



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



FLOROGLUSİNOL'ÜN İNSAN PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ZEYNEP RÜMEYSA KAYMAZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLOROGLUSİNOL'ÜN İNSAN PROSTAT KANSERİ
HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Zeynep Rümeysa KAYMAZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
TYL-2022-2671 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Floroglusinol’un İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkinliğinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zeynep Rümeysa KAYMAZ

Tarih:

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalında Zeynep Rümeysa Kaymaz tarafından
hazırlanan “Floroglusinol’ün İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik
ve Apoptotik Etkinliğinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması, aşağıdaki
jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1.GİRİŞ	1
1.1.Prostat kanseri	2
1.1.1. Tanımı	3
1.1.2. Etiyolojisi	4
1.1.2.1. Genetik	6
1.1.2.2. Diyet	7
1.1.2.3. 5-alfa redüktaz İnhibitörleri	8
1.1.2.4. Enfeksiyon	8
1.1.3. Epidemiyolojisi	10
1.1.4. Tedavi	11
1.2. Apoptozis	13
1.2.1. Tanımı	13
1.2.2. Mekanizması	15
1.2.2.1. Ektrinsik Yolak	16
1.2.2.2. İntrinsik Yolak	16
1.3. Floroglusinol	19
1.3.1. Floroglusinol'ün Yapısı	19
1.3.2. Floroglusinol'ün Etkisi	21
1.4. Florotanenler	23
1.4.1. Florotanenlerin Yapısı ve Sınıflandırılması	24
1.4.2. Florotanenlerin Etkisi	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Kullanılan Gereçler	28
2.2. Hücrelerin Çoğaltılması	28
2.3. Hücre Canlılık Testi	29
2.4. Hücre Döngüsü Analizi	31
2.5. Annexin V Bağlanma Analizi	31
2.6. Floresan Görüntüleme	32
3. BULGULAR	33
3.1. Hücre Canlılık Testi	33
3.2. Hücre Döngüsü Analizi	35
3.3. Annexin V Bağlanma Analizi	37
3.4. Floresan Görüntüleme	39
4. TARTIŞMA	40

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
ÖZET	43
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	52



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezim boyunca değerli yardım ve katkılarıyla bana yol gösteren, bilgi ve desteğini benden esirgemeyen sayın hocam ve danışmanım Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle benden yardımını esirgemeyen Ecz. Nuri Özmen'e ve bana çalışma ortamı sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, sevgili anne ve babama teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADT	Androjen Yoksunluğu Terapisi
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
BPH	İyi huylu Prostat Hiperplazisi
CARD	Kaspaz Aktivasyonu Alım Alanları
17 β -HSD	17 β -hidroksiteroid Dehidrojenaz
DHT	Dihidrottestesteron
DD	Death Domain
DED	Ölüm Efektör Alanı
5-ARI	5- α Redüktaz inhibitörleri
EBRT	Eksternal Işın Radyoterapi
EPC	Endotelyal Progenitör Hücre
FAS-L	Fas Ligand
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
HIFU	Yüksek Yoğunluklu Odaklı Ultrason
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HT-29	İnsan Kolon Kanseri Hücreleri
HUBC	İnsan Göbek Kordonu Kanı
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
LLC	Lewis Akciğer Karsinomu
LNCaP	Androjene Duyarlı İnsan Prostat Adenokarsinomu Hattı

MRS	Manyetik Rezonans Spektroskopi
MOMP	Mitokondrial Dış Membran Geçirgenliği
NO	Nitrik Oksit
NAFLD	Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı
HCC	Hepatoselüler Karsinoma
EMT	Epitelyal-mezenkimal Hücre Geçişi
PET-CT	Pozitron Emisyon Tomografisi-CT
PIN	Prostat İntraepitelyal Neoplazisi
PSA	Prostat Spesifik Androjen
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SIPS	Strese Bağlı Erken Yaşlanma
SHBG	Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
TNF	Tümör nekroz Faktörü
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
VEGF	Endotelyal Büyüme Faktörü
V79-4	Çin Hamsteri Akciğer Fibroblast Hücreleri
XIAP	Apoptoz Protein İnhibitörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İnsan prostat kanserinin gelişimi	3
Şekil 1.2 Prostat kanseri için koruyucu tedbirler ve risk faktörleri	5
Şekil 1.3. Apoptozun Ekstrinsik ve İntrinsik Yolakları	18
Şekil 1.4. Floroglusinol'ün yapısı	20
Şekil 1.5. Florotanenlerin biyokimyasal özellikleri	24
Şekil 1.6. Florotanenlerin yapısı.	25
Şekil 2.1. Prostat kanseri hücrelerinin mikroskop altında görüntüsü	29
Şekil 2.2. Formazan kristalleri.	30
Şekil 2.3. Floroglusinolün 24. saat MTT analizi kalibrasyon grafiği	30
Şekil 3.1. Floroglusinol'ün 24 saat inkübasyon sonrası PC-3 hücre canlılığı üzerine etkisi	33
Şekil 3.2. Floroglusinol'ün 48 saat inkübasyon sonrası PC-3 hücre canlılığı üzerine etkisi.	33
Şekil 3.3. Kontrol grubu PC-3 hücreleri ile yapılan hücre döngüsü analiz plot grafiği.	35
Şekil 3.4. Floroglusinol (7,25 mM) uygulanan PC-3 hücreleri ile yapılan hücre döngüsü analiz plot grafiği.	35
Şekil 3.5. Floroglusinol'ün PC-3 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisi	36
Şekil 3.6. Kontrol grubu PC3 hücreleri ile yapılan Annexin V bağlanma analizi plot grafiği.	37
Şekil 3.7. Floroglusinol (7,25 mM) uygulanan PC-3 hücreleri ile yapılan Annexin V bağlanma analizi plot grafiği	37
Şekil 3.8. Floroglusinol'ün PC-3 hücrelerinde Annexin V bağlanması üzerine etkisi.	38
Şekil 3.9. Floroglusinol uygulanan PC3 insan prostat kanseri hücrelerinde floresan görüntüleme bulguları.	39

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Floroglusinol'ün, PC3 hücrelerinde hücre canlılığı analiz sonuçları	34
Çizelge 3.2. Hücre döngüsü analizi bulguları	36
Çizelge 3.3. Annexin V bağlanma analizi bulguları	38



1.GİRİŞ

Prostat kanseri, diyet, meslek ve yaşam tarzından bağımsız olarak, tüm dünyada prevalansı en yüksek kanser türüdür (Bostwick ve ark., 2004). Erkeklerde akciğer kanserinden sonra en yaygın ikinci kanser türü olan prostat kanseri, erken evrede radyasyon, cerrahi ve hormon tedavisi gibi geleneksel tedaviler ile tedavi edilebilirken, metastatik prostat kanseri ölümcüldür (Christenson ve ark., 2022). Son yıllarda, yeni ilaçlar ve kombinasyonları prostat kanserinin olumsuz sonuçlarını iyileştirmiştir. Bu bileşiklerin hastalığın erken evrelerindeki etkinliklerinin araştırılması ve prostat kanserinin daha etkili tedavileri için çalışmalar devam etmektedir. İlerlemelere ve teknolojik gelişmelere rağmen ek tedavi seçeneklerine ve yan etkileri azaltılmış antagonistlerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Nevedomskaya ve ark., 2018).

En ölümcül hastalıklardan biri olan kanserin tedavisinde, ana ilaç kaynaklarından biri, önemli bir potansiyele sahip olan doğal bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkiler ve deniz ürünleri gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Bunlardan biri olan deniz yosunları, terpenoidler, alkaloidler, polifenoller, steroidler ve florotanenler gibi oldukça zengin farmakolojik aktivitelere sahip bileşikler içermektedir (Rocha ve ark., 2018).

Son yıllarda deniz yosunlarından elde edilen floroglusinol türevi bileşiklerin çeşitli kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkinliklerine yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Söz konusu çalışmalarda elde edilen olumlu bulgular, bu bileşiklerin önemini artırmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında floroglusinol'ün PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

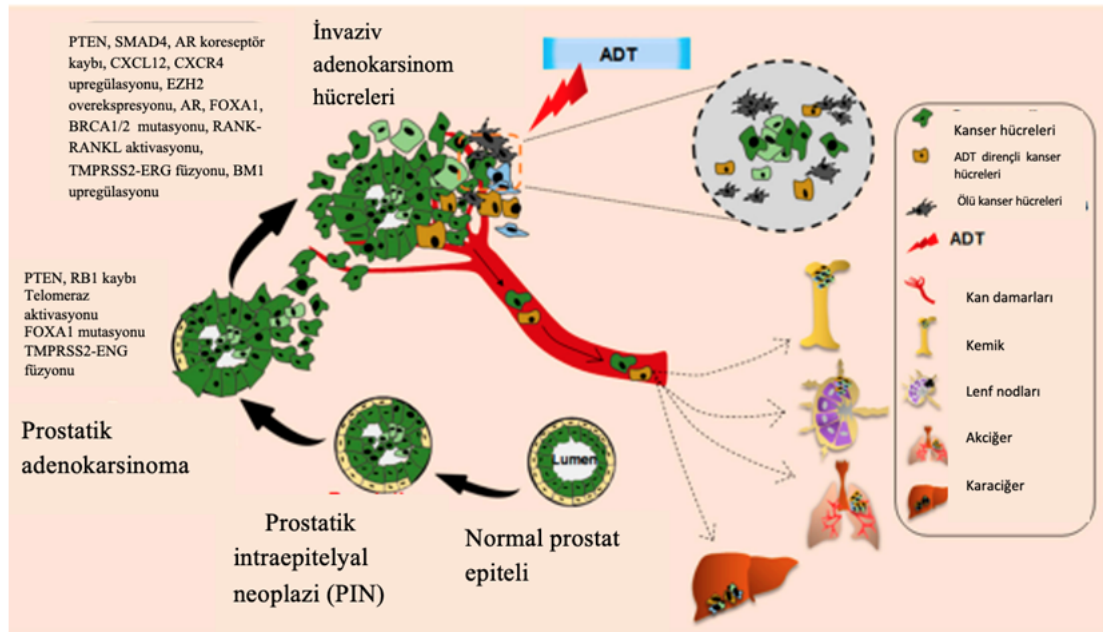
1.1. Prostat Kanseri

Dünya çapında bir sorun olan kanser, küresel sağlık krizi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Popülasyonlar yaşlandıkça, kanser oranlarında da artan bir insidans söz konusudur. 200 farklı kanser türü arasında prostat kanseri ve meme kanseri kendilerine özgü özellikleriyle ilk sıralarda gelen kanser türleridir. Prostat kanseri en sık teşhis edilen ikinci kanserdir ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerde beşinci sıradadır. (De Silva ve Alcorn, 2022). Cerrahi, kemoterapi, radyasyon ve androjen yoksunluğu terapisi gibi geleneksel tedavilere rağmen beş yıllık sağkalım oranının %30 civarı olduğu bildirilmiştir (Che ve ark., 2021).

Son 10 yıl içinde, insidansı artmış olan prostat kanserinin gelişiminde, etnik köken, prostat kanserine sahip aile öyküsü ve yaş en önemli risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Genetik yatkınlığın da prostat kanseri riskini artırdığına dair önemli kanıtlar vardır. Prostat kanseri tarama testleri geliştirilirken yaşanan en büyük zorluk, yavaş gelişen tümörler ve tedavi gerektiren agresif davranışlı tümörler arasında ayırım yapamamasıdır. Bu yüzden amaç tedavi edilebilir önemli kanserleri saptamak ve yavaş ilerleyen tümörlerde aşırı tedavinin ve gereksiz teşhislerin zararlarından kaçınmaktır. Prostat kanseri insidansı ve ölüm oranları etnik gruplar arasında farklılık göstermekte olup, Afrika kökenli erkekler en yüksek risk ve ölüm oranlarına sahipken, en düşük oranlar Asya kökenli erkeklerde görülmektedir (Bancroft ve ark., 2021).

1.1.1. Tanımı

Prostat kanseri, diğer kanser türlerinde olduğu gibi onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerde ve koruyucu genlerde inaktivasyon gelişimi, somatik, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi yoluyla oluşmaktadır. Çoğu prostat kanseri lezyonu prostat bezinin periferik bölgesinde meydana gelirken, iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) lezyonunun ise daha çok geçiş bölgelerinde meydana geldiği bildirilmiştir (De Marzo ve ark., 2007).



Şekil 1.1. İnsan prostat kanserinin gelişimi. Metastatik prostat kanseri, prostat intraepitelyal neoplazisinin (PIN) çeşitli moleküler değişikliklere uğraması ile invaziv adenokarsinom haline gelir. İnvaziv adenokarsinom hücreleri, androjen tedavisine başta olumlu terapötik yanıt verse de sonrasında tedaviye daha dirençli nüksetmesine neden olarak kemiğe, lenf düğümlerine, akciğere ve karaciğere metastaz yapar (Saranyutanon ve ark., 2020).

İnsan prostat tümör gelişiminin üç aşaması tanımlanmıştır. Bunlar intraepitelyal neoplazi, androjene bağımlı adenokarsinom ve androjenden bağımsız

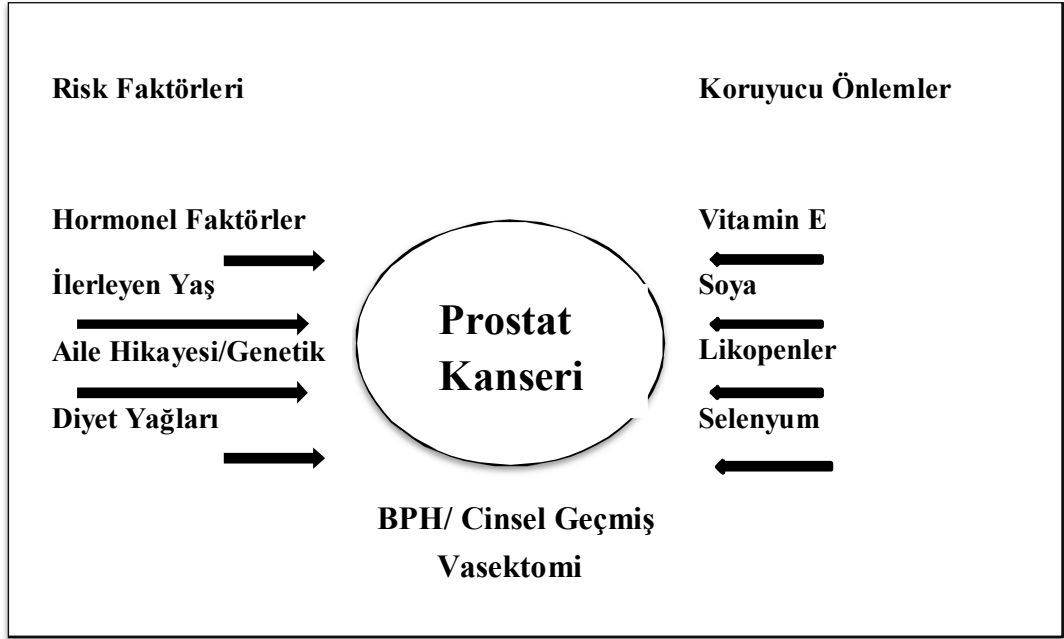
adenokarsinom veya kastrasyona dirençli prostat kanseri şeklindedir (Testa ve ark., 2019).

