamalara bağlı hem dirençli hemde dirençsiz DU-145 hücre hattında XRP1 ve EXO1 geninin ifadelerinde anlamlı artışlar olmuştur. Dirençli DU-145 hücre hattında XRP1 geninin ifadesinde meydana gelen anlamlı azalmalar, bu hücre hattını apoptoza götürmek için veya dirençsiz DU-145 hücre hattında uygulamalara bağlı XRP1 geninde ve hem dirençsiz hem dirençli hücre hattına yapılan uygulamalara bağlı EXO1 geninin ifadesinde meydana gelen anlamlı artışların bu hücre hatlarını apoptozdan kurtarmak için yeterli olup olmayacakları ancak apoptoz, apoptoz inhibitör/sağ kalım, ısı şoku protein ailesi genlerinin ifadeleriyle birlikte yorumlanmalıdır. Bu bilgilere ek olarak PI3K/Akt yolağı XRP1 geni ile sıkı bir ilişki halindedir. Herhangi bir DNA hasarı durumunda XRP1 gen ifadesini düzenlemek için PI3K/Akt, MAPK yolağını aktive etmektedir (Toulany vd., 2008). Dirençli DU-145 hücre hattında dosetaksel uygulaması hariç diğer bütün uygulamalara bağlı XRP1 gen ifadesi azalırken, yine aynı uygulamalara bağlı PI3K ve Akt genlerinin ifadelerinde anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu durum aynı zamanda dosetaksel ile birlikte kullanılan 17-DMAG ve ABA'nın dirençli DU-145 hücre hatlarını ölüme götürdüklerine de ispat oluşturmaktadır. Ayrıca tez çalışmamızda VEGF ve CD1 gibi büyüme ve hücre bölünmesinden sorumlu genlerin ifadelerine bakıldığında anlamlı artışlar görülmektedir. Bu artışlar da aslında hücre büyüme ve bölünmesinden değil, dosetaksel ile birlikte uygulanan 17-DMAG ve ABA'ya karşı meydana gelen DNA hasarlarına karşı PI3K/Akt'nin XRP1'i aktif hale getirebilmesi için uyardıkları MAPK yolağının aynı zamanda bu genleri de uyarabileceği ihtimalini doğurmaktadır.

Isı şoku protein ailesi gen ifadeleri incelendiğinde uygulanan 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG'a karşı dirençsiz DU-145 hücre hattında kontrole göre HSP70 ( $0,83\pm 0,2$  kat), HSP90 ( $0,59\pm 0,07$  kat) ve dirençli DU-145 hücre hattında HSP90 ( $0,53\pm 0,07$  kat), Bip/Grp78 ( $0,004\pm 0,001$  kat) ve GRP94 ( $0,19\pm 0,03$  kat) genlerinin

ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar meydana geldiği görülmüştür. 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA uygulamasında ise dirençsiz DU-145 hücre hattında kontrole göre HSP70 (0,64±0,21 kat) ve GRP94 (0,33±0,007 kat) ve dirençli DU-145 hücre hattında HSP70 (0,63±0,07 kat), Bip/ Grp78 (0,007±0,001 kat), GRP94 (0,33±0,07 kat) genlerinin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görülmüştür. Wu ve ekibi insan adrenal kanseri hücre hattı olan NCI-H295 üzerinde yaptıkları bir çalışmada ABA uygulanmasına bağlı olarak HSP70 ve HSP90 genlerinin ifadelerinde azalma meydana geldiğini göstermişlerdir (Wu vd., 2009). Ayrıca iyi bir HSP90 inhibitörü olduğu bilinen 17-DMAG'ın (Kim vd., 2017) çalışmamızda dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatlarına uygulanmasına bağlı HSP90 gen ifadesi seviyesini baskıladığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda endoplazmik retikulum stresi genlerinden ATF4 ve CHOP hariç diğer bütün genlerin ifade seviyeleri, uygulanan maddelere bağlı hem dirençsiz hemde dirençli hücre hatları için artmıştır. Bu durum 17-DMAG'ın HSP90'ı, ABA'nın da HSP70'i baskıladığını göstermektedir. Ancak ATF4 ve CHOP için dirençli hücre hattına uygulanan 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA'ya bağlı gen ifadesi seviyelerinin, dosetaksel uygulanmasına bağlı gen ifadesi seviyesinden az olduğu belirlenmiştir. Katlanmamış proteinlerin endoplazmik retikulumda yüksek miktarda bulunması, endoplazmik retikulum membranında bulunan PERK'in ifade seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Endoplazmik retikulumdan PERK aracılığı ile gönderilen fosfatlanmış eIF2α sinyali, hücre çekirdeğinde ATF4/CHOP kompleksine ulaşmaktadır. ATF4/CHOP hücrelerin homeostazını dengeleyerek sağ kalımı teşvik etmektedir (Rozpedek vd., 2016). Çalışmamızda PERK seviyesinin artmasına rağmen ATF4/CHOP seviyesindeki azalma dirençli hücrelerin homeostazı sağlayamayıp ölüme gittiklerini düşündürmektedir. Bununla birlikte hem usXBP1 (X-Box Binding Protein1) hemde totalXBP1'in dirençsiz ve dirençli hücre hatlarına 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA uygulamalarına bağlı gen ifadelerinde artış görülmektedir. XBP1 proteinleri endoplazmik retikulum stresinin artmasına bağlı aktive olan transkripsiyon faktörleridir ve görevleri katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (Iwakoshi vd., 2003). Bundan dolayı tez çalışmamızda HSP90'ın ve HSP70'in baskılaması neticesinde kanser hücre hatlarında proteinler katlanamayıp, bu proteinleri katlamak için XBP1

ifadesinin artmış olacağı düşünülmektedir. Sabnis ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; HSP70 inhibitörü olan MAL3-101 ile HSP70'in hedef alınmasına bağlı gen ifadesinin azaldığı buna karşılık XBP1'in ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir (Sabnis vd., 2016). Bu durum da tez çalışmamızda HSP70 ve HSP90'ın ifadelerini azalmasına karşı neden XBP1'in ifade seviyesinin arttığını açıklar nitelikte örnek teşkil etmektedir.

Apoptoz ve ölüm sinyali genleri incelendiğinde; dirençli hücre hattında 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA uygulamalarına bağlı BAX ve Bid'in gen ifadelerinde anlamlı artış görülürken, bunların mitokondriden sitokrom C salınması üzerine zayıf etkileri 50 nM dosetaksel, 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA uygulamalarına bağlı gen ifadelerinden anlaşılmaktadır. Salınan sitokrom C, Apaf-1 ile birleşerek apoptozomu oluşturmaktadır (Safa & Pollok, 2011). Oluşan bu kompleks sitozolde prokaspaz 9'u aktif kaspaz 9'a dönüştürmektedir. Kaspaz 9 da prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3'e çevirmektedir. Aktif kaspaz 3 doğrudan apoptozu tetiklemektedir (Mehri vd., 2011). Tez çalışmamızda kaspaz 3'ün en yüksek gen ifadesi seviyesinin dirençli hücre hattına 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG uygulamasına bağlı olarak kontrole göre  $1,93 \pm 0,2$  kat arttığı tespit edilmiştir. Bu durum mitokondriyal apoptoz aktivitesinin düşük seviyede olduğunu göstermektedir. p21, p27, p53 çekirdek apoptoz yolağı genlerinin ifadesine bakıldığında en yüksek değerler hem dirençsiz hemde dirençli hücre hattı için 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA uygulamalarında kontrole göre  $1,41 \pm 0,07$ -  $4,26 \pm 0,14$  kat ile sınırlı kalmıştır. Apoptotik genlerin ifadelerinin böyle sınırlı olmasına rağmen nekroz yolaklarında bulunan genlerden Nf-κB'de istatistiksel olarak anlamlı artışlar görülmez iken Tnf-α'nın dirençsiz hücre hattına 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA ( $9,37 \pm 0,5$  kat), 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA ( $21,84 \pm 0,5$  kat) uygulanmasına bağlı gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmuştur. Dirençli hücre hattına; 50 nM dosetaksel ile 500 µM ABA ( $6,35 \pm 0,28$  kat) ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 µM ABA ( $13,35 \pm 0,46$  kat) uygulandığında yine Tnf-α'nın gen ifadesi seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Bu durumlar TALI görüntü temelli sitometrede 17-DMAG ve ABA uygulamalarına bağlı apoptotik hücre sayısının düşük olmasına karşılık hücre ölüm miktarlarının yüksek olmasını da açıklamaktadır.