İnsan prostatı, sekretuar proteinlerin ve prostat spesifik antijenin eksprese edildiği luminal, androjen reseptörlerinin eksprese edildiği bazal ve endokrin belirteçlerin eksprese edildiği nöroendokrin olmak üzere 3 hücre tipinden meydana gelir. Prekanseroz evreyi içeren intraepitelyal neoplazi, luminal hücrelerde hiperplazi ve bazal hücrelerin aşamalı kaybı ile karakterize edilir. Androjen bağımlı adenokarsinom, latent ve klinik olmak üzere iki aşamalıdır ve tüm bazal hücrelerin kaybını içerir. Prostat kanseri progresyonu süresince luminal kısım genişleyip yayılırken, bazal hücreler yok olur (Testa ve ark., 2019).

1.1.2. Etiyolojisi

Prostat kanserinin gelişimindeki risk faktörleri ve nedenlerinin ortaya konmasını amaçlayan geniş spektrumlu çalışmalar bulunmaktadır. Prostat kanserinin başlamasına neden olan ajanlar tam olarak bilinmemekte olup, az sayıda risk faktörü tanımlanmıştır. Hormonlar tarihsel süreç içinde prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir.

Testosteron, 5-alfa redüktaz, seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG), östrojen gibi çeşitli hormonların prostat kanseri patogenezinde önemli rolü vardır. Hastalık ve beslenme arasındaki ilişki karmaşık olsa da, tüketilen yağ miktarı, tahıl alımı ve vitaminler gibi bazı bileşikler ile ilişkilidir. Prostat kanseri, insidans olarak batı popülasyonlarında daha yüksektir. Bazı araştırmalar prostat kanseri vakalarının etyolojisinde yaş ve genetik faktörlerin etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Grozescu ve Popa, 2017).



Şekil 1.2. Prostat kanseri için koruyucu tedbirler ve risk faktörleri (Gallagher ve Fleshner, 1998).

Heterojen bir hastalık olan prostat kanseri tanılarının yaklaşık %90'ı lokalizedir. Lokalize prostat kanseri davranış olarak oldukça değişkendir. Bazı hastalarda başlangıç tedavileri ile tedavi edilebilen güvenli bir seyir gösterirken, bazı hastalarda metastaz ve ölüme götüren agresif kanserler de vardır. Prostat kanserinin genomik olarak birçok alt kümesi mevcuttur. Prostat kanseri gelişiminde, SPOP, FOXA1, IDH1, TP53 ve PTEN genlerinde mutasyon ve gen füzyonlarının (ERG, ETV1/4, FLI1) sorumlu olduğu gösterilmiştir. Prostat kanserinde sık görülen farklılıklar, androjen ile düzenlenen promotörler ve transkripsiyon faktörleri ailesinden ERG, ETS ve diğer üyelerdeki füzyonlardır. TMPRSS2-ERG füzyonu, prostat kanserindeki en yaygın meydana gelen değişikliktir (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2015).

1.1.2.1. Prostat Kanseri ve Genetik

Prostat kanserinin nedenlerinin araştırılması için insan genomunda DNA belirteçleri kullanılarak genom taraması gerçekleştirilmiştir. Kromozomdaki 1, 4, 5, 7, 8, 11, 16 ve 19 bölgelerinin ve bireyleri prostat kanserine yatkın hale getiren genlerin, tümör agresifliğini ve tümör büyüme hızını etkilediği gösterilmiştir. Androjen uyarımı, prostat bezinin gelişimi ve bakımı için gereklidir. Bu nedenle, androjenlerin metabolizmasını ve sentezini etkileyen genler, tümöre eğilimli prostat kanseri riskinin yönetilmesini ve hastalığın daha agresif formda gelişmesini etkilemektedir. 17 β -hidroksiteroid dehidrojenaz (17 β -HSD) aktivitesi testesteron sentezi için gereklidir ve prostat hedef hücrelerde aktif seks steroidlerinin konsantrasyonunu düzenlemektedir. 17 β -HSD, testesteron ve 5 α -androstanedionun daha az aktif 17-keto metabolitlerine oksidatif inaktivasyonunda etkilidir. 17 β -HSD'da meydana gelen mutasyonlar ve polimorfizm, 17 β -HSD'yi inaktif hale getirir ya da aktivitesini önemli ölçüde azaltır. Böylece androjen seviyesini artırarak prostat içinde hiperplaziye ve sonuçta hücrelerin proliferasyonunu artırarak daha fazla kansere yol açar. Kalıtsal prostat kanseri genetiği tam olarak anlaşılamamıştır. Ailede prostat kanseri öyküsü, kalıtsal herediter mutasyonların tüm kanserlerin yaklaşık %9'unu oluşturduğu ve 55 yaşından genç erkeklerde vakaların %45'ini oluşturması ile hastalığın güçlü bir belirleyicisidir. 1q24-25, 1q42.2-43, 1p36, Xq11, Xq27-28, 20q13 ve 11p tanımlanan kromozomal bölgeleri kalıtsal hastalıkla ilişkilidir ve bu bölgelerde prostat kanserinin gelişiminde rol oynayan spesifik genler bulunduğu bilinmektedir (Zhang ve ark. 2003).

RNase L (HPC1, 1q22), MSR1 (8p), ELAC2/HPC2 (17p11) genleri prostat kanseri için biyobelirteç olarak kullanılan genlerdir. Bu genler, prostat kanserinde tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanır. Prostat kanseri, delesyonlar, nokta mutasyonları, yapısal yeniden düzenlemeler, polimorfizm gibi kromozomal sayıdaki genomik değişiklikleri içeren kompleks bir yapıya sahiptir (Wallis ve Nam, 2015).

1.1.2.2. Diyet

Diyet, obezite, sigara ve egzersiz gibi faktörlerin prostat kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Sigara içmek, birçok kanser türü için risk faktörüdür ve benzer şekilde prostat kanserinde de kanser kaynaklı ölüm riskinin önemli ölçüde artışı ile ilişkilidir. Obezite, hiperinsülinemiye ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) miktarının artmasına neden olarak birçok kanser türünün gelişimini desteklemektedir. Düşük yağlı diyetin, androjene duyarlı insan prostat adenokarsinomu hücre hattındaki (LNCaP) apoptozu indüklediği, proliferasyonu inhibe ettiği ve IGF-1 seviyelerini azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak düşük yağlı diyet ile beslenen farelerde serum prostat-spesifik antijen (PSA), serum insülin, tümör IGF-1 mRNA seviyelerinde azalma ve yavaş tümör büyüme hızı gösterilmiştir. Besinler, inflamasyon, antioksidan dengesi ve seks hormonlarının çalışmasını çeşitli mekanizmalarla etkilemektedir. Bitkisel yağlardan elde edilen doymamış yağ asitleri, steroid, testosteron ve androjen reseptör düzeylerinde azalma sağlayarak prostat kanseri riskini düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca, A, D ve E vitaminlerinin, androjen reseptörlerinde azalma, antiinflamatuvar, ve antioksidatif etki göstererek prostat kanseri riskini azalttığı da bildirilmiştir (Matsushita ve ark., 2020).

Kanser gelişiminin en önemli inhibitörlerinden biri kalori kısıtlamasıdır. Çalışmalar ülkeler arasında kişi başına düşen yağ tüketimi ile prostat kanseri ölüm oranlarında ilişki olduğunu göstermiştir. Selenyum, E vitamini ve likopen gibi antioksidanlar, prostat kanseri riskindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir. Süt ürünleri, soya, baklagiller, antikanserojenik özelliklere sahip birçok polifenolik bileşik içeren yeşil çay, prostat kanserinde araştırılan besinlerdir. Selenyum, E vitamini ve likopen ile ilgili kanıtlar, prostat kanserinde oksidan/antioksidan dengesinin çok önemli olduğunu göstermiştir. Fazla kalsiyum (>2,000 mg/day) tüketen erkeklerde daha az kalsiyum alan erkeklere göre prostat kanseri riski 4,6 kat artmıştır (Gann, 2002).

1.1.2.3. 5-alfa Redüktaz İnhibitörleri

5-alfa redüktaz enzimleri, dolaşımda androjen olarak en fazla bulunan testesteronu daha güçlü bir androjen olan dihidrotestesterona (DHT) dönüştürür. Androjenler, embriyogenez ve yetişkinlik sırasında cinsel özelliklerin gelişimi, prostat farklılaşması ve prostat kanseri gibi hastalıkların oluşumunda kilit role sahiptir. Hem testosteron, hem de DHT, androjen reseptörlerinin doğal ligandlarıdır. 5-alfa redüktaz enzimlerinden yoksun hayvan modellerinde ve 5-alfa redüktaz geninde mutasyon sonucu inaktif enzime sahip olan bireylerde erkek cinsel organların gelişiminin bozuk olması, erkek fizyolojisinde DHT seztezinin önemini vurgulamaktadır. 5-alfa redüktaz enzim izoformları ve DHT, prostat kanserinde yüksek seviyelerde bulunduğundan, hastalığın önlenmesi ve tedavisi için 5-alfa redüktaz izoenzimlerinin inhibisyonu hedeflenmektedir (Nacusi ve Tindall, 2011).

Prostat kanserinin yüksek sıklıkta görülmesi, uzun sürede ortaya çıkması, çok aşamalı patogenez ve tedavisinin ekonomik maliyeti nedeni ile kemoprevensiyon için ideal bir hedeftir. 5-alfa redüktaz inhibitörleri, prostat kanseri için kemopreventif ajanlar olarak önerilmektedir. Finasteroid ve dutasteroid, prostat kanseri tedavisinde 5-alfa redüktaz inhibitörleri olarak kullanılan ilaçlardır. Yaygın olarak kullanılan bu ilaçlar, testesteronun DHT'ye dönüşümünü inhibe ederek apoptozun uyarılmasına yol açmaktadır (Hu ve ark., 2020).

1.1.2.4. Enfeksiyon

Tüm kanserlerin en az %15-20'sinin etyolojik olarak viral, bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Kanser önemli bir küresel sorun olduğu düşünüldüğünde, bu durumun kanserin tedavisi ve önlenmesi için önem arz ettiği aşıkardır (Sfanos ve Isaacs, 2011).

Erişkinlerin prostat bezinde inflamasyonun çok yaygın olduğunu gösteren kanıtlar bulunmakta olup, bu kanıtlar, yetişkin erkeklerde prostatik inflamasyonun, prostat kanseri inflamasyonu ile aynı doğrultuda olduğunu göstermektedir. Enfeksiyonlar, hormonal değişiklikler, idrar reflüsü ve diyet gibi pek çok faktör prostat inflamasyonunun başlamasına neden olabilir (Sfanos ve De Marzo, 2012). Yüksek miktarda reaktif oksijen ve nitrojen türlerini içeren bir mikroçevrede, doku hasarının tekrarlanması ve rejenerasyon, kanserin gelişmesine ya da ilerlemesine neden olur. Biyopsi ile alınan prostat tümörlerinde hem akut, hem de kronik inflamasyona sıkça rastlanmıştır. İnflamatuvar hücreler tarafından ekspre edilen reaktif moleküller DNA ile etkileşime girerek delesyonlarla, yeniden düzenlemelerle ve mutasyonlarla kalıcı genomik değişikliklere neden olmaktadır (Davidsson ve ark., 2011).

Prostat kanserinin gelişiminde genetik faktörlerin etkisi kadar, prostat kanseri riskinin artışında çevresel faktörler de etkilidir. Bu çevresel maruziyetler enfeksiyona neden olmaktadır ve enfeksiyon kaynaklı inflamasyon da kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir. Prostat kanseri hastalarında enfeksiyona neden olabilecek ajanlar uzun yıllardır araştırılmaktadır. İnflamasyon uyarıcısı olarak doğrudan kabul edilen viral ya da bakteriyel bir mikroorganizma yoktur. Prostat kanserine katkıda bulunduğu düşünülen türler arasında Chlamydia trachomatis, Trichomonas vaginalis, Pseudomonas, Escherichia coli ve insan papilloma virüsü (HPV) vardır. Trichomonas vaginalis serostatus'un prostat kanseri riski ve yüksek dereceli hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sfanos ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalar ile HPV'nin yüksek kanser gelişim riskinde nedensel rollerinin olduğu kanıtlanmıştır. Genç kişilerde HPV genital enfeksiyonun en yüksek prevalansı görülürken, 55 yaş üstü kişilerde de artan bir prevalans vardır. HPV enfeksiyonlarının önlenmesi için çeşitli ve koruyucu özellikte aşılar mevcuttur. NF-kB olarak bilinen B hücrelerinin nükleer transkripsiyon faktörü, inflamasyon ile

kanseri ilişkilendiren mekanizmadır. NF-kB, birçok karsinojen tarafından aktive edilen bir proteindir. HPV'nin NF-kB'yi aktive ettiği gösterilmiştir.

Prostat kanserinin önlenmesi için erkeklerin HPV aşısı yaptırmaya teşvik edilmesi, ürogenital sistemi tehdit eden bakteriyel ve viral patojenleri tedavi etmek için etkili antibiyotik ve antiviral kullanımının yaygınlaştırılması gerekmektedir (Lawson ve Glenn, 2022).

1.1.3 Epidemiyolojisi

Prostat kanseri epidemiyolojisi, popülasyonlar arasında ve zaman içinde prostat kanseri insidansının ve mortalitesinin incelenerek bireysel risk faktörlerinin ve popülasyon tarama davranışları hakkında bakış açısı sağlamaktadır. Genel olarak gelişmiş ülkelerde yaygın rastlanan prostat kanseri, 2015 yılında erkeklerde en sık teşhis edilen kanser türüdür. Heterojen bir hastalık olan prostat kanseri bazı erkeklerde agresif ilerlerken birçoğunda yavaş büyüyen ve yavaş ilerleyen bir hastalık şeklidir. Yaş, prostat kanseri riski ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Prostat kanseri insidansı, 55 yaşından sonra güçlü bir şekilde artarken, 40 yaşın altındaki insanlarda nadir olarak görülür. Pozitif aile öyküsü olan erkeklerde, olmayanlara göre kıyaslandığında risk iki ya da üç kat artmaktadır. Ayrıca obezitenin ve daha uzun boylu olmanın prostat kanseri riskini ve mortaliteyi artırdığı belirlenmiştir (Pernar ve ark., 2018).

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen ikinci, dünya çapında ise en sık rastlanan beşinci ölüm nedenidir. Erken evrelerde semptom göstermeyebilen prostat kanseri, aktif gözetim gerektiren bir seyir gösterir. Afrikalı-Amerikalı erkeklerde beyaz erkeklere göre prostat kanseri görülme oranı daha yüksektir ve daha agresif bir prostat kanseri tipine sahiptirler. Prostat kanserinin nasıl önlenebileceğine dair henüz yeterli kanıtlar olmasa da sebze ve meyve tüketimini artırmak, yağlı yiyecekleri

sınırlandırmak ve daha fazla egzersiz yaparak riski azaltmanın mümkün olduğu bildirilmiştir (Rawla, 2019).

1.1.4. Prostat Kanseri Tedavisi

Erkeklerde en sık görülen kanserlerden biri olan prostat kanserinin tespit oranları dünya genelinde büyük farklılıklar göstermektedir. Prostat kanseri erkeklerde 50 yaşından sonra gelişme göstermektedir. Fakat hastaların birçoğu semptom göstermeden ve tedavi alamadan ölmektedir. Tedavi seçimi, hastalığın ilerleme aşamalarına, PSA düzeyine, Gleason skoruna bağlıdır. Prostat kanserinde, kemoterapi, hormonal tedavi, kriyocerrahi ve yüksek yoğunluklu odaklı ultrason (HiFu) tedavi stratejileri arasındadır. Tedavi yönetiminde bu tedavilerin bir kombinasyonunun kullanılması tavsiye edilir. Androjen yoksunluğu tedavisi (ADT), metastatik prostat kanseri için başlangıç tedavisi kabul edilen bir hormon tedavisidir. Androjenler aç prostat tümörlerinin yakıtı olarak kabul edilir. Testesteron ve bir varyantı olan DHT, androjen fonksiyonunun %90'ından fazlasını oluşturan androjenlerdir. Testesteron ve DHT, hücre çekirdeğinde etkili bir transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörüne bağlanır. Androjen reseptörünün, androjenler tarafından aktivasyonu, prostat büyümesini teşvik eder. ADT'nin temelinde androjen üretim yolundaki çeşitli hormonların, reseptörlerin ve enzimlerin inhibisyonu yer alır. Östrojenler, GnRH (Gonadotropin salgılatıcı hormon) agonisti, GnRH antagonisti, androjen reseptör blokerleri, 5-alfa redüktaz inhibitörleri, adrenal androjen inhibitörleri, ADT'de kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır (Chen ve Zhao, 2013).

Prostat kanserinin erken tanısında yaygın olarak kullanılan testlerden biri prostat spesifik antijen testidir. Serin proteaz aktivitesine sahip tek zincirli bir glikoprotein olan prostat spesifik antijen (PSA), prostat hücreleri tarafından salgılanır. Normal koşullar altında, PSA genel olarak prostat dokusunda yer alır ve serum düzeyi düşüktür. Kanserli hücreler, sağlıklı hücreleri yok ettiğinden dolayı

büyük miktarda PSA'nın kana karışmasına ve serum PSA'nın artmasına neden olur. Yüksek PSA düzeyi, klinik prostat kanseri olasılığını artırır. PSA zayıf bir özgüllük gösterdiğinden, yeni kanser-spesifik belirteçlerin araştırılmasına devam edilmektedir.

Prostat kanserinin tanı yöntemleri, DRE, manyetik rezonans spektroskopisi (MRS), pozitron emisyon tomografisi-CT (PET-CT), ve prostat biyopsisi şeklindedir. Prostat kanserinin çeşitli tedavi yöntemleri vardır ve lokalize prostat kanseri tedavisi, aktif gözetim, radyoterapi ve radikal prostatektomiye kapsar. Radikal prostatektomi, açık veya robot yardımlı tümörü tamamen çıkarmayı amaçlar. Eksternal ışın radyoterapisi (EBRT), prostat kanseri için en önemli tedavilerden biridir. Radyoterapinin avantajlarından biri ise komplikasyonların az ve etkili olmasıdır (National Health Commission of the People's Republic of China. National guidelines for diagnosis and treatment of prostate cancer 2022 in China. 2022).

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri olan kemoterapide dosetaksel, kapaksitaksel, mitoksatron gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Taksanlar, hücre bölünmesinde, mitoz ve interfaz aşamasında mikrotübülleri hedefleyerek mitotik iğ ipliklerinin stabilizasyonunu sağlamakta ve mitoz hücre bölünmesini durdurup hücre ölümüne yol açmaktadır. Kabaksitaksel de benzer bir etki mekanizması uygulayarak kemoterapi öncesinde antitümör aktiviteye sahip ve doksataksele dirençli kanserlerde direncin üstesinden gelmek için seçilmiştir. Kabazitaksel, prednizon ile kombine edildiğinde etkinlik aktivitesi ve sağ kalım oranı artmaktadır. Uygulanan tedaviler hayatta kalmaya bir dereceye kadar yarar sağlasa da, semptom kontrolünün öneminin hatırlanması hayatidir. Malesef tedavilerdeki son gelişmelere ve çok sayıda tedavi stratejisi olmasına rağmen, bu ajanların tümü nispeten küçük sağkalım faydaları sağlamaktadır (Sumanasuriya ve De Bono, 2018).

Androjene dirençli ve metastatik prostat kanserinin tedavisi oldukça zordur. Bunun yanında konvansiyonel radyasyon ve kemoterapiler aşırı pahalıdır ve ciddi yan etkileri vardır. Bu yüzden geleneksel tıpta kullanılan bitki özleri ve

fitokimyasallar iyileştirici özellikleri ve güvenli olmaları ile dikkat çekmektedir. Hindistan ve Çin’de kullanılan bitkilerin özü, hücre ve hayvan deneylerinde kullanılmış ve prostat kanserine karşı toksisite göstererek umut vaad etmiştir. Baicalein, kurkumin, apigenin, genistein, ellajik asit, likopen ve piperin prostat kanserine karşı terapötik etki gösteren fitokimyasallardır. Yeşil çaydan elde edilen bir polifenolik olan epigallocateşin-3-gallat’ın, adrojen reseptörünü ve IGF-1’i baskılayarak prostat kanserini gerilettiği bildirilmiştir (Ghosh ve ark., 2021).

Mevcut tedavilerin olumsuz etkilerini azaltmak için yeni yaklaşımlar üzerinde de araştırmalar yapılmaktadır. Lokalize prostat kanserlerinde hasta uzun süre sağ kalmasına rağmen, metastatik prostat kanserinde yoğun çok yönlü tedavilerden sonra bile hastalık büyük ölçüde tedavi edilememektedir (Wang ve ark., 2018).

1.2. Apoptoz

1.2.1. Tanımı

Apoptoz dokulardaki hücre popülasyonlarında homeostatik dengenin korunması için gelişme ve yaşlanma boyunca meydana gelen programlı hücre ölümüdür (Sperandio ve ark., 2000.). Apoptoz, hücre bir hastalık sonucu zarar gördüğünde ya da sağlığa zararlı bir kimyasal maddeye maruz kaldığı zaman bir koruma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır (Norbury ve Hickson, 2001).

Kanserli hücrelerde, kemoterapi sırasında kullanılan ışınlar ve ilaçlar sonucu oluşan DNA hasarları, p53 bağımlı yolak ile apoptotik ölüme yol açmaktadır. Kortikosteroid gibi bazı hormonlarda apoptoza neden olmaktadır (Hirsch ve ark., 1997). Radyasyon, ısı, hipoksi, sitotoksik kanser ilaçları hormonlar, Fas ve TNF

reseptörlerinin uyarılması apoptozu başlatan etmenlerdir. Apoptozun ekstansif yolu, TNF ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır.

Apoptoz, büyüme faktörleri, hormonlar, tümör baskılayıcı genler ve genetik olarak kontrol edilen, programlı, enerjiye bağımlı, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Apoptotik hücreler, protein bölünmesi, protein çapraz bağlanması, DNA parçalanması, apoptotik cisimlerin oluşumu gibi çeşitli biyokimyasal özellikler gösterirler (Susan, 2007).

Proteolitik aktiviteye sahip kaspazlar, inaktif olarak sentezlenir ve proteinleri aspartik asit kalıntılarından keserler. Hücrede inaktif olarak bulunan bir kaspaz aktive olduğunda diğer kaspazları da aktive ederek apoptoz sinyal yolağını güçlendirerek hücre ölümlerinin daha hızlı gerçekleşmesini sağlar. On önemli kaspaz tanımlanmıştır ve bunlar başlatıcı (kaspaz -2,-8,-9,-10), efektör (kaspaz -3,-6,-7) ve inflamator kaspaz (kaspaz -1,-4,-5) olarak sınıflandırılmıştır (Cohen, 1997). Diğer bir kimyasal özellik, hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonu sayesinde komşu hücreler tarafından apoptotik hücrelerin fagositik olarak tanınmaları ve hızlı şekilde fagositoza uğramalarını sağlar (Bratton ve ark., 1997).

Hücre zarında bulunan fosfotidilserini hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olarak makrofajlar tarafından tanınır. Apoptoz sırasında Annexin I ve calreticulin gibi başka proteinlerde hücre yüzeyinde açığa çıkar. Rekombinant fosfotidilserin-bağlayıcı protein olan Anneksin V, fosfotidilserin kalıntıları ile güçlü ve spesifik bir şekilde etkileşime girerek apoptozun saptanmasında kullanılır (Arur ve ark., 2003).

Calreticulin, yutan hücrelerde bulunan LDL reseptörlerine bağlanabilen ve tanınma sinyalleri olan fosfotidilserinler ile işbirliği yapabilen proteinlerdir (Gardai

ve ark., 2005). Glikoproteinler ve thrombospondin-1, mikrovasküler endotel hücrelerinin dış yüzeyinde ekspire edilerek CD36, kaspaz-3 gibi proteazlar ve diğer proteinler ile birlikte reseptör aracılı apoptozu indükler (Jimenez ve ark., 2000).

Fizyolojik ve morfolojik bir olay olan apoptoz ile hücrede DNA'nın parçalanması, hücre boyutunda azalma ve kromatinlerin yoğunlaşmayla beraber çekirdek zarının yok olması gibi mikroskop altında gözlemlenebilen birçok biyokimyasal olay gerçekleşir. Apoptoz sırasında zar asimetrisi kaybolur ve hücre zarında normalde dışardan görünmeyen N-asetil glikozamin gibi maddeler açığa çıkar. Bu değişiklikler hücrenin fagositik hücreler tarafından tanınmasını sağlayarak apoptozu uğrayan hücrenin hızlı bir şekilde ortadan kaldırılmasını gerçekleştirir. Gerçekleşen bu biyokimyasal olaylar apoptozun belirlenmesinde rol oynayan unsurlardır. Hemotoksilen-eozin boyama, giemsa boyama, floresan mikroskopi, faz kontrast mikroskopi, Annexin V yöntemi ve tunel yöntemi apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler arasındadır (Özay ve Ülker, 2008).

1.2.2. Apoptozun Mekanizması

Apoptoz mekanizmasının anlaşılması hem birçok hastalığın kaynağının anlaşılması hem de apoptotik yolağı hedefleyen ilaçların geliştirilmesi için önemlidir. Kompleks bir mekanizma olan apoptoz, metabolik stres ile tetiklenen mitokondriye bağlı intrinsik yolak ve ölüm ligandları gibi dış uyaranlar tarafından tetiklenen ekstrinsik yolak ile gerçekleştirilmektedir. Kaspazlar apoptoz mekanizmalarının merkezinde yer almakta ve farklı şekillerde aktive olabilmektedir (Wong, 2011).

Kaspazlar, hücre ölümlerinde doğrudan rol oynayan, aktif hale geldiğinde apoptozun başlatılmasını sağlayan sistein proteaz grubuna dahil olan enzimlerdir. Kaspazlar dışında intrinsik ve ekstrinsik yolaklar ile gerçekleşen apoptozu yöneten çok

çeşitli proteinlerde bulunmaktadır. Bunlar DD (Death domain), DED (Death Effector Domain) ve CARD (Caspase Recruitment Domain) proteinleridir (Reed, 2000).

1.2.2.1. Ekstrinsik Yolak

Apoptozun ekstrinsik yolağı TNF (tumor necrosis factor), FAS-L (Fas ligand) ve TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) gibi ligandların hücre yüzeyinde bulunan TNFR1, Fas (CD95 /Apo1), ve TRAIL reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılmaktadır (Jan ve Chaudhry, 2019). Bu sinyal yolağında yaygın olarak sınıflandırılmış reseptör-ligand bağlanmaları TNFR1-TNF α , FAS (CD95, APO-1)-FasL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL, TRAILR2 (DR5)- TRAIL şeklindedir (Pistritto ve ark., 2016).