IκBA, Nf-κB inhibitörüdür. Dirençsiz DU-145 hücre hattına 50 nM dosetaksel ile 500 μM ABA (4,59±0,2 kat) ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 μM ABA (2,23±0,07 kat) uygulanmasına bağlı IκBA geninin ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmuştur. Dirençli DU-145 hücre hattına; 50 nM dosetaksel ile 35 nM 17-DMAG (1,83±0,1 kat), 50 nM dosetaksel ile 500 μM ABA (1,96±0,2 kat) ve 50 nM dosetaksel, 35 nM 17-DMAG ile 500 μM ABA (2,83±0,14 kat) uygulanmasına bağlı IκBA geninin ifadesinde yine istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmuştur. DU-145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada dosetaksel uygulamasına bağlı IκBA'nın, Nf-κB'ye karşı hassas hale geldiği gözlemlenmiştir (Domingo-Domenech vd., 2006). Ayrıca dosetaksele ilaveten 17-DMAG ve ABA kombinasyonlarında Nf-κB gen ifadesi seviyesinde meydana gelen artışa yanıt olarak IκBA'nın ifadesinin de artması beklenen bir durumdur. Ancak apoptoz inhibitör faktörü olan XIAP'ın gen ifadesi seviyesi 50 nM dosetaksel uygulaması hariç diğer bütün uygulamalara bağlı hem dirençsiz hemde dirençli DU-145 hücre hattında artmıştır. XIAP bir apoptoz inhibitör faktörüdür ve aynı zamanda kaspaz kaskadıyla sitokrom C yolağını inhibe etmektedir (Chiou, Jones & Tarnawski, 2003; Duckett vd., 1996; Liston vd., 1996). Bu veriler ile benzer biçimde çalışmamızda dosetaksel, 17-DMAG ve ABA'nın ikili ve üçlü uygulamalarına karşı; p21, p27 ve p53, kas3, kas8 ve sitokrom C gen ifadesi seviyelerinde önemli artışların olmamasına karşılık, hücrelölümlerin daha çok Nf-κB'nin etkisiyle olduğunu bu genin ifade seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışlardan anlaşılmaktadır.

Dosetaksel ve mitoksantron prostat kanseriyle mücadelede kullanılmaktadır. Ancak zaman içinde her ikisine karşı çoklu ilaç direnci gelişmesiyle birlikte mitoksantronun dozu arttırılmak suretiyle kanser hücreleri üzerindeki öldürücü etkisi devam etmektedir. Ancak mitoksantron yüksek dozlarda sitotoksik etkiye sahiptir. Bundan dolayı da belli bir dozun üstünde sağlıklı hücelere de zarar vermektedir. Bunun için çalışmamızın ilk aşamasında dirençsiz DU-145 prostat kanseri hücre hattına, dosetaksel ve mitoksantronun düşük dozları uygulanarak dirençli hücre hattı oluşturulmuştur. Çoklu ilaç direncinin sürekliliği sağlandıktan sonra, yüksek sitotoksik etkisinden dolayı mitoksantrondan vazgeçilerek çalışmaya dosetaksel, 17-DMAG ve ABA ile devam edilmiştir. Bu üç maddenin hem dirençsiz hemde dirençli hücre hattı üzerindeki ölüm etkileri MTT analizleri, ışık ve floresan mikroskobu, TALI görüntü

temelli sitometre yöntemleri ile araştırıldıktan sonra gen ifadeleri üzerine etkileri de incelenmiştir. MTT, ışık ve floresan mikroskobu ve TALI görüntü temelli sitometre analizleri neticesinde ABA'nın 17-DMAG'a göre daha düşük olmakla birlikte dirençsiz ve dirençli DU-145 hücre hatları üzerindeki ölüm etkileri ispatlanmıştır. Ayrıca dirençsiz DU-145 hücrelerinde çoklu ilaç direnci oluşturulduktan sonra, bu direnci oluşturmak için kullanılan kemoterapi ilaçlarının IC50 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artışların olması, oluşan direncin sürekli olduğunu da göstermektedir. Çalışmada birinci sınıf taksanlar grubundan olan dosetaksele, 17-DMAG ve ABA ile destek olunmuştur ve dirençli DU-145 hücre hattında dosetaksel hemen hemen dirençsiz DU-145 hücre hattında uygulanan dozuna yakın dozlarda benzer etkiler göstermiştir. Bununla birlikte gen ifadesi çalışmalarında 17-DMAG ile ABA'nın birlikte uygulanması çoklu ilaç direnci genlerinin oluşturduğu yanıtı arttırmıştır. Bu veriler; bu iki maddenin dirençli DU-145 hücre hattı üzerinde etkili olduklarını ancak daha sonra yapılacak çalışmalarda ayrı ayrı uygulanmalarının ve başka kemoterapik ajanlarla birlikte kullanılmalarının (özellikle çoklu ilaç direnci genlerini aktif hale geçirmeyecek maddelerle) kanser çalışmaları açısından çok daha olumlu sonuçlar doğuracağını göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Aas, T., Børresen, A., Geisler, S., Smith-Sørensen, B., Johnsen, H., Varhaug, J., Akslen, L. & Lønning, P. (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Medicine*, 2, 811–814.
- Abolhoda, A., Wilson, A., Ross, H., Danenberg, P. V., Burt, M. & Scotto, K. W. (1999). Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clinic Cancer Research* 5, 3352–3356.
- Akhdar, H., Legendre, C., Aninat, C. & More, F. (2012). 1. Anticancer Drug Metabolism: Chemotherapy Resistance and New Therapeutic Approaches. *Topics on Drug Metabolism*, 137-155 . doi: 10.5772/30015.
- Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., Wijnholds, J. & Schinkel, A. H. (1999). The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Research*, 59, 4237–4241.
- Ambudkar, S. V., Kim, I. W. & Sauna Z. E. (2006). The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 392–400.
- Ambudkar S. V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z. E. & Gottesman M. M. (2003). Pglycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 22, 7468–7485.
- Anderson K. C., Alsina M., Bensinger W. M. & Biermann J. S. (2007). Multiple Myeloma. *Journal Of The National Comprehensive Cancer Network*, 5 (2), 118-147.
- Arora, V., Cheng, H. H., Plenchette, S., Micali, O. C., Liston, P., Korneluk, R. G. (2007). Degradation of Survivin by the X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP)-XAF1 Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26202-9. doi: 10.1074/jbc.M700776200.
- Baker, E.K. & El-Osta, A. (2003). The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer. *Experimental Cell Research*, 290, 177–194.
- Barbus, S., Tews, B. & Karra, D. (2011). Differential retinoic acid signaling in tumors of long- and short short term glioblastoma survivors. *Journal Of The National Cancer Institute*, 103, 598–606.
- Barkan, D., Kleinman, H., Simmons, J.L., Asmussen, H., Kamaraju, A.K., Hoehorhoff, M.J., Liu, Z.Y., Costes, S.V., Cho, E.H. & Lockett, S. (2008). Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Research*, 68, 6241–6250.
- Bates, R. C. & Mercurio, A. M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biology & Therapy*, 4, 365–370.



- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 87, 1620-1624.
- Bendas, G. & Borsig, L. (2012). Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Article ID 676731. doi: 10.1155/2012/676731.
- Berns, K., Horlings, H., Hennessy, B., Madiredjo, M., Hijmans, M., Beelen, K., Linn, S., Gonzalez-Angulo, A., Stemke-Hale, K. & Hauptmann, M. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12, 395–402.
- Bhangal, G., Halford, S., Wang, J., Roylance, R., Shah, R. & Waxman, J. (2000). Expression of the multidrug resistance gene in human prostate cancer. *Urologic Oncology*, 5, 118–121.
- Bluemn E. G., Coleman I. M., Lucas J. M., Coleman, R, T., Hernandez- Lopez S. & Tharakan R. (2017). Androgen receptor pathway-independent prostate cancer is sustained through FGF signaling. *Cancer Cell*, 32, 474–89. e6.
- Bonanno, L., Favaretto, A. & Rosell, R. (2014). Platinum drugs and DNA repair mechanism in lung cancer. *Anticancer Research*, 34, 493–502.
- Borst, P. & Elferink, O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review Of Biochemistry*, 71, 537–592.
- Bumbaca, B. & Li, W. (2018). Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanisms and therapeutic strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(4), 518–529
- Brangi, M., Litman, T., Ciotti, M., Nishiyama, K., Kohlhagen, G., Takimoto, C., Robey, R., Pommier, Y., Fojo, T. & Bates, S. E. (1999). Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Research*, 59, 5938– 5946.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A CANCER JOURNAL OF CLINICIANS*, 68, 394–424. doi: 10.3322/caac.21492
- Breslow, N., Chan, C. W., Dhom, G., Drury, R. A., Franks, L. M., Gellei, B., Lee, Y. S., Lundberg, S., Sparke, B., Sternby, N. H. & Tulinius, H. (1977). Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *International Journal Of Cancer*, 20 (5), 680–8. doi: 10.1002/ijc.2910200506.
- Breuninger, L. M., Paul, S., Gaughan, K., Miki, T., Chan, A., Aaronson, S. A. & Kruh, G. D. (1995). Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Research*, 55, 5342–5347.
- Browne, B.C., Crown, J., Venkatesan, N., Duffy, M.J., Clynes, M., Slamon, D. & O'Donovan, N. (2011). Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells. *Annals Of Oncology*, 22, 68–73.

- Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Jr. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5, 65-72. | doi: 10.1038/nrc1529.
- Bull, E. E., Dote, H., Brady, K. J., Burgan, W. E., Carter, D. J., Cerra & M. A. (2004). Enhanced tumor cell radiosensitivity and abrogation of G2 and S phase arrest by the Hsp90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin. *Clinic Cancer Research*, 10, 8077–84. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1212.
- Burrows, F., Zhang, H. & Kamal, A. (2004). Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle*, 3, 1530-1536.
- Byler, S., Goldgar, S., Heerboth, S., Leary, M., Housman, G., Moulton, K. & Sarkar, S. (2014). Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Research*, 34, 1071–1077.
- Byler, S. & Sarkar, S. (2014). Do epigenetic drug treatments hold the key to killing cancer progenitor cells?. *Epigenomics*, 6, 161–165.
- Cai, C., Omwancha, J., Hsieh, C.L. & Shemshedini, L. (2007). Androgen induces expression of the multidrug resistance protein gene MRP4 in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, 10, 39–45.
- Caini, S., Gandini, S., Dudas, M., Bremer, V., Severi, E. & Gherasim, A. (2014). Sexually transmitted infections and prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiology*, 38 (4), 329–338. doi: 10.1016/j.canep.2014.06.002.
- Calcagno, A. M., Fostel, J. M., To, K. K. W., Salcido, C. D., Martin, S. E., Chewing, K. J., Wu, C. P., Varticovski, L., Bates, S. E., Caplen, N. J. & Ambudkar, S. V. (2008). Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes. *British Journal of Cancer*, 98, 1515-1524. doi:10.1038/sj.bjc.6604334.
- Campos, B., Centner, F. S. & Bermejo, J. L. (2011). Aberrant expression of retinoic acid signaling molecules influences patient survival in astrocytic gliomas. *The American Journal Of Pathology*, 178, 1953–64.
- Carraway, K. L. & Sweeney, C. (2006). Co-opted integrin signaling in ErbB2-induced mammary tumor progression. *Cancer Cell*, 10, 93–95.
- Chaffer, C., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A., Wiggins, P., Rodrigues, L., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y. & Polyak, K. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously covert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 7950–7955.
- Chaffer, C. & Weinberg, R. (2011). A perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331, 1559–1564.
- Chang, G. & Roth, C. (2001). Structure of MsbA from E. coli: A homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, 293, 1793–1800.
- Chen, M. H., Chiang, K. C., Cheng, C. T., Huang, S. C., Chen, Y. Y., Chen, T. W., Yeh, T. S., Jan, Y. Y., Wang, H. M., Weng, J. J., Chang, P. M., Liu, C. Y. & Li, C. P. (2014). Antitumor activity of the combination of an HSP90 inhibitor and a PI3K/mTOR dual inhibitor against cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, 5 (9), 2372-2389. doi: 10.18632/oncotarget.1706.

- Chen, Z. S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R. B., Kuwano, M. & Zeng, H. (2002). Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Research*, *62*, 3144–3150.
- Chiou, S. K., Jones, M. K. & Tarnawski, A. S. (2003). Survivin – an anti-apoptosis protein: its biological roles and implication for cancer and beyond. *Medical Science Monitor*, *9*, PI25–PI29.
- Cole, S. P. C., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M. & Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug-resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Research*, *54*, 5902–5910.
- Cook, K. L., Wärrri, A., Soto-Pantoja, D. R., Clarke, P. A. G., Cruz, M. I., Zwart, A. & Clarke, R. (2014). Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *20*, 3222–3232.
- Cortes, J. E. & Pazdur, R. (1995). Docetaxel. *Journal Of Clinical Oncology*, *13*, 2643–2655.
- Cumming, R. C., Lightfoot, J., Beard, K., Youssoufian, H., O'Brien, P. J. & Buchwald, M. (2001). Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nature Medicine*, *7*, 814–820.
- Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, *12*, 801–817.
- Cyrus, W. B., Seow, W. Y., Wang, Y., Zhang<sup>1</sup>, Y., Ong, Z. Y., Ee, P. L. & Yang, Y. (2009). Efficient Delivery of Bcl-2-Targeted siRNA Using Cationic Polymer Nanoparticles: Downregulating mRNA Expression Level and Sensitizing Cancer Cells to Anticancer Drug. *Biomacromolecules*, *10* (1), 41–8. doi: 10.1021/bm801109g.
- David-Beabes, G.L., Overman, M.J., Petrofski, J.A., Campbell, P.A., de Marzo, A. M. & Nelson, W.G. (2000). Doxorubicin-resistant variants of human prostate cancer cell lines DU-145, PC-3, PPC-1, and TSU-PR1: characterization of biochemical determinants of antineoplastic drug sensitivity. *International Journal Of Oncology*, *17*, 1077–1086.
- Dedon, P. C. & Tannenbaum, S. R. (2004). Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Archives Of Biochemistry Biophysics*, *423*, 12-22.
- Deller, S., Macheroux, P. & Sollner, S. (2008). Flavin-dependent quinone reductases. *Cellular And Molecular Life Sciences*, *65*, 141-160.
- Desgrosellier, J.S. & Chersesh, D. A. (2010). Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, *10*, 9–22.
- Dezwaan, D. C. & Freeman, B. C. (2008). HSP90: The rosetta stone for cellular protein dynamics?. *Cell Cycle*, *7*, 1006–1012.
- Diah, S. K., Smitherman, P. K., Aldridge, J., Volk, E. L., Schneider, E., Townsend, A. J. & Morrow, C. S. (2001). Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins. *Cancer Research*, *15*, 61(14), 5461-7.