Ölüm ligandlarının kendilerine özgü reseptörlere bağlanması ile adaptör proteinleri oluşur. Fas ile ilişkili death domain (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili death domain (TRADD) adaptör proteinleri, başlatıcı kaspazlar olan prokaspaz 8 ve 10 ile bağlandığı zaman ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Aktifleşen kaspaz 8, efektör kaspaz 3,6 ve 7 yi de aktifleştirir. Bu kaspazlar çekirdek proteinlerinin parçalanmasını sağlayarak apoptozu başlatır. (O'Brien ve Kirby, 2008).

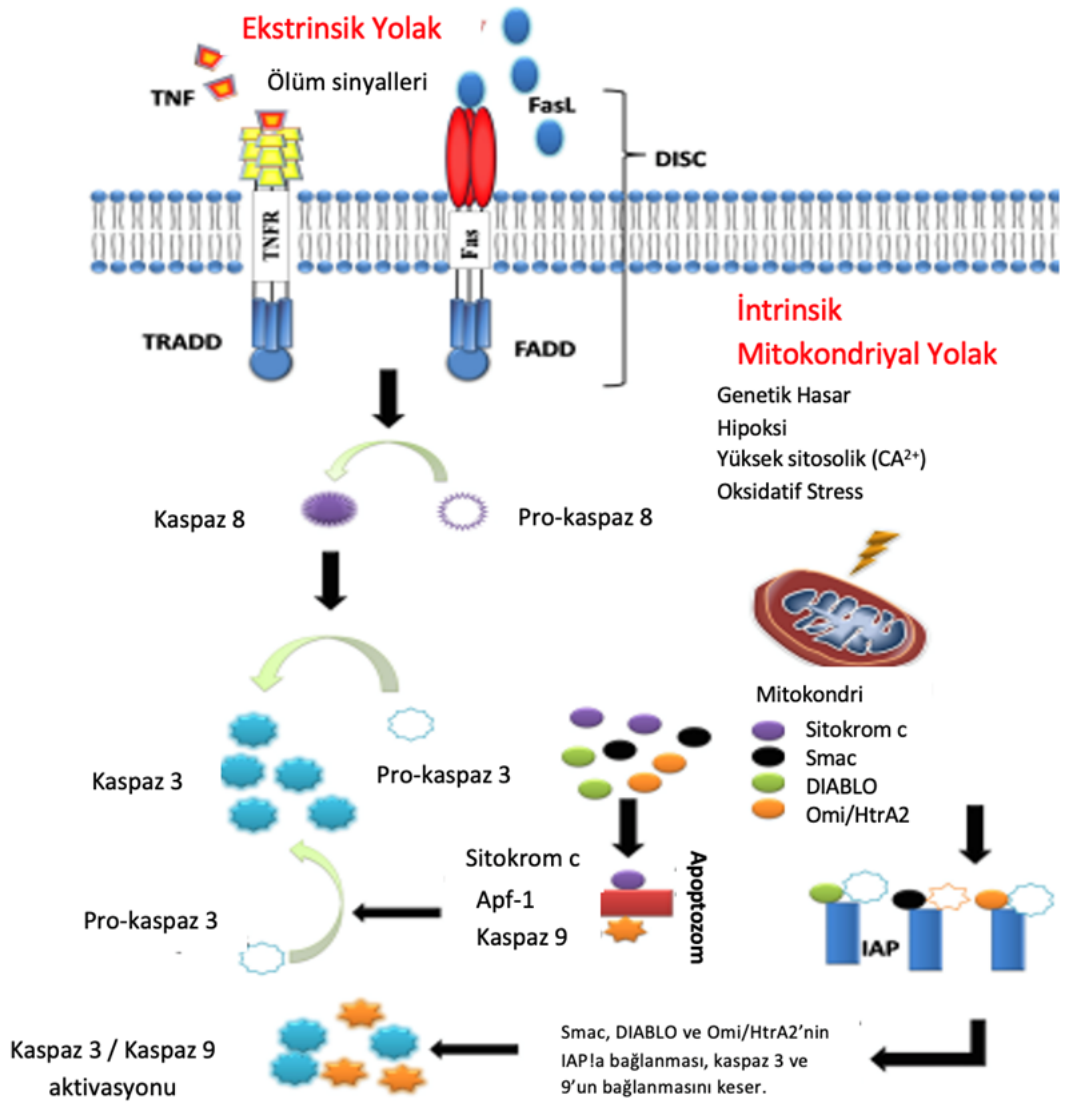
1.2.2.2. İntrinsik Yolak

İntrinsik apoptoz yolağı, iyonize radyasyon sonucu DNA' nın zarar görmesi, hücre organellerinin hasara uğraması, endoplazmik retikulum stresi, mitokondrial hasar, hücre içi sinyal yolağının inhibiasyonu, onkojenlere bağlı hücre ölümü, aşırı

mitojen uyarımı, büyüme faktörü gibi uyarıcıların eksikliği gibi nedenlerden dolayı aktive olmaktadır. Bu uyarılar intrinsik yolağın düzenlenmesindeki en önemli proteinler olan ve çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenen Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonunun düzenlenmesini sağlar. Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon seviyesi, hücre ve doku tipine, gelişim evresine, organizmanın yaşına ve stres ve alınan hasara bağlı olarak değişmekte olup etkileşimleri hücrenin apoptoza girip girmeyeceğini belirler (Singh ve ark., 2019).

Bcl-2 ailesi proteinleri arasındaki etkileşimler mitokondrial dış membran geçirgenliğini (MOMP) düzenleyerek hücre ölümünü kontrol etmektedir. Bcl-2 ailesi proteinleri proapoptotik ve antiapoptotik özellik gösterirler. Proapoptotik özellikli BAX, BAK, BOK, BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA proteinleri sitozolde yer almaktadır. Bu proteinler sitokrom - c salınımını artırarak apoptozu indükler. Sitokrom – c’ nin salınması hücreyi parçalama işlevi gören bir kaspaz kaskadının aktivasyonuna neden olur. Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri ise, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, Bfl-1/A1 proteinleridir. Aktivatör BH-3 proteinlerin (BID, BIM) membrana bağlanması por oluşumunu artırır (Kale ve ark., 2018).

Mitokondri oksidatif fosforilasyon mekanizması ile hücrenin metabolik ihtiyacının karşılanması açısından temelorganellerdendir. Mitokondri, sitokrom-c gibi membranlar arası proteinlerin salınımını ve sitozolde kaspaz aktivasyonunu destekleyerek apoptoza katılmaktadır. BH3 proteinleri, alınan ölüm sinyallerini Bcl-2 ailesi üyelerine ileterek Bax ve Bak’ ın aktifleşmesini sağlar (Martinou ve Youle, 2011).



Şekil 1.3. Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları. Apoptoz birçok yolak içeren kompleks bir mekanizmadır. Apoptozun herhangi bir noktasında meydana gelen bozukluklar tümör metastazlarına ve antikanser ilaçlara dirençli kanser hücrelerinin oluşmasına neden olurlar. (Wong, 2011).

Bax ve Bak proteinleri mitokondriyal dış membranda bulunan voltaja bağlı anyon kanalı ile etkileşime girerek bu bölgeye yerleşir (Mark ve Grant, 2015). Bax ve Bak proteinleri ile por oluşumu sağlandıktan sonra sitokrom-c, SMAC ve Diabolo gibi proteinler mitokondriden sitozole salınır. Sitokrom c, sitozole salındıktan sonra APAF-1'e bağlanarak apoptozom denilen yapıyı oluşturmakta böylece kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlayarak apoptozu gerçekleştirmektedir. Antiapoptotik Bcl-2 ailesi

üyeleri ise Bax ve Bak proteinlerine bağlanarak apoptoz inhibitörü görevi görür (Suen ve ark., 2008).

1.3. Floroglusinol

Floroglusinol (1,3,5-trihidroksibenzen; PG) geniş çapta araştırılan, simetrik, küçük bir molekül olup, farmasötikler, boyalar ve patlatıcılar gibi çeşitli endüstrilerdeki ürünlerin üretimi için öncü bileşik olarak kullanılmaktadır Çok çeşitli türevlerin ana maddesi olan floroglusinol, çeşitli bitki ve alglerde bulunur. Antibakteriyel, antioksidan, antidepresan, dezenfektan ve farmakolojik olarak geniş bir aktivite spektrumu gösterir (Braun ve ark., 2012). Floroglusinol, çoğunlukla, bir kahverengi alg türü olan *Ecklonia cava*'dan izole edilerek kullanılmaktadır (Park ve ark., 2011).

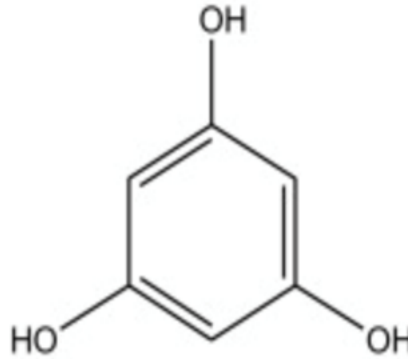
Yenilebilir bir kahverengi alg türü olan *E. Cava*, Kore ve Japonya kıyılarında bulunur. *E. Cava*'nın özütü, floroglusinol, ekol, diekol, trifloreto A ve ekstolonol gibi birçok florotanen içermektedir. Floroglusinol, polifenol olarak bilinen bir grup organik bileşiğin üyesidir (Yoon ve ark., 2017).

1.3.1. Floroglusinol'ün Yapısı

Ekolojik ve ekonomik öneme sahip olan floroglusinol, deniz organizmaları ve mikroorganizmalar gibi farklı doğal kaynaklarda yaygın olarak bulunan özelleşmiş metabolitlerdir (60). Floroglusinol türevleri, ikincil metabolitlerin başlıca sınıfıdır. Myrtaceae familyası, Guttiferae, Euphorbiaceae, Aspidiaceae, Compositae, Rutaceae, Rosaceae, Clusiaceae, Lauraceae, Crassulaceae, Cannabiaceae ve

Fagaceae gibi çeşitli familyalarda yaygın olarak bulunur. Floroglusinol bileşikleri; monomerik, dimerik, trimerik ve daha yüksek floroglusinoller ve florotaninler olarak sınıflandırılabilir. (Singh ve ark., 2019).

Yaklaşık olarak 15 halojenli floroglusinol bileşiği doğal kaynaklardan tanımlanmış olup, çoğunlukla klor ve brom içermektedir. Prenile edilmiş floroglusinoller, mono-, di-, ve poli-, prenil/geranile floroglusinoller içerir. Bitki kaynaklarından 50'den fazla prenil ve geranile floroglusinol rapor edilmiştir. Dimerik floroglusinoller, bir metilen grubu ya da bir kroman halkası birbirine bağlı iki floroglusinol birimine sahiptir. Birçok dimerik ve daha yüksek floroglusinol bileşiği başarıyla izole edilip sentezlendiğinden bu sınıf üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Trimerik ve tetramerik floroglusinollerin sentezinde, dimerik bileşiklerin sentezinde kullanılan benzer yaklaşımlar kullanılmıştır. Florotaninler, floroglusinol arasında en yüksek moleküler ağırlığa sahiptir (Singh ve ark., 2019).



Şekil 1.4. Floroglucinol'ün yapısı (Kim ve ark., 2015).

Bugüne kadar binden fazla floroglusinol türevi bileşik izole edilmiştir. Sadece Hypericum cinsinden 429 floroglusinol türevi tanımlanmıştır. Bitkilerde ve alglerde bulunan floroglusinol türevleri daha kompleks ve karmaşık bir yapıya sahiptir (Biessy ve Fillion, 2021).

1.3.2. Floroglusinol'ün Etkisi

Floroglusinol gösterdiği yararlı çeşitli biyolojik aktivitelerden dolayı bazı insan hastalıklarını tedavi etmek ve önlemek amacıyla kullanılan polifenolik bir bileşiktir. Doğal biyoaktif bir madde olan floroglusinol'ün apoptozu inhibe ederek ve hücreleri oksidatif strese karşı koruyarak farmakolojik aktiviteleri indüklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Floroglusinol, FAS, FADD, AIF ve PARP gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu artırarak FAS sinyal yolu ile apoptozu indüklemektedir. Floroglusinol ile indüklenen apoptozda, intrinsik yolda mitokondriden sitozole geçen sitokrom c'nin ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) salınımını artırdığı bildirilmiştir (Kang ve ark., 2014).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), hücre büyümesini destekleyen, kanser hücrelerinin hayatta kalmasında önemli bir role sahip olan bir bileşiktir. Yapılan bir araştırmada, floroglusinolün, IGF-1R proteinlerinin ekspresyonunu, IGF-1 sinyal yolağındaki molekülleri ve Ras/ERK-MAPK büyüme sinyal yollarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Kang ve ark., 2014).

Kwon ve meslektaşları, floroglusinol'ün tümör anjiyogenezini inhibe etme potansiyeli üzerine çalışma yürüten ilk kişilerdi. Floroglusinol, Lewis akciğer karsinomu (LLC)-tümör taşıyan fare hücreleri üzerinde, hücre toksisitesini etkilemeden fare modelinde endotelial büyüme faktörüne (VEGF) bağlı olan endotelial progenitor hücrelerin işlemleri ve kılcal benzeri tüp oluşumunu inhibe ederek anjiyogenez ve tümör büyümesini baskıladı. Anjiyogenez, tümör gelişimi sırasında yeni kan damarlarının üretilmesini ve kanser hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalması için gerekli olan besin ve oksijeni sağlar. Bu yüzden veriler tümör anjiyogenezinin inhibisyonunun tümör büyümesini azaltabileceğini belirtir. Floroglusinol ile tedavi edilen farelerde kılcal mikrodamarların sayısında önemli bir azalma gözlemlendi (Kang ve ark., 2014).

Floroglusinol'ün tümör anjiyogenezi üzerindeki etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Bunun için bir endotelyal progenitör hücre (EPC) inhibitörü olan floroglusinol'ün potansiyel etkisini araştırmak için, insan göbek kordonu kanından (HUCB) izole edilen CD34⁺ hücreleri kullanılarak deneyler gerçekleştirildi. Endotelyal progenitör hücreler (EPC), anjiyogenez ile yakından ilişkilidir ve tümörlerin erken safhada büyümesini hızlandırır. Floroglusinol ile muamele edilen hücrelerde, CD34⁺/CD133⁺, CD34⁺/CD31⁺ ve CD34⁺/CXCR4⁺ içeren EPC yüzey belirteçlerinde azalma sağlayarak apoptoz yoluyla hücre ölümünü indükledi. Bu da floroglusinol'ün tümör anjiyogenezi hedefleyen antitümör ilaçların geliştirilmesinde bir EPC inhibitörü olarak kullanılmasında umut vaad etmektedir (Kwon ve ark., 2012).

Floroglusinol'ün, nitrik oksit (NO), süperoksit anyonları ve hidroksil radikallerine karşı güçlü radikal temizleme etkisi ile oksidatif strese ve strese bağlı erken yaşlanmaya (SIPS) karşı koruyucu rolü olduğu gösterildi. Fazla miktarda ROS ve RNS üretimi, hücrel lipitlere, proteinlere, membran hasarına ve DNA'ya zarar vererek hücrenin normal işleyişini bozar. Oksidatif stres ve nitrozatif stres kanser başta olmak üzere yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar ve nörolojik bozukluklar gibi bir dizi hastalığa yol açar. Bu nedenle oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavisi için radikal hasarını önleyen antioksidanlar ve güvenli terapatik ajanlar daha fazla öneme sahip olmuştur. Floroglusinol'ün hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazı regüle eder ve hücrel katalaz aktivitesini artırarak Çin hamsteri akciğer fibroblast (V79-4) hücrelerini oksidatif hasara karşı korur. Buna ek olarak, floroglusinol ve floroglusinol türevi maddeler antioksidan enzim mekanizmasını arttırır ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar (Kwon ve ark., 2012).

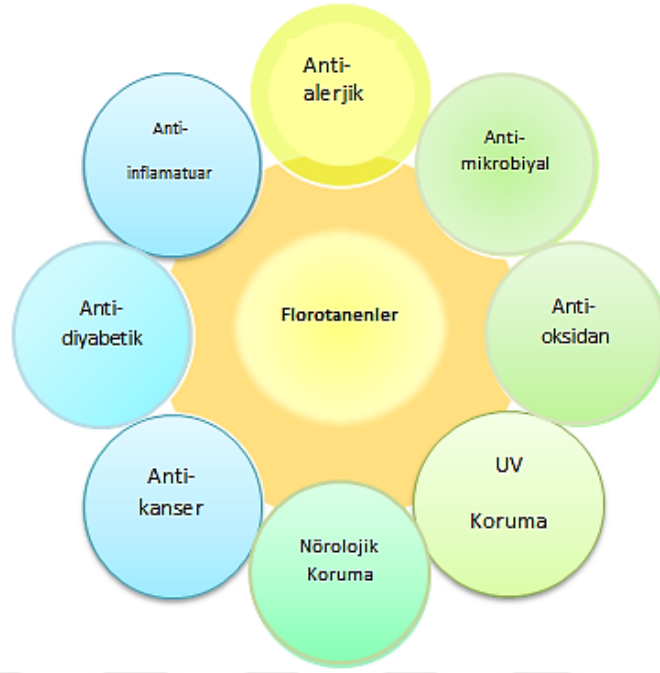
Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), batı tarzı diyet ile beslenen toplumlarda en sık rastlanan hastalıklardan biridir ve tedavi edilmezse tip 2 diyabete ve hepatoselüler karsinoma (HCC) yol açabilir. Floroglusinolün, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığının (NAFLD) neden olduğu oksidatif dengedeki değişikliklere

tepkilerini değerlendirmek için HepG2 hücreleri ile çalışıldı. Floroglusinol, palmitat ve hidrojen peroksitten kaynaklanan oksidatif stres modellerinde antioksidan seviyesini artırdı. Floroglusinol diğer antioksidanlara benzer şekilde indirgenmiş ve oksitlenmiş glutatyon seviyesini normalleştirdi ve glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırdı. (So ve Cho, 2014).

1.4. Florotanenler

Florotanenler, proteinler ve polisakkaritler gibi biyolojik makromoleküllere bağlanma afinitesine sahip, suda zneabilen ve yüksek oranda hidroksil grubu içeren tanenlere benzer fenolik bir bileşik sınıfıdır. Kahverengi makroalgler tarafından sentezlenir ve hem birincil hem ikincil metabolitler olarak kabul edilirler. Florotanenler en çok çalışılan fenolik bileşiklerden biridir ve UVB gama ve radyasyonun neden olduğu cilt kanserlerine karşı koruyucudur (Kim ve ark., 2015).

Florotanenler floroglusinol ünitelerinin polimerizasyonu ile oluşan polifenolik bileşiklerdir. Kahverengi deniz yosunlarından elde edilen florotanenler, antikanser, antioksidan, anti-inflamatuvar, antidiyabetik, nöroprotektif olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler. Gösterdikleri bu çeşitli biyolojik aktiviteler nedeni ile yeni ürünlerin geliştirilmesi açısından nc olmuşlardır (Matulja ve ark., 2022). Florotanenler, algler tarafından zorlu su koşulları altında yaşamda kalabilmek için savunma mekanizması olarak üretilen sekonder metabolitlerdir ve yaklaşık olarak alglerin kuru ağırlıklarının %5-12'sini oluştururlar. Florotanenlerin in vitro deneylerde, insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) zerindeki antikanser aktiviteleri ile ilgili yapılan bir araştırmada apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Negara ve ark., 2021).



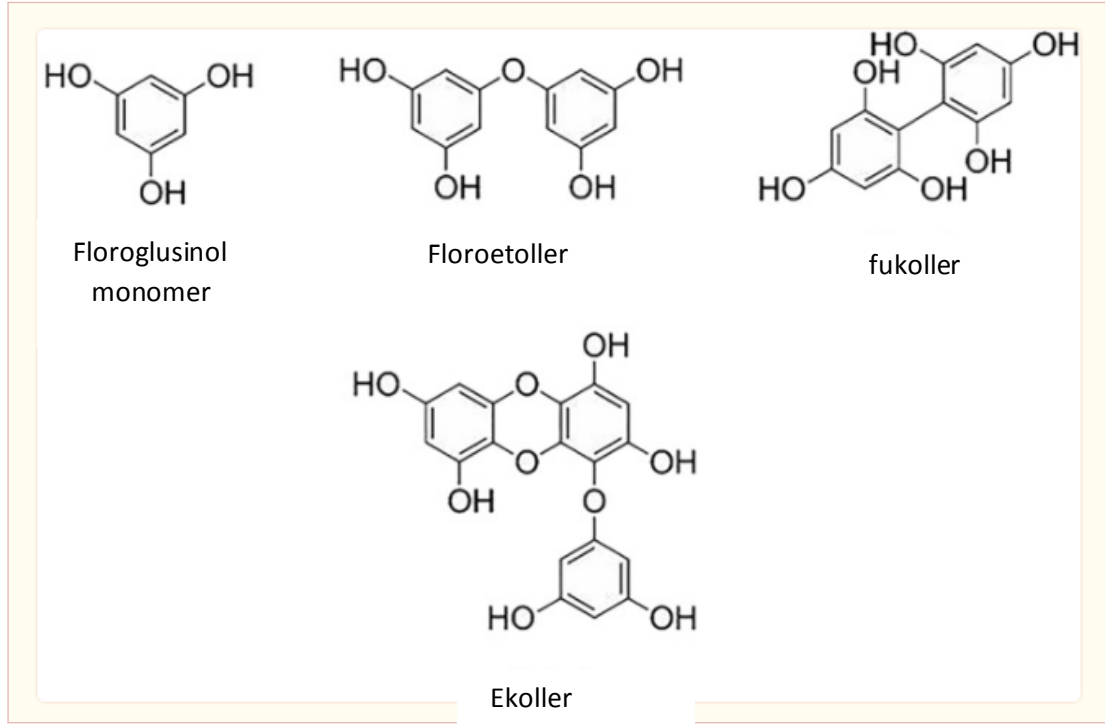
Şekil 1.5. Florotanenlerin biyokimyasal özellikleri (Lekshmi ve ark., 2022).

Florotanen bileşikleri kromatografik teknikler kullanılarak geleneksel organik çözücü izolasyonu ile saflaştırılmaktadır. Genel olarak deniz yosunlarından, özellikle kahverengi alglerden üretilmektedir. Florotanenlerin, SARS-CoV 3CL inhibisyonu, anti-HIV, melanin sentezine karşı inhibitör etki, osteogenez, nöraminidaz inhibitör aktivite, anti-Alzheimer, glikosidaz inhibisyonu ve yüksek glikoz kaynaklı stres inhibisyonu gibi diğer biyolojik aktiviteleri de vardır (Lekshmi ve ark., 2022).

1.4.1 Florotanenlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Florotanenler, monomer floroglusinollerin (1,3,5-hidroksibenzen) temel olarak aril-aril C-C bağları veya aril-eter C-O bağları ile bağlanmasıyla oluşan polimerik yapılardır. Florotanenler, aromatik gruplar arasında bulunan bağların tipine göre adlandırılmaktadır. Florotanenler, yapılarında çok miktarda fenolik -OH grubu

içerdiklerinden dolayı hidrofilik özellik gösterirler ve biyolojik sistemler tarafından kolayca absorbe edilirler (Venkatesana ve ark., 2019).



Şekil 1.6. Florotanenin yapısı (Ford ve ark., 2019).

Florotanenlerde en yaygın görülen modifikasyonlar asetilasyon, hidroksilasyon ve oksidasyondur (Birkemeyer ve ark., 2020.). Florotanenin sınıflandırmaları bileşilerin polimerizasyonuna göre şekillenmektedir ve artan polimerizasyon floratanenlerin yapısal çeşitliliğini de artırmaktadır (Arnold ve Targett, 1998).

Florotanenler, eter (fuhaloller ve floretoller), fenil (fukoller), hem eter hem fenil (fukofloretoller) ve dibenzodioksin bağına sahip olanlar olmak üzere yapısal olarak göre dört gruba ayrılmaktadır (Negara ve ark., 2021).

1.4.2. Florotanenin Etkisi

Florotaneninler, kanser patogeneğinde merkezi yönler olan tümör oluşumu, inflamasyon ve oksidatif stres gibi biyokimyasal mekanizmalara müdahale eder. Kanser gelişiminin mekanizmalarına doğrudan ve dolaylı olarak etki etmesi bu bileşikler yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için çekici kılmaktadır. Fenolik bileşiklerin önemli bir grubu olan florotaneninler, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe etme yeteneği ile iltihap içeren kanserler için umut vericidir. (Catarino ve ark., 2021).

Hücre içi ya da hücre duvarında bulunan florotaneninlerin antibiyotik etkileri nedeni ile enfeksiyona, radyasyona, oksidatif strese karşı koruyucu ve yara iyileşmesine katkı sağlama gibi fizyolojik işlevleri olduğu bildirilmiştir (Birkemeyer ve ark., 2020.). Kahverengi alglerden üretilen floroglusinol bazlı florotaneninler sahip oldukları biyoaktif özellikleri ile farklı kanser türlerine karşı kanıtlanan antitümör etkileri sayesinde son yıllarda sıklıkla kullanıldı. Floroglusinol, ekol, diekol ve ekstolonol gibi bileşiklerin, apoptoz protein inhibitörü (XIAP) gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu inhibe ederken pro-apoptotik bileşikler olan kaspaz-3,-7,-8 ve -9, sitokrom c, Bid, Bim, Bak, Bax, ve p53 gibi proteinlerin ekspresyonunu sıklıkla uyarma yetenekleri rapor edilmiştir. Florotaninden zengin özütün (EtOAc) ve diğer florotaninle saflaştırılmış fraksiyonlar (F9), tümör hücre hatları olan Caco-2, MKN-28 ve HT-29 üzerine uygulanarak canlılık üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan deneyler EtOAc, F1 ve F5'in normal hücrelerin canlılığını etkilemeden tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler sergilediğini ve hücre proliferasyonunu azalttığını göstermektedir. Bu bileşikler tümör hücre hatlarını G0/G1 ve G2/M fazlarına hücre döngülerini durdurarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Catarino ve ark., 2021).

Florotanenin antikanser etki mekanizmaları hücre ölümünü başlatan ve kanser gelişimi ile bağlantılı çeşitli yolları içermektedir. Florotanenin, sitotoksik T-lenfositleri, dendritik hücreler, epitel-mezenkimal geçiş sürecini, fagosit salınımını artırma ve SLUG ve VEGF ekspresyonunu azaltma gibi yöntemlerle kanseri önler. Florotanenin apoptoz antijen 1(APO-1), Bcl-2 proteinleri, kaspaz-3,-7,-9 ve sistein aspartat spesifik proteinaz (kaspaz) ekspresyonunu artırarak apoptozun indüklenmesini düzenlemektedir. *E. cava*'dan ekstrakte edilen dieckol'ün, A2780 ve SKOV3 yumurtalık kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisi olduğu ayrıca MCF-7 kanser hücrelerinde çoğalmayı inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Khan ve ark., 2022)

Yapılan bir çalışmada *A. nodosum*'dan saflaştırılan floratanin ekstratının 33 µg/mL IC50 değerlerinde kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (Nwosu ve ark., 2011).

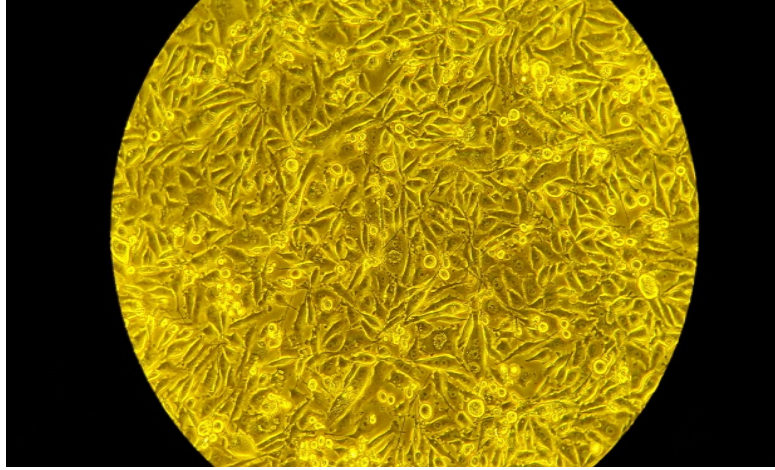
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Gereçler

İnsan prostat kanseri hücreleri (PC3), ATCC (USA), Tripsin/EDTA Solüsyonu Lonza (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Canlı hücre sayımında Bio-Rad cihazı (USA) kullanılmıştır. Hücrelerin inkübasyonu için etüv (Thermo Scientific, USA) kullanılmıştır. Annexin V Assay kiti ve Muse Cell cycle kit ile Muse Cell Analyser cihazı Milipore (Almanya), apoptoz çalışmaları için kullanılmıştır.