- Dieras, V., Vincent-Salomon, A., Degeorges, A., Beuzeboc, P., Mignot, L. & de Cremoux, P. (2007). Trastuzumab (Herceptin) and breast cancer: Mechanisms of resistance. *Bulletin du Cancer*, *94*, 259–266.
- Dikalov, S., Landmesser, U. & Harrison, D. G. (2002). Geldanamycin leads to superoxide formation by enzymatic and non-enzymatic redox cycling. Implications for studies of Hsp90 and endothelial cell nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 25480–25485.
- Ding, X. W., Wu, J. H. & Jiang, C. P. (2010). ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sciences*, *86*, 631–637.
- Domingo-Domenech, J., Oliva, C., Rovira, A., Codony-Servat, J., Bosch, M., Filella, X., Montagut, C., Tapia, M., Campas, C. & Dang, L. (2006). Interleukin 6, a nuclear factor-kappaB target, predicts resistance to docetaxel in hormoneindependent prostate cancer and nuclear factor-kappaB inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity. *Clinical Cancer Research*, *12*, 5578–5586. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2767.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K. & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*, 15665–15670.
- Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M. & Thompson, C. B. (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *The EMBO Journal*, *15*, 2685–2694.
- Echtenkamp, F. J., Zelin, E., Oxelmark, E., Woo, J. I., Andrews, B. J., Garabedian, M. & Freeman, B. C. (2011). Global functional map of the p23 molecular chaperone reveals an extensive cellular network. *Molecular Cell*, *43*, 229–241.
- Edlind, M. P. & Hsieh, A. C. (2014). PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian Journal Of Andrology*, *16*, 378–86.
- Eiseman, J. L., Lan, J., Lagattuta, T. F., Hamburger, D. R., Joseph, E., Covey, J. M. & Egorin, M. J. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[2-dimethylamino) ethyl]amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C. B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *55*, 21–32.
- Engeland, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B. & Reutelingsperger, C. P. M. (1998). Annexin V Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry*, *31*, 1–9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R.
- Errington, F., Willmore, E., Tilby, M. J., Li, L., Li, G., Li, W., Baguley, B. C. & Austin, C. A. (1999). Murine transgenic cells lacking DNA topoisomerase II b are resistant to acridines and mitoxantrone: analysis of cytotoxicity and cleavable complex formation. *Molecular Pharmacology*, *56*, 1309–1316.
- Esteller, M. (2000). Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: Promoter hypermethylation of DNA repair genes. *European Journal Of Cancer*, *36*, 2294–2300.

- Fitzpatrick, J. M. & de Wit, R. (2014). Taxane mechanisms of action: potential implications for treatment sequencing in metastatic castration resistant prostate cancer. *European Urology*, 65, 1198–204.
- Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M. & Pastan, I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 265–269.
- Freemantle, S. J., Dragnev, K. H. & Dmitrovsky, E. (2006). The retinoic acid paradox in cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 426–7.
- Friedenreich, C. M., Neilson, H. K. & Lynch, B. M. (2010). State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *European Journal of Cancer*, 46 (14), 2593–604. doi: 10.1016/j.ejca.2010.07.028.
- Fukushima, T., Yamashita, T., Takemura, H., Suto, H., Kishi, S., Urasaki, Y. & Ueda, T. (2000). Effect of PSC 833 on the cytotoxicity and pharmacodynamics of mitoxantrone in multidrug-resistant K562 cells. *Leukemia Research*, 24, 249–254.
- Fukuyo, Y., Hunt, C. R. & Horikoshi, N. (2010). Geldanamycin and its anticancer activities. *Cancer Letters*, 290, 24–35.
- Galka, M. M. (2009). *Identification of abscisic acid binding proteins using a bioactive photoaffinity probe*. (Yayımlanmış doktora tezi). University of Saskatchewan/ Chemistry Department, Canada.
- Gallagher, R. P. & Fleshner, N. (1998). Prostate cancer: 3. Individual risk factors. *Canadian Medical Association Journal*, 159 (7), 807–13. PMC 1232741. Freely accessible PMID 9805030.
- Galletti, E., Magnani, M., Renzulli, M. L. & Botta, M. (2007). Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes. *ChemMedChem*, 2, 920–942.
- Gallagher, A. J. & Schiemann, W. P. (2006).  $\beta$ 3 integrin and Src facilitate transforming growth factor- $\beta$  mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Research*, 8, R42. doi: 10.1186/bcr1524
- Gan, L., Wang, J., Xu, H. & Yang, X. (2011). Resistance to Docetaxel-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells by p38/p53/p21 Signaling. *The Prostate*; 71, 1158–1166. doi: 10.1002/pros.21331
- Gan, L., Chen, S., Wang, Y., Watahiki, A., Bohrer, L. & Sun, Z. (2009). Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer. *Cancer Research*, 69, 8386–94.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L. & Roth, J. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 10046–10050. doi: 10.1074/jbc.273.16.10046.
- Goldstein, A. S., Huang, J., Guo, C., Garraway, I. P. & Witte, O. N. (2010). Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science*, 329 (5991), 568–71. doi:10.1126/science.1189992.

- Goldstein, S., Lind, J. & Merenyi, G. Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates. *Chemical Reviews*, 2005, 105: 2457-2470.
- Goode, E., Ulrich, C. & Potter, J. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11, 1513–1530.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2, 48–58.
- Gottesman, M. M. & Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 385–427.
- Guan, L., Zhao, J. & Scandalios, J.G. (2000). Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant. Journal*, 22, 87–95.
- Haber, M., Smith, J., Bordow, S., Flemming, C., Cohn, S., London, W., Marshall, G. & Norris, M. (2006). Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 1546–1553.
- Haldar, S., Chintapalli, J. & Croce, C. M. (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Research*, 56, 1253–1255.
- Hankey, B. F., Feuer, E. J., Clegg, L. X., Hayes, R. B., Legler, J. M., Prorok, P. C., Ries, L. A., Merrill, R. M. & Kaplan, R. S. (1999). Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer—part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *Journal of the National Cancer Institute*, 91 (12), 1017–24. doi:10.1093/jnci/91.12.1017.
- Harker, W. G., Slade, D. L., Parr, R. L., Feldhoff, P. W., Sullivan, D. M. & Holguin, M. H. (1995a). Alterations in the topoisomerase II a gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well as reduced expression of the DNA topoisomerase II b enzyme in a mitoxantrone-resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Research*, 55, 1707–1716.
- Harker, W. G., Slade, D. L., Parr, R. L. & Holguin, M. H. (1995b). Selective use of an alternative stop codon and polyadenylation signal within intron sequences leads to a truncated topoisomerase II a messenger RNA and protein in human HL-60 leukemia cells selected for resistance to mitoxantrone. *Cancer Research*, 55, 4962–4971.
- Harker, W. G., Slade, D. L., Drake, F. H. & Parr, R. L. (1991). Mitoxantrone resistance in HL-60 leukemia cells: reduced nuclear topoisomerase II catalytic activity and drug-induced DNA cleavage in association with reduced expression of the topoisomerase II b isoform. *Biochemistry*, 30, 9953–9961.
- Harris, K. A. & Reese, D. M. (2001). Treatment options in hormone-refractory prostate cancer: current and future approaches. *Drugs*, 61, 2177–2192.
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A. & Karlsson, J. (2007). Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metabolism and Disposition*, 35, 1333–1340. doi:10.1124/dmd.107.014902

- Ho, L. L., Kench, J. G., Handelsman, D. J., Scheffer, G. L., Stricker, P. D. & Grygiel, J. G. (2008). Androgen regulation of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in prostate cancer. *Prostate*, *68*, 1421–1429. doi: 10.1002/pros.20809.
- Hoffman, R. M., Gilliland, F. D., Eley, J. W., Harlan, L. C., Stephenson, R. A., Stanford, J. L., Albertson, P. C., Hamilton, A. S., Hunt, W. C. & Potosky, A. L. (2001). Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *Journal of the National Cancer Institute*, *93* (5), 388–95. doi:10.1093/jnci/93.5.388.
- Homma, S., Komohara, Y., Harada, M., Saya, H., Todo, S. & Itoh, K. (2007). Differential levels of human leukocyte antigen-class I, multidrug-resistance 1 and androgen receptor expressions in untreated prostate cancer cells: the robustness of prostate cancer. *Oncology Reports*, *18*, 343–346.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N. & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, *6*(3), 1769–1792. doi: 10.3390/cancer6031769
- Hsing, A.W. & Chokkalingam, A. P. (2006). Prostate cancer epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, *11*, 1388–413. doi:10.2741/1891.
- Hui-Ping, L., Ching-Yu, L., Ping-Hsuan, H., Horng-Dar, W., Shih, S. J., Jong-Ming, H., Wai-Tim, J., Marcelo, C., Hsing-Jien, K. & Chih-Pin, C. (2013). Difference in Protein Expression Profile and Chemotherapy Drugs Response of Different Progression Stages of LNCaP Sublines and Other Human Prostate Cancer Cells. *PLoS One*, *8*(12), e82625. doi: [10.1371/journal.pone.0082625](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082625).
- Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S. & Sugimoto, Y. (2005). Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Research*, *65*, 596–604.
- Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K. L., Rajewsky, K. & Glimcher, L. H. (2003). "Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1". *Nature Immunology*, *4* (4), 321–9. doi:10.1038/ni907
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J. & Thun, M. J. (2005). "Cancer statistics, 2005". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55* (1), 10–30. doi:10.3322/canjclin.55.1.10.
- Januchowski, R., Sterzyńska, K., Zaorska, K., Sosińska, P., Klejewski, A., Brązert, M., Nowicki, M. & Zabel, M. (2016). Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines. *Journal of Ovarian Research*, *9*, 65. doi: 10.1186/s13048-016-0278-z.
- Jhaveri, K., Miller, K., Rosen, L., Schneider, B., Chap, L., Hannah, A., Zhong, Z., Ma, W., Hudis, C. & Modi, S. A. (2012). Phase I dose-escalation trial of trastuzumab and alvespimycin hydrochloride (KOS1022; 17 DMAG) in the treatment of advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, *18*, 5090-5098. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3200
- Kantharidis, P., El-Oska, A., de Silva, M., Wall, D. M., Hu, X. F., Slater, A., Nadalin, G., Parkin, J. D. & Zalcberg, J. R. (1997). Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clinical Cancer Research*, *3*, 2025–2032.