2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

İnsan prostat kanseri hücre hattı (PC3), tek bir kriyotüp içinde kriyoprezerve halde temin edildi ve hücre hatları, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) içerisinde %10'luk inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FCS), insülin (0,1U/ml), L-glutamin (2mM), sodyum piruvat (100ug/ml), non-esansiyal aminoasitler (100uM) ve antibiyotikler (100ug/ml streptomisin ve 50 U/ml penisilin) eklenerek ve % 0,5 amfoterisin ile 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde kültüre edildi.



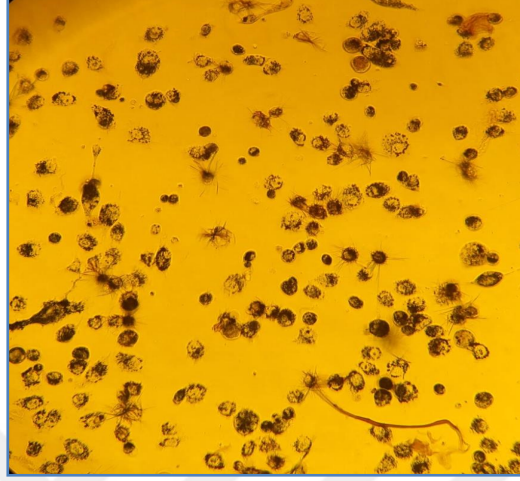
Şekil 2.1. Prostat kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüsü.

2.4. Hücre Canlılık Testi

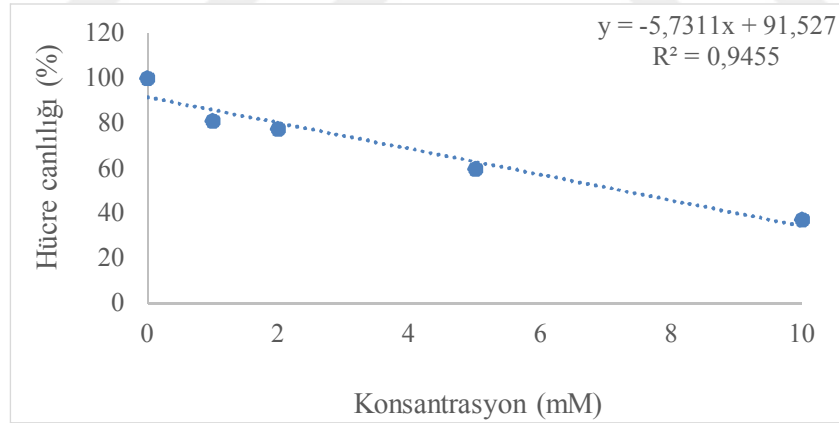
Floroglusinolün PC3 insan prostat kanseri hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile belirlendi. Bu amaçla hücreler 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde sayıldı ve her kuyucuğa 180 μ l olacak şekilde (9×10^3 hücre/kuyucuk) 96'lık plaklara ekildi. %5 CO₂, 37 °C altında, 24 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Floroglusinol maddesi DMSO'da çözülerek dilüsyonlar hazırlandı. DMSO son konsantrasyonu %0.1 olarak ayarlandı. Hücrelerin 24 saat inkübe edilmesinin ardından, floroglusinol 1, 2, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda kuyucuklara uygulandı. Kuyucuklar 24 ve 48 saat 37°C'de %5 CO₂ altında etüvde inkübe edildi. MTT testi için, 5 mg/ml MTT çözeltisi (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür) hazırlandı.

DMSO'da çözülen maddelerin MTT testinin sonucunu etkilememesi için, hücrelerin üzerindeki besiyeri atıldı. Besiyeri atıldıktan sonra 96'lık plakta her kuyucuğa 20 μ l MTT çözeltisi ve 100 μ l taze besiyeri eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyon yapıldı. Daha sonra plaklardaki MTT çözeltisi atıldı ve 100 μ l DMSO eklendi. Canlı hücreler sarı renkli MTT maddesini mor renkli formazan kristallerine dönüştürdü. Her bir kuyucuğun 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında absorbans değerleri kaydedildi. Hücre canlılığı,

kuyucuklardaki çözeltilerin absorbens değerleri ve kontrol grubundaki hücreler referans alınarak hesaplandı. Hücrelerin % canlılık değerleri belirlendikten sonra, hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden konsantrasyon (IC₅₀) değeri hesaplandı.



Şekil 2.2. Formazan kristalleri.



Şekil 2.3. Floroglusinolün 24. saat MTT analizi kalibrasyon grafiği.

2.5. Hücre Döngüsü Analizi

PC3 insan prostat kanser hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki floroglusinolün hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde Cell Cycle Assay Kit kullanıldı. Hücreler her kuyucuğa 5×10^4 gelecek şekilde ekilerek 24 saat inkübe edildi ve hücrelerin üzerindeki besiyeri zarar vermeden atıldı. 500 µl tripsin eklenerek hücrelerin kalkması beklendi. Yüzeyden ayrılan hücreler ependorflara alınarak 5 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernant atıldı ve tüplere %70'lik etanol eklenerek -20 °C derecede 3 saat bekletildi. Hücreler 5 dk 300xg'de santrifüj edildi. Supernatant atılarak 200 µl Muse Cell Cycle reagent eklendi ve karıştırıldı. 30 dk karanlıkta beklenerek Muse hücre analiz cihazında ölçüm alındı.

2.5. Annexin V Bağlanma Analizi

PC3 insan prostat kanseri hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki floroglusinolün apoptotik etkinliğinin saptanması için Annexin V/Dead Cell Assay kiti uygulandı. Bu amaçla, 2×10^5 hücre/kuyucuk şeklinde 12'lik plaklara ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. Etüvden alınan hücrelerin üzerlerindeki besiyeri zarar vermeden atıldı ve 500 µl tripsin eklenerek hücreler kaldırıldı. Toplanan hücreler ependorflara alınarak 5 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi. Ependorflardaki supernatant atılarak hücrelerin üzerine 1'er ml besiyeri eklendi ve karışımdan yeni ependorflara 100'er µl alınarak 100'er µl Annexin V Reagent ile karıştırıldı. Tüpler karanlıkta, 25°C'de 20 dk bekletildi ve sonra Muse hücre analiz cihazı ile hücreler analiz edildi.

Hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS), membran lipidlerinden biridir ve bu proteinler apoptoz sırasında hücre zarının dış yüzeyine ekspoz olur. Analiz sırasında, floresan bir madde ile işaretlenmiş olan Annexin V,

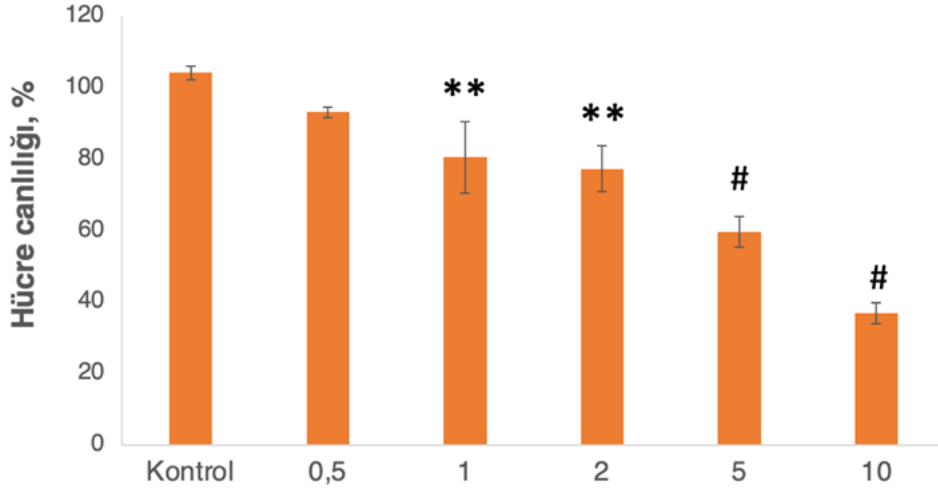
hücresinin dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanır ve oluşan floresan ışımının şiddeti ölçülür. Yapılan çalışmada, floresan maddeler olan Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve non-vital bir boya olan propidium iodide (kırmızı floresan) ile hücreler boyandı. Annexin V-FITC hücre membranına ekspoz olmuş fosfatidilserine bağlanırken, propidium iyodür sadece membran bütünlüğü bozulan ölü hücreleri boyadı.

2.7. Floresan Görüntüleme

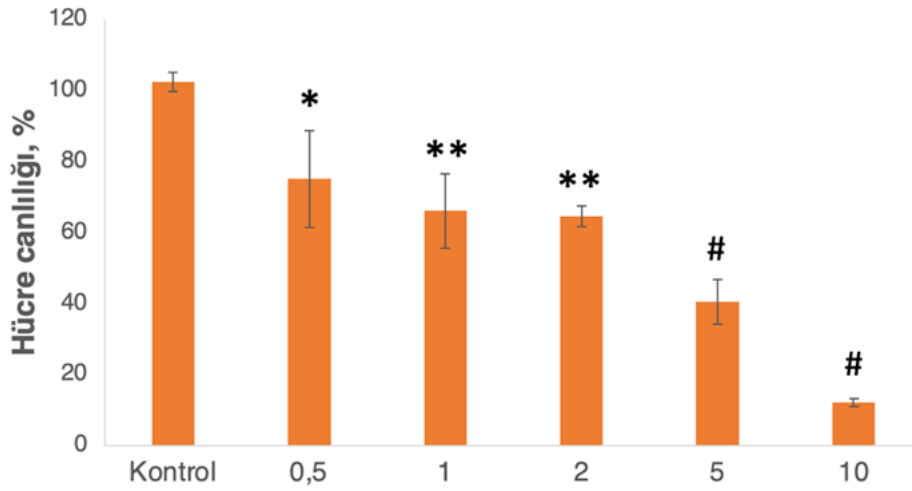
Apoptotik hücre popülasyonunun floresan boyama yöntemi ile mikroskopik olarak gösterilmesi için Annexin V-FITC floresan mikroskop kiti kullanıldı. Hücreler 5×10^4 hücre/kuyucuk olarak ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücrelerin üzerlerindeki besiyeri atılarak tampon ile yıkama yapıldı. Her bir kuyucuğa 300 µl tampon ve 3,5 µl AnV ve PI boyaları eklenerek 15 dk karanlıkta bekletildi. Bu floresan boyalar DNA'ya bağlanarak kromotini ve nukleusu görünür hale getirdi. Propidium iyodür (PI), hücre bütünlüğü ve plazma zarı geçirgenliği bozulmuş ölü hücreleri boyayarak apoptotik hücrelerin ayrımını yapmak için kullanıldı. Daha sonra floresan mikroskopta görüntü alındı.

3. BULGULAR

3.1. Hücre Canlılık Testi



Şekil 3.1. Floroglusinol'ün 24 saat inkübasyon sonrası PC3 hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, #***p<0,0001, kontrole göre anlamlılık.



Şekil 3.2. Floroglusinol'ün 48 saat inkübasyon sonrası PC3 hücre canlılığı üzerine etkisi. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, #***p<0,0001, kontrole göre anlamlılık.

Çizelge 3.1. Floroglusinol'ün, PC3 hücrelerinde hücre canlılığı analiz sonuçları.

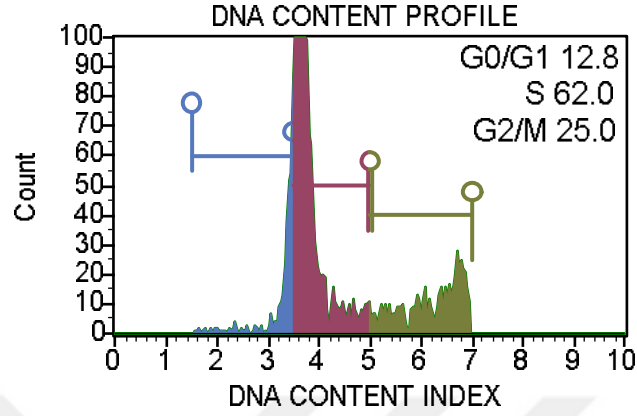
	Hücre canlılığı (%)		P değerleri	
	24. saat	48. saat	24.saat	48. saat
Kontrol	100.18±1.85	100.47±2.75		
0.5 mM	93.19±1.48	75.21±13.63	>0.05	0.0249
1 mM	80.55±10.01	66.19±10.44	0.051	0.0018
2 mM	77.32±6.37	64.71±2.91	0.0017	0.0044
5 mM	59.75±4.30	40.54±6.35	<0.0001	<0.0001
10 mM	36.84±2.88	12.11±1.12	<0.0001	<0.0001

Floroglusinol'ün, hücre canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi için 1, 2, 5, ve 10 mM konsantrasyonlarındaki floroglusinol çözeltisi PC3 insan prostat kanseri hücrelerine uygulandı ve 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığının inhibasyonu MTT testi kullanılarak belirlendi. PC-3 hücrelerine 0.5 mM floroglusinol uygulandıktan sonra 24 saat bekletilen plakta hücre canlılığı %93.19±1.48, 1 mM uygulanan grupta %80.55±10.01 (p=0.051), 2 mM uygulanan grupta %77.32±6.37 (p=0.0017), 5 mM uygulanan grupta %59.75±4.30 (p=<0.0001) ve 10 mM uygulanan grupta %36.84±2.88 (p=<0.0001) olarak belirlendi. (Şekil 3.1., Çizelge 3.1.). Floroglusinol ile 24 saat inkübe edilen hücreler için IC₅₀ konsantrasyonu 7.25 mM olarak hesaplandı.

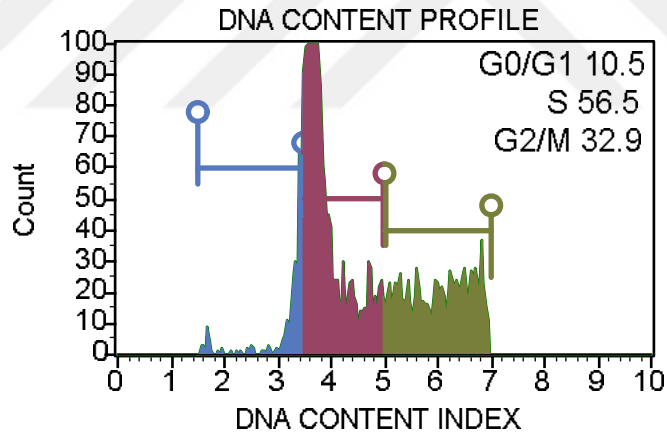
48 saat inkubasyon uygulanan PC-3 hücrelerinde hücre canlılığı, 0.5 mM uygulanan grupta %75.21±13.63 (p=0.0249), 1 mM uygulanan grupta %66.19±10.44 (p=0.0018), 2 mM uygulanan grupta %64.71±2.91 (p=0.0044), 5 mM uygulanan grupta %40.54±6.35 (p=<0.0001), 10 mM uygulanan grupta %12.11±1.12 (p=<0.0001) olarak belirlendi. (Şekil 3.2., Çizelge 3.1.).

Elde edilen bulgulara göre, floroglusinol, 24. ve 48. saatlerde 1 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığını kontrole göre anlamlı olarak azalttı.

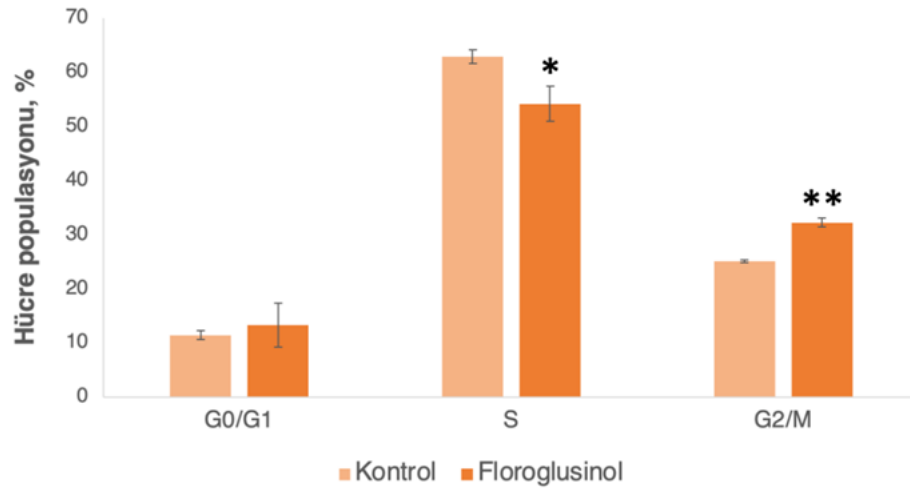
3.2. Hücre Döngüsü Analiz Bulguları



Şekil 3.3. Kontrol grubu PC-3 hücreleri ile yapılan hücre döngüsü analizi plot grafiği.



Şekil 3.4. Floroglucinol (7,25 mM) uygulanan PC-3 hücreleri ile yapılan hücre döngüsü analizi plot grafiği.



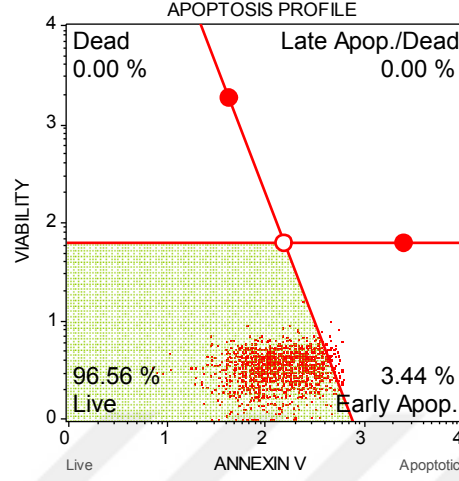
Şekil 3.5. Floroglusinol'ün PC-3 hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisi. Hücreler 7,25 mM floroglusinol ile 24 saat inkübe edildi ve hücre döngüsünün farklı evrelerindeki hücre popülasyonu yüzdesi ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. *p<0,05, **p<0,01, # ***p<0,0001, kontrole göre anlamlılık.

Çizelge 3.2. Hücre döngüsü analizi bulguları.

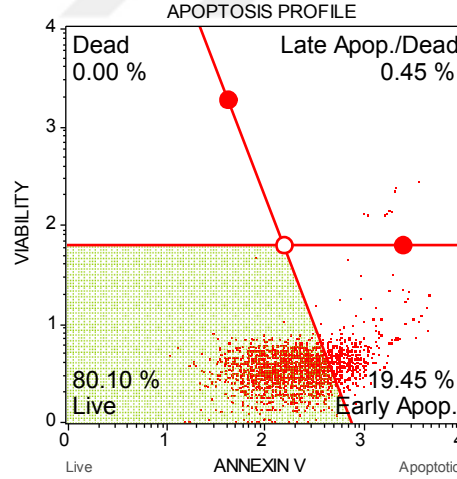
	Kontrol	Floroglusinol	P değeri
G0/G1	% 11.49±0.83	% 13.35±4.03	>0.05
S	% 62.90±1.27	% 54.25±3.18	0.0352
G2/M	% 25.15±0.21	% 32.30±0.84	0.0074

Floroglusinol'ün hücre döngüsü üzerindeki etkisinin incelenmesi amacı ile Cell Cycle Assay kit kullanıldı. Elde edilen verilere göre G0/G1 evresinde hücre popülasyonu yüzdesi kontrol grubunda %11.49±0.83 iken, 7,25 mM floroglusinol uygulanan grupta %13.35±4.03 olarak saptandı. S fazında hücre popülasyonu yüzdesi, kontrol grubunda %62.90±1.27 iken 7,25 mM floroglusinol uygulanan grupta %54.25±3.18 olarak saptandı. G2/M evresindeki hücre popülasyonu yüzdesi kontrol grubunda %25.15±0.21 iken 7,25 mM floroglusinol uygulanan grupta % 32.30±0.84 olarak saptandı. Elde edilen bulgular, floroglusinolün PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde, hücre döngüsünü G2/M evresinde inhibe ettiğini gösterdi.

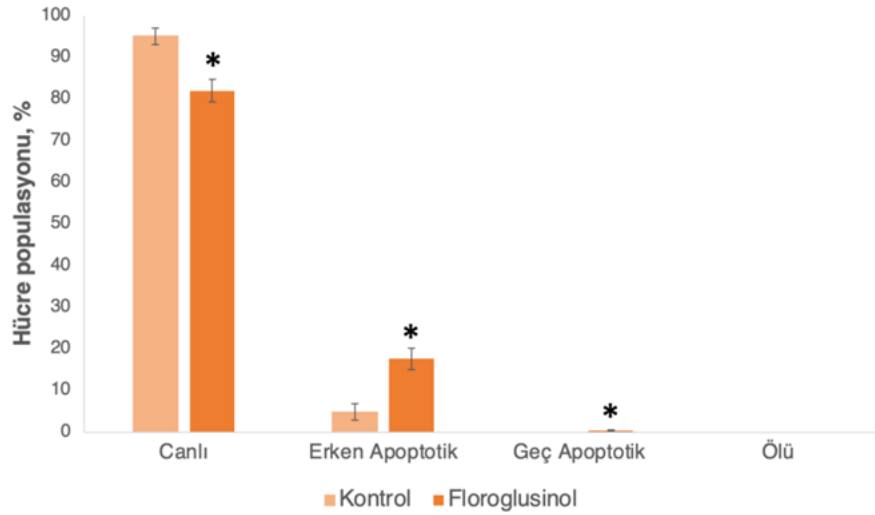
3.3. Annexin V Bağlanma Analizi



Şekil 3.6. Kontrol grubu PC3 hücreleri ile yapılan Annexin V bağlanma analizi plot grafiği. Sol alt bölge canlı hücre popülasyonunu, sol üst bölge ölü hücre popülasyonunu, sağ alt bölge erken apoptotik hücre popülasyonunu ve sağ üst bölge geç apoptotik hücre popülasyonunu göstermektedir.



Şekil 3.7. Floroglucinol (7,25 mM) uygulanan PC-3 hücreleri ile yapılan, Annexin V bağlanma analizi plot grafiği. Sol alt bölge canlı hücre popülasyonunu, sol üst bölge ölü hücre popülasyonunu, sağ alt bölge erken apoptotik hücre popülasyonunu ve sağ üst bölge geç apoptotik hücre popülasyonunu göstermektedir.



Şekil 3.8. Floroglusinol'ün PC-3 hücrelerinde Annexin V bağlanması üzerine etkisi. Hücreler 7,25 mM floroglusinol ile 24 saat inkübe edildi ve hücre analiz cihazı ile saptanan hücre popülasyonu yüzdeleri ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, # *** $p<0,0001$, kontrole göre anlamlılık.

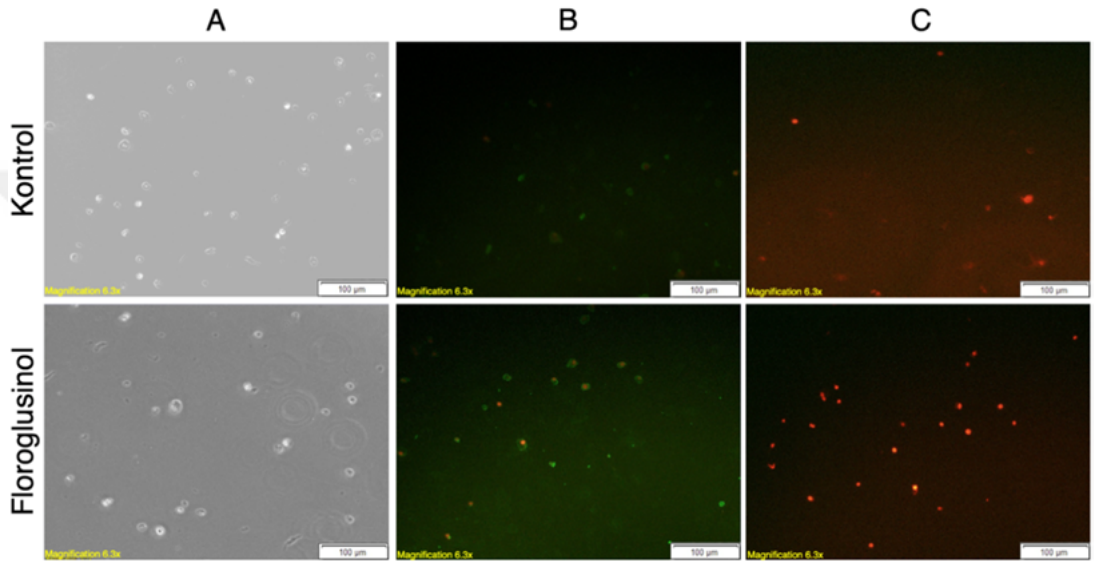
Çizelge 3.3. Annexin V bağlanma analizi bulguları.

	Kontrol	Floroglusinol	P değeri
Canlı	% 95.16±1.97	% 82.03±2.72	0.0314
Erken Apoptotik	% 4.84±1.97	% 17.59±2.62	0.0316
Geç Apoptotik	% 0.00±0.00	% 0.37±0.11	0.0377
Ölü	% 0.00±0.00	% 0.00±0.00	>0.05

Floroglusinolün insan prostat kanseri hücrelerinde apoptotik etkinliğinin saptanması amacı ile Annexin V bağlanma analizi yapıldı. 7,25 mM floroglusinol uygulanan hücrelere ait bulgular, madde uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Annexin V bağlanma analizi bulgularına göre, kontrol grubunda erken apoptotik hücre popülasyonu %4,84±1,97 olarak belirlendi. 7,25 mM floroglusinol uygulanan grupta ise, erken apoptotik hücre popülasyonu %17,59±2,62 olup, kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca, floroglusinol uygulanan grupta geç apoptotik hücre popülasyonu %0,37±0,11 iken, kontrol grubunda geç apoptotik hücre popülasyonu saptanmadı. (Şekil 3.8)

Elde edilen bulgular, floroglusinolün, IC₅₀ konsantrasyonda PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığını gösterdi.

3.4. Floresan Görüntüleme Bulguları



Şekil 3.9. Floroglusinol uygulanan PC3 insan prostat kanseri hücrelerinde floresan görüntüleme bulguları. Annexin V ile boyanmış hücreler kırmızı, propidium iyodür (PI) ile boyanmış hücreler yeşil floresan ile gösterilmektedir.

Erken ve geç apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olan Annexin V/FITC ve PI ile PC3 hücreleri boyandı ve floresan mikroskop ile görüntülendi. Elde edilen bulgular floroglusinol uygulanan grupta apoptozun uyarıldığını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Kanser, hücre döngüsünde meydana gelen bozuklukların sonucu olarak kabul edilir ve hücre döngüsü, apoptoz ve kanser arasında güçlü bir ilişki vardır. Çeşitli yollarla meydana gelen mutasyonların birikmesi ve hücrenin artık bunları tolere edememesi sonucu kanser hücreleri meydana gelir. Kanser oluşumu kademeli olarak gerçekleşen kompleks bir olaydır. Normalde hasara uğramış ya da mutasyon meydana gelen hücrelerde, bu hücrelerin hücre döngüsü boyunca temizlenmesi beklenir. Mutasyonlar daha çok proto onkogenlerde ya da tümör baskılayıcı genlerde meydana geldiklerinde kansere neden olmaktadır. Bu iki gen türü, hücre çoğalmasının farklı aşamalarında görev alırlar ve DNA hasarının tespit edilmesini sağlayarak koruyucu bir rol üstlenirler. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilecek somatik mutasyon, nokta mutasyon, delesyon, translokasyon ve kromozomal delesyonlar aracılığıyla gerçekleşen fonksiyon kayıpları hücrenin kontrolsüz çoğalmasına ve apoptoza karşı direnç kazanmasına yol açarak kanserleşmeyi başlatır (Foster, 2008).