- Katayama, K., Yoshioka, S., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J. & Sugimoto, Y. (2007). Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway results in the down-regulation of P-glycoprotein. *Molecular Cancer Therapeutics*, *6*, 2092–2102.
- Kawai, K., Sakurai, M., Sakai, T., Misaki, M., Kusano, I. & Shiraishi, T. (2000). Demonstration of MDR1 P-glycoprotein isoform expression in benign and malignant human prostate cells by isoformspecific monoclonal antibodies. *Cancer Letters*, *150*, 147–153.
- Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K. & Hay, N. (1999). Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, *19*, 5800-5810.
- Kharenko, O. A., Boyd, J., Nelson, K. M., Abrams, S. R. & Loewen, M. C. (2011). Identification and characterization of interactions between abscisic acid and mitochondrial adenine nucleotide translocators. *Biochemical Journal*, *437*, 117-123. doi: 10.1042/BJ20101898.
- Kim, H. J., Lee, K. Y., Kim, Y. W., Choi, Y. J., Lee, J. E., Choi, C. M., Baek, I. J., Rho, J. K. & Lee, J. C. (2015). P-glycoprotein confers acquired resistance to 17-DMAG in lung cancers with an ALK rearrangement. *BMC Cancer*, *15*, 553. doi: 10.1186/s12885-015-1543-z.
- Kim, J. G., Lee, S. C., Kim, O. K., Kim, K. H., Song, K. Y., Lee, S. K., Choi, B. J., Jeong, W. & Kim, S. J. (2017). HSP90 inhibitor 17-DMAG exerts anticancer effects against gastric cancer cells principally by altering oxidant-antioxidant balance. *Oncotarget*, *8*(34), 56473-56489. doi: 10.18632/oncotarget.17007.
- Kucukzeybek, Y., Gul, M. K., Cengiz, E., Erten, C., Karaca, B., Gorumlu, G., Atmaca, H., Uzunoglu, S., Karabulut, B., Sanli, U. A. & Uslu, R. (2008). Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity and apoptosis by all-trans retinoic acid (ATRA) through downregulation of survivin (BIRC5), MCL-1 and LTbeta-R in hormone- and drug resistant prostate cancer cell line, DU-145. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *27*-37. doi:10.1186/1756-9966-27-37.
- Kumar, R., Horikoshi, N., Singh, M., Gupta, A., Misra, H. S., Albuquerque, K., Hunt, C. R. & Pandita, T. K. (2012). Chromatin modifications and the DNA damage response to ionizing radiation. *Frontiers in Oncology*, *2*, 214. doi:10.3389/fonc.2012.00214.
- Lage, H. (2008). An overview of cancer multidrug resistance: A still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*, 3145–3167. doi: 10.1007/s00018-008-8111-5.
- Laubli, H. & Borsig, L. Selectins promote tumor metastasis. (2010). *Seminars in Cancer Biology*, *20*, 169–177. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.04.005
- Lee, B. Y., Hochgrafe, F., Lin, H. M., Castillo, L., Wu, J., Raftery, M. J., Martin, S. S., Horvath, L. G. & Daly, R. J. (2014). Phosphoproteomic profiling identifies focal adhesion kinase as a mediator of docetaxel resistance in castrate-resistant prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(1), 190–201. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0225-T.
- Lee, K. M., Cao, D., Itami, A., Pour, P. M., Hruban, R. H. & Maitra, A. (2007). Class III  $\beta$ -tubulin, a marker of resistance to paclitaxel, is over- expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and intra epithelial neoplasia. *Histopathology*, *51*, 539–46. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02792.x.



- Lee, K., Klein-Szanto, A. J. & Kruh, G.D. (2000). Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1934–1940. doi: 10.1093/jnci/92.23.1934.
- Lee, M. V., Katabathina, V. S., Bowerson, M. L., Mityul, M. I., Shetty, A. S., Elsayes, K. M., Balachandran, A., Bhosale, P. R., McCullough, A. E. & Menias, C. O. (2016). BRCA-associated Cancers: Role of Imaging in Screening, Diagnosis, and Management. *RadioGraphics*, 37(4), 1005–1023. doi:10.1148/rg.2017160144.
- Lee, W. H., Park, Y. M., Kim, J. I., Park, W. Y., Kim, S. H., Jang, J. J. & Seo, J. S. (1998). Expression of heat shock protein 70 blocks thymic differentiation of T cells in transgenic mice. *Immunology*, 95, 559–565.
- Leggas, M., Adachi, M., Scheffer, G. L., Sun, D., Wielinga, P. & Du, G. (2004). Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 7612–7621. doi: 10.1128/MCB.24.17.7612-7621.2004.
- Lenisak, D., Xu, Y., Deschenes, J., Lai, R., Thoms, J., Murray, D., Gosh, S., Mackey, J. R., Sabri, S. & Abdulkarim, B. (2009). Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Research*, 69, 8620–8628. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1591.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G. & Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 216–237. doi: 10.1016/j.taap.2004.10.012.
- Lindahl, T., Modrich, P. & Sancar, A. (2016). The 2015 Nobel Prize in Chemistry The Discovery of Essential Mechanisms that Repair DNA Damage. *Journal of the Association of Genetic Technologists*, 42(1), 37-41.
- Liu, C., Zhu, Y., Lou, W., Nadiminty, N., Chen, X., Zhou, Q., Shi, X. B., White, R. W. & Gao, A., C. (2013). Functiona Ip53 Determines Docetaxel Sensitivity in Prostate Cancer Cells. *The Prostate*, 73, 418 -427. doi: 10.1002/pros.22583.
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E. & MacKenzie, A. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379, 349–353. doi:10.1038/379349a0.
- Livingston, V. (1976). Abscisic acid tablets and process. US patent no: 3958025.
- Llesuy, S. F. & Arnaiz, S. L. (1990). Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology*, 63(2), 187-198. doi: 10.1016/0300-483X(90)90042-F.
- Lo-Coco, F., Avvisati, G. & Vignetti, M. (2013). Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *The New Engl Journal of Medicine*, 369, 111–21. doi: 10.2147/OTT.S100513.
- Lu, Y. G., Tan, J., Zhao, H. F., Zhang, J., Ma, L. Q. & Guo, F. (2007). Experimental study of growth inhibition in nude mice transplanted human hepatocarcinoma treated with abscisic acid. *Journal of Kunming Medical College*, 16(11), 933–6.

Lu, Y. G., Tan, J., Zhang, J., Ma, L. Q., Guo, F. & Guo, Y. Z. (2006). Abscisic acid inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells. *Basic & Clinical Medicine*, 28(4), 376–8.

Luqmani, Y. A. (2005). Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, 14, 35–48. doi:10.1159/000086183.

Ma, Q. Y., Wu, B. Q., Lu, Y. G., Chu, W. W. & Guo, Y. Z. (2006). The effect of induced differentiation of abscisic acid on human HCC cell line SMMC- 7721. *Journal of Kunming Medical College*, 3:14–8.

Machioka, K., Izumi, K., Kadono, Y., Iwamoto, H., Naito, R., Makino, T., Kadomoto, S., Natsagdorj, A., Keller, E. T., Zhang, J. & Mizokami, A. (2018). Establishment and characterization of two cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines. *Oncotarget*, 9(22), 16185-16196. doi: 10.18632/oncotarget.24609.

Magadoux, L., Isambert, N., Plenchette, S., Jeannin J. F. & Laurens, V. (2014). Emerging targets to monitor and overcome docetaxel resistance in castration resistant prostate cancer. *International Journal of Oncology*, 45(3), 919-28. doi: 10.3892/ijo.2014.2517.

Maher, J. M., Cheng, X., Tanaka, Y., Scheffer, G. L. & Klaassen, C. D. (2006). Hormonal regulation of renal multidrug resistance-associated proteins 3 and 4 (Mrp3 and Mrp4) in mice. *Biochemical Pharmacology*, 71, 1470–1478. doi: 10.1016/j.bcp.2006.02.005.

Maliepaard, M., van Gastelen, M. A., de Jong, L. A., Pluim, D., van Waardenburg, R. C., Ruevekamp-Helmers, M. C., Floot, B. G. & Schellens, J. H. (1999). Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Research*, 59, 4559–4563.

Manolitsas, T. P., Englefield, P., Eccles, D. M. & Campbell, I. G. (1997). No association of a 306 bp insertion polymorphism in the progesterone receptor gene with ovarian and breast cancer. *British Journal of Cancer*, 75, 1397–1399.

Mansour, M., van Ginkel S., Dennis, J. S., Mason, B., Elhussin, I., Abbott, K., Podogula, S. R., Samuel, T. & Morrison, E. (2018). The Combination of Omega-3 Stearidonic Acid and Docetaxel Enhances Cell Death over Docetaxel Alone in Human Prostate Cancer. *Journal of Cancer*, 9(23), 4536-4546. doi: 10.7150/jca.26681.

Martin, R. M., Vatten, L., Gunnell, D. & Romundstad, P. (2010). Blood pressure and risk of prostate cancer: cohort Norway (CONOR). *Cancer Causes Control*, 21(3), 463–72. doi:10.1007/s10552-009-9477-x.

Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M. R., Lozano, E., Anadon, C., Macias, R. I. R., Serrano, M. A., Grañé-Boladeras, N., Muñoz-Bellvis, L., Alvarez, L., Sangro, B., Pastor-Anglada, M. & Marin, J. J. G. (2012). No Correlation between the Expression of FXR and Genes Involved in Multidrug Resistance Phenotype of Primary Liver Tumors. *Molecular Pharmaceutics*, 9(6), 1693-704. doi: 10.1021/mp300028a.

Mathew, G., Timm, E. A., Sotomayor, P., Godoy, A., Montecinos, V. P. & Smith, G. J. (2009). ABCG2-mediated DyeCycle Violet efflux defined side population in benign and malignant prostate. *Cell Cycle*, 8, 1053–1061. doi: 10.4161/cc.8.7.8043.

- Mehta, K. & Fok, J. Y. (2009). *Targeting transglutaminase-2 to overcome chemoresistance in cancer cells*. New York: Springer. Drug Resistance in Cancer Cells, pp 95-114. doi: 10.1007/978-0-387-89445-4\_5.
- Merhi, F., Tang, R., Piedfer, M., Mathieu, J. & Bombarda, I. (2011). Hyperforin Inhibits Akt1 Kinase Activity and Promotes Caspase-Mediated Apoptosis Involving Bad and Noxa Activation in Human Myeloid Tumor Cells. *PLoS ONE*, 6(10), e25963. doi:10.1371/journal.pone.0025963.
- Mirski, S. E., Gerlach, J. H. & Cole, S. P. (1987). Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in Adriamycin. *Cancer Research*, 47, 2594–2598.
- Mohr, L., Carceles-Cordon, M., Woo, J., Cordon-Cardo, C., Domingo-Domenech, J., Rodriguez-Bravo, V. (2017). Generation of Prostate Cancer Cell Models of Resistance to the Anti-mitotic Agent Docetaxel. *Journal of Visualized Experiments*, 127, 1-8. doi: 10.3791/56327.
- Moise, A. R., von Lintig J. & Palczewski, K. (2005). Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in the metabolism of carotenoids. *Trends in Plant Science*, 10, 178–86. doi: 10.1016/j.tplants.2005.02.006.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*, 65 (1–2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Mutoh, K., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J., Katayama, K. & Sugimoto, Y. (2006). Estrogen-mediated post transcriptional downregulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells. *Cancer Science*, 97, 1198–1204. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00300.x.
- Nachmias, B., Ashhab, Y., Ben-Yehuda, D. (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biology*, 14, 231–243. doi: 10.1016/j.semcancer.2004.04.002.
- Neckers, L. & Neckers, K. (2002). Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 7, 277-288. doi: 10.1517/14728214.7.2.277.
- Nomura, T., Mimata, H., Takeuchi, Y., Yamamoto, H., Miyamoto, E. & Nomura, Y. (2003). The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits taxol-induced apoptosis in LNCaP cells. *Urological Research*, 31, 37–44. doi:10.1007/s00240-003-0300-y.
- Nyangulu, J. M., Galka, M. M., Jadhav, A., Gai, Y., Graham, C. M., Nelson, K. M., Cutler, A. J., Taylor, D. C., Banowetz, G. M. & Abrams, S. R. (2005). An affinity probe for isolation of abscisic acid-binding proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 16621664. doi: 10.1021/ja0429059.
- Oprea-Lager D. E., Bijnsdorp I. V., van Moorselaar R. J., van den Eertwegh A. J., Hoekstra O. S. & Geldof A. A. (2013). ABCC4 decreases docetaxel and not cabazitaxel efficacy in prostate cancer cells in vitro. *Anticancer Research*, 33, 387–391.
- Pacey, S., Wilson, R. H., Walton, M., Eatock, M. M., Hardcastle, A., Zetterlund, A., Arkenau, H. T., Moreno-Farre, J., Banerji, U., Roels, B., Peachey, H., Aherne, W. & de Bono, J. S. (2011). A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG)

given intravenously to patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 17, 1561-1570. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1927.

Paschos, K. A., Canovas, D. & Bird, N. C. (2009). The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cellular Signaling*, 21, 665–674. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.01.006.

Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* 2, 751 – 760. doi: 10.1038/nnano.2007.387.

Penning, T. M., (2015). Mechanisms of drug resistance that target the androgen axis in castration resistant prostate cancer (CRPC). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 153, 105–13. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.05.010.

Persidis, A., (1999). Cancer multidrug resistance. *Nature Biotechnology*, 17, 94 - 95 doi:10.1038/5289.

Petrylak, D.P., Tangen, C. M., Hussain, M. H., Lara, P. N., Jr., Jones, J. A. & Taplin, M. E. (2004). Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351, 1513–1520. doi: 10.1056/NEJMoa041318

Pick, E., Kluger, Y., Giltane, J. M., Moeder, C., Camp, R. L., Rimm, D. L. & Kluger, H. M. (2007). High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Research*, 67, 2932-2937. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4511.

Piehler, A. P., Hellum, M., Wenzel, J. J. (2008). The human ABC transporter pseudogene family: Evidence for transcription and gene-pseudogene interference. *BMC Genomics*, 9, 165. doi: 10.1186/1471-2164-9-165.

Powles, T. J. (1997). Evolving clinical strategies: innovative approaches to the use of mitoxantrone—introduction. *European Journal of Cancer Care*, 6 (4), 1–3.

Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 4003-4008. doi: 10.1073/pnas.0307446101.

Razis, E., Bobos, M., Kotoula, V., Eleftheraki, A. G., Kalofonos, H. P., Pavlakis, K., Papakostas, P., Aravantinos, G., Rigakos, G. & Efstratiou, I. (2011). Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128, 447–456. doi: 10.1007/s10549-011-1572-5.

Rea, P. A. (2007). "Plant ATP-binding cassette transporters". *Annual Review of Plant Biology*, 58, 347–75. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105406.

Rigacci, L., Carpaneto, A., Alterini, R., Carrai, V., Bernardi, F., Bellesi, G., Longo, G., Bosi, A. & Rossi, F. P. (2003). Treatment of large cell lymphoma in elderly patients with a mitoxantrone, cyclophosphamide, etoposide, and prednisone regimen: longterm follow-up results. *Cancer*, 97, 97–104. doi: 10.1002/cncr.11032

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. & Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 tumor suppressor gene. *Genes & cancer*, 2, 466–474. doi: 10.1177/1947601911408889.

- Rozpędek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczyńska, H., Diehl, J. A. & Majsterek, I. (2016). The Role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Current Molecular Medicine*, 16(6), 533–544. doi: 10.2174/1566524016666160523143937
- Ruddon, R. W. (2007). *Potential Role of Hippo-Signaling Pathway in Gastric Cancer. Cancer biology (4th ed.)*. Oxford: Oxford University Press, p. 223. ISBN 9780195175431.
- Sabnis, J. A., Guerriero, C. J., Olivas, V., Sayana, A., Shue, J., Flanagan, J., Asthana, S., Paton, A. W., Paton, J. C., Gestwicki, J. E., Walter, P., Weissman, J. S., Wipf, P., Brodsky, J. L. & Bivona, T. G. (2016). Combined chemical–genetic approach identifies cytosolic HSP70 dependence in rhabdomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(32), 9015–9020. doi: 10.1073/pnas.1603883113.
- Safa, A. R. & Pollok, K. E., (2011). Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy. *Cancers*, 3(2), 1639-1671; doi: 10.3390/cancers3021639.
- Sarkar, S. & Faller, D. V. (2013). Telomere-homologous G-rich oligonucleotides sensitize human ovarian cancer cells by combination therapy. *Nucleic Acid Therapeutics*, 23, 167–174. doi: 10.1089/nat.2012.0401.
- Sarkar, S. & Faller, D.V. (2011). T-oligos inhibit growth and induce apoptosis in human ovarian cancer cells. *Oligonucleotides*, 21, 47–53. doi: 10.1089/oli.2010.0259.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S. & Longacre, M. (2013). Cancer development, progression and therapy: An epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 21087–21113. doi: 10.3390/ijms141021087.
- Sarkar, S., Svoboda, M., de-Beaumont, R. & Freedman, A. (2002). The role of AKT and RAFTK in beta1 integrin mediated survival of precursor B-acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*, 43, 1663–1671. doi: 10.1080/1042819021000003009.
- Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K. & Hiyoshi, M. (2010). Chloroquine potentiates the anticancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer*, 10, e370. doi: 10.1186/1471-2407-10-370.
- Sauna, Z. & Ambudkar, S. (2001). Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 11653–11661. doi: 10.1074/jbc.M011294200.
- Schinkel, A., Smit, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C., van der Valk, M., Robanus-Maandag, R. & te Riele, H. vd. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77, 491–502. doi: 10.1016/0092-8674(94)90212-7
- Schneider, E., Horton, J., Yang, C. H., Nakagawa, M. & Cowan, K. H. (1994). Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF-7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Research*, 54, 152–158.

- Selvakumaran, M., Pisarcik, D., Bao, R., Yeung, A. & Hamilton, T. (2003). Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Research*, *63*, 1311–1316.
- Seruga, B., Ocana, A. & Tannock, I. F. (2011). Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *8*, 12–23. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.136.
- Shang, Y., Cai, X. & Fan, D. (2013). Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. *Current Cancer Drug Targets*, *13*, 915–929. doi: 10.2174/15680096113136660097.
- Shibue, T. & Weinberg, R. A. (2009). Integrin  $\beta$ 1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*, 10290–10295. doi: 10.1073/pnas.0904227106.
- Shin D. W., Lee S. H., Kim T. H., Yun S. J., Nam J. K., Jeon S. H., Park S. C., Jung S. I., Park J. H. & Park J. (2019). “Health-Related Quality of Life Changes in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy”, A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Research and Treatment*, *51*(2), 556-567. doi: 10.4143/crt.2018.221.
- Shirota, T., Ojima, H., Hiraoka, N., Shimada, K., Rokutan, H., Arai, Y., Kanai, Y., Miyagawa, S. & Shibata, T. (2015). Heat shock protein 90 is a potential therapeutic target in cholangiocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*, 1985-1993. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0069.
- Siegel, R. L., Miller K. D. & Jemal, A. (2018). Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*, 7–30. doi:10.3322/caac.21442.
- Singh, A. & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, *29*, 4741–4751. doi: 10.1038/onc.2010.215.
- Sissung, T.M., Baum, C.E., Deeken, J., Price, D.K., Aragon-Ching, J. & Steinberg, S. M. (2008). ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with androgenindependent prostate cancer treated with docetaxel. *Clinical Cancer Research*, *14*, 4543-4549. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4230.
- Skatrud, P. L. (2002). *The impact of multiple drug resistance (MDR) proteins on chemotherapy and drug discovery*. New York: Springer. *Progress in Drug Research*, *58*, pp 99–131.
- Soengas, M. S., Alarcón, R. M., Yoshida, H., Giaccia, A. J., Hakem, R., Mak, T. W. & Lowe, S. W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, *284*, 156–159. doi: 10.1126/science.284.5411.156.
- Song, C. H., Park, S. Y., Eom, K. Y., Kim, J. H., Kim, S. W., Kim, J. S. & Kim, I. A. (2010). Potential prognostic value of heat-shock protein 90 in the presence of phosphatidylinositol-3-kinase overexpression or loss of PTEN, in invasive breast cancers. *Breast Cancer Research*, *12*(2), R20. doi: 10.1186/bcr2557.
- Soria, J., Smit, E., Khayat, D., Besse, B., Yang, X., Hsu, C., Reese, D., Wiezorek, J. & Blackhall, F. (2010). Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-

squamous non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 1527–1533. doi: 10.1200/JCO.2009.25.4847.

Sreedhar, A. S., Mihaly, K., Pato, B., Schnaider, T., Stetak, A., KisPetik, K., Fidy J., Simonics T., Maraz A. & Csermely, P. (2003). Hsp90 inhibition accelerates cell lysis. Anti-Hsp90 ribozyme reveals a complex mechanism of Hsp90 inhibitors involving both superoxide- and Hsp90-dependent events. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 35231-35240. doi: 10.1074/jbc.M301371200.

Staussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., Davis, A., Mongare, M. M., Gould, J. & Frederick, D. T. Tumor micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487, 500–504. doi: 10.1038/nature11183.

Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U. & Pavletich, N. P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, 89, 239-250. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80203-2.

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B & Walsh PC (1990). "Family history and the risk of prostate cancer". *Prostate*, 17(4), 337–47. doi:10.1002/pros.2990170409. PMID 2251225.

Stewart, B. W. & Wild C. P., (2014). ‘*World Cancer Report 2014*’. Geneva: World Health Organization, Chapter 5.11. ISBN 9283204298.

Sullivan, G. F., Amenta, P. S., Villanueva, J. D., Alvarez, C. J., Yang, J. M. & Hait, W. N. (1998). The expression of drug resistance gene products during the progression of human prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 4, 1393–1403.

Suzuki, T., Ezure, T. & Ishida, M. (1998). Synergistic effects of some pairs of antioxidants and related agents on mouse leukaemia L178Y cell growth in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(10), 1173–7. doi: 10.1111/j.2042-7158.1998.tb03330.x

Szakas, G., Annereau, J., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G. & Reimers, M. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*, 6, 129–137. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.026

Taiyab, A., Sreedhar, A. S. & Rao, Ch. M. (2009). Hsp90 inhibitors, GA and 17AAG, lead to ER stress-induced apoptosis in rat histiocytoma. *Biochemical Pharmacology*, 78, 142-152. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.001.

Tan, H., Lei, B. L., Li, Z. D., Zhou, J. Y., Yang, J. & Zhong, J. (2006). New use of natural abscisic acid in developing “differentiation inducer” drugs of tumor cells. Patent No: 1,748,674A.

Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A. & Chi, K. N. (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostatecancer. *The New England Journal of Medicine*, 351, 1502–12. doi: 10.1056/NEJMoa040720.

Tian, Q., Zhang, J., Tan, T.M., Chan, E., Duan, W. & Chan, S.Y. (2005). Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins. *Pharmaceutical Research*, 22, 1837–1853. doi: 10.1007/s11095-005-7595-z.

- Toren, P. & Zoubeidi, A. (2014). Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer. *International Journal of Oncology*, 45(5), 1793-801. doi: 10.3892/ijo.2014.2601.
- Townsend, D. M. & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369–7375. doi: 10.1038/sj.onc.1206940.
- Toulany, M., Dittmann, K., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Baumann, M. & Rodemann, H. P. (2008). PI3K-Akt signaling regulates basal, but MAP-kinase signaling regulates radiation-induced XRCC1 expression in human tumor cells in vitro. *DNA Repair*, 7, 1746–1756. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.06.017.
- Tsakalozou, E., Ackman, A. M. & Bae, Y. (2012). Combination Effects of Docetaxel and Doxorubicin in Hormone-Refractory Prostate Cancer Cells. *Hindawi Publishing Corporation Biochemistry Research International*, Article ID 832059, 10 pages. doi:10.1155/2012/832059.
- Van Brussel, J. P., Jan van Steenbrugge, G., Van Krimpen, C., Bogdanowicz, J. F., Van Der Kwast, T. H. & Schroder, F. H. (2001). Expression of multidrug resistance related proteins and proliferative activity is increased in advanced clinical prostate cancer. *The Journal of Urology*, 165, 130–135. doi: 10.1097/00005392-200101000-00032
- Van Brussel, J. P., Jan van Steenbrugge, G. J., Romijn, J. C., Schroder, F. H. & Mickisch, G. H. (1999). Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *European Journal of Cancer*, 35, 664–671. doi: 10.1016/S0959-8049(98)00435-3.
- Van der Crujisen-Koeter, I. W., Vis, A. N., Roobol, M. J., Wildhagen, M. F., de Koning, H. J., Van der Kwast, T. H. & Schröder, F. H. (2005). "Comparison of screen detected and clinically diagnosed prostate cancer in the European randomized study of screening for prostate cancer, section rotterdam". *The Journal of Urology*, 174(1), 121–5. doi:10.1097/01.ju.0000162061.40533.0f.
- Van Zuylen, L., Sparreboom, A., Van der Gaast, A., Nooter K, Eskens F. A., Brouwer, E., Bol, C. J., de Vries, R., Palmer, P. A. & Verweij, J. (2002). Disposition of docetaxel in the presence of P-glycoprotein inhibition by intravenous administration of R101933. *European Journal of Cancer*, 38, 1090–1099. doi: 10.1016/s0959-8049(02)00035-7.
- Vibet, S., Mahe´o, K., Gore´, J., Dubois, P., Bougnoux, P. & Chourpa, I. (2007). Differential subcellular distribution of mitoxantrone in relation to chemosensitization in two human breast cancer cell lines. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(5), 822–828. doi: 10.1124/dmd.106.013474.
- Wasilewska, A., Vlad, F. & Sirichandra, C. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant*, 1(2), 198–217. doi: 10.1093/mp/ssm022.
- Wendt, M. K., Smith, J. A. & Schiemann, W. P. (2010). Transforming growth factor- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene*, 29(49), 6485–6498. doi: 10.1038/onc.2010.377.
- Willmore, E., de Caux, S., Sunter, N. J., Tilby, M. J., Jackson, G. H., Austin, C. A. & Durkacz, B. W. (2004). A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood*, 103, 4659-4665. doi: 10.1182/blood-2003-07-2527



- Witz, I. P. (2008). The selectin-selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer Metastasis*, 27(1), 19–30. doi: 10.1007/s10555-007-9101-z.
- Workman, P., Burrows, F., Neckers, L. & Rosen, N. (2007). Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, 202-216. doi: 10.1196/annals.1391.012.
- World Cancer Report 2014. Geneva: World Health Organization. 2014, pp. Chapter 1.1. ISBN 9283204298.
- Xie, Y., Xu, K., Linn, D. E., Yang, X., Guo, Z. & Shimelis, H. (2008). The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3349–3356. doi: 10.1074/jbc.M707773200
- Yanase, K., Tsukahara, S., Asada, S., Ishikawa, E., Imai, Y. & Sugimoto, Y. (2004). Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(9), 1119–1125.
- Wang, Y., Zhang, Y., Kathawala, R. J. & Chen, Z. S. (2014). Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in Anticancer Drug Resistance. *Cancers*, 6, 1925-1952. doi: 10.3390/cancers6041925.
- Wilairat, R., Kijjoa, A., Pinto, M., Nascimento, M., S., J., Silva, A. M. S., Eaton, G. & Herz, W. (2006). Constituents of *Schisandra verruculosa*. and Their Cytotoxic Effect on Human Cancer Cell Lines. *Pharmaceutical Biology*, 44(6), 411–415. doi: 10.1080/13880200600794105
- Yang, X. J., Mc Entee, M. & Epstein, J. I. (Dec 1998). "Distinction of basaloid carcinoma of the prostate from benign basal cell lesions by using immunohistochemistry for bcl-2 and Ki-67". *Human Pathology*, 29(12), 1447-50. doi: 10.1016/S0046-8177(98)90014-4.
- Yu, S., Cai, X., Wu, C., Liu, Y., Zhang, J., Gong, X., Wang, X., Wu, X., Zhu, T., Mo, L., Gu, J., Yu, Z., Chen, J., Thiery, J. P., Chai, R. & Chen, L. (2017). Targeting HSP90-HDAC6 Regulating Network Implicates Precision Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(4), 505-517. doi: 10.7150/ijbs.18834.
- Zalcborg, J., Hu, X. F., Slater, A., Parisot, J., El-Osta, S. & Kantharidis, P. (2000). MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 3(2), 66–75. doi: 10.1038/sj.pcan.4500394.
- Zhao, H. W., Li, L. J., Pan, J., Han, B., Xia, H. & Wen, Y. M. (2008). Apoptosis of Tca8113 squamous cell carcinoma cells induced by abscisic acid in animal models. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 35(9): 523–6.
- Zhao, L., Lee, B. Y., Brown, D. A., Molloy, M. P., Marx, G. M., Pavlakis, N., Boyer, M. J., Stockler, M. R., Kaplan, W., Breit, S. N., Sutherland, R. L., Henshall, S. M. & Horvath, L. G. (2009). Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Research* 69(19), 7696–7703. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4901.

Zhou, C. K., Check, D. P., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A. & Ferlay, J. (2016). Prostate cancer incidence in 43 populations world- wide: an analysis of time trends overall and by age group. *International Journal of Cancer*, *138*(6), 1388–400. doi: 10.1002/ijc.29894.

Zhou, N., Yao, Y., Ye, H., Zhu, W., Chen, L. & Mao, Y. (2015). Abscisic-acid-induced cellular apoptosis and differentiation in glioma via the retinoid acid signaling pathway. *International Journal of Cancer*, *138*, 1947-1958. doi: 10.1002/ijc.29935.

Zhou, R., Wang, Y., Gruber, A., Larsson, R., Castanos-Velez, E. & Liliemark, E. (1999). Topoisomerase II-mediated alterations of K562 drug resistant sublines. *Medical Oncology*, *16*(3), 191–198.

Zhu, Y., Liu, C., Armstrong, C., Lou, W., Sandher, A. & Gao, A. C. (2015). Antiandrogens inhibit ABCB1 efflux and ATPase activity and reverse docetaxel resistance in advanced prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, *21*(18), 4133–42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0269.

## ÖZGEÇMİŞ

2 Mart 1982 Tarihinde Ankara’da doğdum. İlk okulu Aydın Anadolu İlköğretim okulunda, orta okulu Yalçın Eskiyanan orta okulunda tamamladıktan sonra 1998 yılında Etimesgut Anadolu Lisesinden mezun oldum. 2002-2006 Yılları arasında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitimimi tamamladım. Kasım 2006-Mayıs 2007 tarihleri arasında askerlik görevimi yaptıktan sonra 2007 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım ve 2010 yılında mezun oldum. Medikal alanda hizmet veren şirketlerde 1,5 yıl çalıştıktan sonra 24 Ocak 2014 tarihinde Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi (TÜTAGEM)’nde uzman akademik personel olarak çalışmaya başladım ve halen bu devam etmekteyim.