Prostat kanseri, erkeklerde sık rastlanan ve erken evrelerde teşhis edildiğinde ölüm oranı düşük olan kanser türlerinden biridir (Samuel ve ark., 2018). Erken evrelerde yüksek oranda teşhis edilebilirken, metastaz ve tedaviye direnç gösteren hastalarda yüksek ölüm oranlarına neden olur. Prostat kanserinin başlamasında birçok risk faktörü etkilidir (Archer ve ark., 2020). Prostat kanseri heterojen bir hastalık olduğundan dolayı teşhisi ve tedavisinde çeşitli klinik zorluklar vardır. Hastalığın yavaş ya da agresif seyir ettiğinin ayırt edilmesi hastalığın doğru bir şekilde yönetimini etkiler (Shen ve Abate-shen, 2010).

Agresif kanser türlerinde, tümör hücreleri tedaviye direnç göstererek, apoptozdan kaçma gibi çeşitli yollar geliştirir. Bu yüzden, prostat kanseri tedavisinde yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Radyasyon tedavisi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavilerin istenmeyen birçok yan etkileri vardır. Bu

nedenle, doğal bileşikler anti-tümör etkileri ve güvenli olmaları nedeni ile son zamanlarda önemli ölçüde incelenmiştir. Doğal maddeler, birçok molekül ve sinyal yollarını etkileyebilme yetenekleri ile tümörün başlamasını ve gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Fontana ve ark., 2020).

Çeşitli alg türlerinde bulunan floroglusinol maddesi, hücrede reaktif oksijen türlerini inhibe ettiği, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin yok olmasını engellediği bulunmuştur. Ayrıca floroglusinol'un, HaCaT insan derisi keratinositlerinde çeşitli konsantrasyonlarda uygulandığında, hücre canlılığında anlamlı bir azalma göstererek H₂O₂'nin sebep olduğu sitotoksiteyi önlemiştir. Farklı deneysel bulgular, floroglusinol'un kanserli hücrelerde, apoptoz yol mekanizmalarını indüklediğini desteklemiştir (Park ve ark., 2019).

Floroglusinol, meme kanseri hücrelerinde, EMT transkripsiyon faktörü olan SLUG'un aşağı regülasyonunu sağlayarak epitelial-mezenkimal hücre geçişini (EMT) baskıladığı gösterilmiştir. Epitelial-mezenkimal hücre geçişi (EMT), kanser hücrelerinde artan bir hareketlilik ve invazivlik sağlayarak metastaza neden olur. PI3K/AKT ve RAS/RAF-1/ERK sinyal yolları birçok kanser türünde EMT'yi düzenler. Floroglusinol'un ayrıca meme kanseri hücrelerinde P13K aktivitesini ve AKT'nin fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, RAF-1 ile etkileşime giren aktif KRAS formunu azalttı ve ERK'nın fosforilasyonunu azaltmaktadır. Floroglusinol, SLUG inhibasyonu yoluyla meme kanseri hücrelerinin mezenkimal fenotiplerini baskılayarak metastazın yanı sıra tümör oluşumunu azaltmaktadır (Drygalski ve ark., 2021).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında floroglusinol'ün, antikanser etkinliğinin araştırılması için PC3 insan prostat kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Bu kapsamda, floroglusinol'ün PC3 hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkinliği değerlendirilmiştir. Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanserin tedavisinde sıklıkla sitotoksik ilaçlar kullanılmaktadır. Tedavideki en önemli problemlerden biri de kanser hücrelerinin sitotoksik ilaçlara gösterdiği dirençtir. Bu nedenle doğal kaynaklı ve yan etkileri en aza indirilmiş yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Floroglusinol'ün hücre canlılığı üzerindeki etkisini ölçülebilmek için MTT testi uygulanmıştır. Yaptığımız çalışmalar, floroglusinol'ün, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermiştir.

Floroglusinol'ün PC-3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkinliği Annexin V bağlanma analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, floroglusinol'ün IC₅₀ konsantrasyonda hücrelerde aAnnexin V bağlanmasını anlamlı olarak artırdığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Floroglusinol bir liken metaboliti olup, literatürde söz konusu bileşiğin antikanser etkinliğine dair oldukça az sayıda, fakat umut verici bulgular yer almaktadır. Bu tez çalışması ile floroglusinol'ün insan prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkinliği ilk kez değerlendirilmiştir. Gözlenen sitotoksik ve apoptotik etkinliğe ilişkin mekanizmaların aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Floroglusinol'ün İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik ve Apoptotik Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Kanser tedavisinde doğal kaynaklı ürünlerin önemi bilinmektedir. Son yıllarda, bu tür ürünlerden izole edilen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine yönelik etkinliklerine dair çalışmalar hız kazanmıştır. Florotanenler kahverengi alglerde bulunan oligomerik bileşikler olup, floroglusinol (1,3,4-trihidroksibenzen), Ecklonia türlerinden izole edilen altı çeşit florotanen türünden birisidir. Yapılan çalışmalar, floroglusinolün antitrombotik ve profibrinolitik aktivitelerinin yanı sıra kanserde de etkili olabileceklerini göstermiştir. Bununla birlikte, bu bileşiğin çeşitli kanser türlerindeki etkinliği hakkında literatürdeki yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, florotanen türevi doğal kaynaklı bir bileşik olan floroglusinolün, insan prostat kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, androjen bağımsız PC3 insan prostat kanser hücreleri kullanılmış olup, floroglusinolün söz konusu hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bileşiğin hücreler üzerindeki apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile Annexin V bağlanma analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen bulgular, floroglusinolün PC3 hücreleri üzerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ve hücre döngüsünü G2/M fazında inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, bileşiğin IC₅₀ konsantrasyonda PC3 insan prostat kanseri hücrelerinde annexin V bağlanmasını anlamlı olarak artırarak apoptozu uyardığı saptanmıştır.

Floroglusinol, doğal kaynaklı bir bileşik olup, kanserdeki etkinliği konusunda literatürde kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Bu tez çalışması ile, söz konusu bileşiğin prostat kanser hücrelerindeki apoptotik etkinliği ilk kez değerlendirilmiştir. Bu nedenle çalışmadan elde edilen bulgular, söz konusu bileşiğin daha ileri çalışmaları için yol gösterici niteliktedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, Floroglusinol, Hücre döngüsü, Prostat kanseri, Sitotoksiste

SUMMARY

The Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Efficiency of Phloroglucinol in Human Prostate Cancer Cells

The importance of natural products in cancer treatment is known. In recent years, studies on the activities of compounds isolated from such products against various cancer cells have gained importance. Fluorotannins are oligomeric compounds found in brown algae, and phloroglucinol (1,3,4-trihydroxybenzene) is one of six types of fluorotannin isolated from *Ecklonia* species. Studies have shown that phloroglucinol can be effective in cancer as well as antithrombotic and profibrinolytic activities. However, there is not enough data in the literature regarding the effectiveness of this compound in various types of cancer.

In this thesis, it was aimed to evaluate the anticancer activity of phloroglucinol, a naturally derived fluorotanene derivative, on human prostate cancer cells. In this context, androgen-independent PC3 human prostate cancer cells were used, and the cytotoxic effect of phloroglucinol on these cells was evaluated with the MTT test. Annexin V binding analysis studies were performed to evaluate the apoptotic activity of the compound on cells.

The findings revealed that phloroglucinol exerts a cytotoxic effect on PC3 cells depending on concentration and time, and inhibits the cell cycle in the G2/M phase. In addition, it was determined that the compound stimulated apoptosis by significantly increasing annexin V binding in PC3 human prostate cancer cells at IC50 concentration.

Phloroglucinol is a naturally derived compound, and there are limited studies in the literature on its effectiveness in cancer. In this thesis study, the apoptotic activity of the aforementioned compound in prostate cancer cells was evaluated for the first time. Therefore, the findings obtained from the study are guiding for further studies of the compound in question.

Keywords: Apoptosis, Cell cycle, Cytotoxicity, Phloroglucinol, Prostate cancer

KAYNAKLAR

- ARNOLD TM, TARGETT NM (1998). Deniz kahverengi alglerinde florotanin sentezi ve polimerizasyonunun yerinde oranlarının belirlenmesi. *J. Chem. Ekol*, **24**:577–595.
- ARUR S, UCHE UE, REZAUL K, FONG M, SCRANTON V, COWAN AE, MOHLER W, HAN DK (2003). Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*, **4**:587–98.
- ARCHER M, DOGRA N, KYPRIANOU N (2020). Inflammation as a Driver of Prostate Cancer Metastasis and Therapeutic Resistance. *Cancers*, **12**, 2984.
- BRATTON DL, FADOK VA, RICHTER DA, KAILEY JM, GUTHRIE LA, HENSON PM (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*. **272**:26159–65.
- BOSTWICK DG, BURKE HB, DJAKIEW D, EULING S, HO SM, LANDOLPH J, MORRISON H, SONAWANE B, SHIFFLETT T, WATERS DJ, TIMMS B (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer*, **15**;101(10 Suppl):2371-490.
- BANCROFT EK, RAGHALLAIGH HN, PAGE EC, EELES RA (2021). Updates in Prostate Cancer Research and Screening in Men at Genetically Higher Risk. *Current Genetic Medicine Reports*, **9**:47–58.
- BRAUN DE, TOCHER DA, PRICE SL., GRIESSER UJ (2012). The Complexity of Hydration of Phloroglucinol: A Comprehensive Structural and Thermodynamic Characterization. *J Phys Chem B*, Apr 5; **116**(13): 3961–3972.
- BIRKEMEYER C, LEMESHEVA V, BILLIG S, TARAKHOVSKAYA E. (2020). Composition of Intracellular and Cell Wall-Bound Phlorotannin Fractions in Fucoid Algae Indicates Specific Functions of These Metabolites Dependent on the Chemical Structure. *Metabolites*, **10**, 369.
- BIESSY A, FILION M (2021) Phloroglucinol Derivatives in Plant-Beneficial *Pseudomonas* spp.: Biosynthesis, Regulation, and Functions. *Metabolites*, **11**, 182.
- CATARINO M.D, FERNANDES I, OLIVEIRA H, CARRASCA M, FERREIRA R, SILVA AMS, CRUZ MT, MATEUS N, CARDOSO SM (2021). Antitumor Activity of *Fucus vesiculosus*-Derived Phlorotannins through Activation of Apoptotic Signals in Gastric and Colorectal Tumor Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci*, **22**, 7604.

- CATARINO MD, AMARANTE SJ, MATEUS N, SILVA AMS, CARDOSO SM (2021). Brown Algae Phlorotannins: A Marine Alternative to Break the Oxidative Stress, Inflammation and Cancer Network. *Foods*, **10**, 1478.
- COHEN GM (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.*, **326**(Pt 1):1–16.
- CHEN F-Z, ZHAO X-K (2013). Prostate Cancer: Current Treatment and Prevention Strategies. *Iran Red Crescent Med J.*, Apr; **15**(4): 279–284.
- CHRISTENSON M, SONG C-S, LIU Y-G, CHATTERJEE B (2022). Precision Targets for Intercepting the Lethal Progression of Prostate Cancer: Potential Avenues for Personalized Therapy. *Cancers (Basel)*, Feb; **14**(4): 892.
- CHE B, ZHANG W, XU S, YIN J, HE J, HUANG T, LI W, YU Y, TANG K (2021). Prostate Microbiota and Prostate Cancer: A New Trend in Treatment. *Front. Oncol.*, **11**:805459.
- DE SILVA F, ALCORN J (2022). A Tale of Two Cancers: A Current Concise Overview of Breast and Prostate Cancer. *Cancers*, **14**, 2954.
- DE MARZO AM, PLATZ EA, SUTCLIFFE S, XU J, GRÖNBERG H, DRAKE CG, NAKAI Y, ISAACS WB, NELSON WG (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, **7**(4): 256–269.
- DRYGALSKI K, SIEWKO K, CHOMENTOWSKI A, ODRZYGÓŹDŹ C, ZALEWSKA A, KRĘTOWSKI A, MACIEJCZYK M (2021). Phloroglucinol Strengthens the Antioxidant Barrier and Reduces Oxidative/Nitrosative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume*, Article ID 8872702, **18**.
- DAVIDSSON S, FIORENTINO M, ANDRÉN O, FANG F, MUCCI LA, VARENHORST E, FALL K., RIDER JR (2011). Inflammation, Focal Atrophic Lesions, and Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) with Respect to Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **20**(10): 2280–2287.
- FORD L, THEODORIDOU K, SHELDRAKE GN, WALSH PJ (2019). A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, **30**:587–599.
- FOSTER I (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, **14**, 144e149.
- FONTANA F, RAIMONDI M, MARZAGALLI M, DI DOMIZIO A., LIMONTA P (2020). Natural Compounds in Prostate Cancer Prevention and Treatment: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Cells*, **9**(2):460.

- GARDAI SJ, MCPHILLIPS KA, FRASCH SC, JANSSEN WJ, STAREFELDT A, MURPHY-ULLRICH JE, BRATTON DL, OLDENBORG PA, MICHALAK M, HENSON PM (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, **123**:321–34.
- GROZESCU T, POPA F (2017). Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy, **10**(1): 5–12.
- GALLAGHER RP, FLESHNER N (1998). Prostate cancer: 3. Individual risk factors. *CMAJ*, **159**(7): 807–813.
- GANN PH (2002). Risk Factors for Prostate Cancer. *Rev Urol.*, **4** (Suppl 5): S3–S10.
- GHOSH S., HAZRA J, PAL K., NELSON VK., PAL M (2021). Prostate cancer: Therapeutic prospect with herbal medicine Ghosh. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.*, **2**: 100034.
- HIRSCH T, MARCHETTI P, SUSIN SA, DALLAPORTA B, ZAMZAMI N, MARZO I, GEUSKENS M, KROEMER G (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Onkogen*, **15** :1573–81.
- HU X, WANG Y-H, YANG Z-Q, SHAO Y-X, YANG W-X, LI X (2020). Association of 5-alpha-reductase inhibitor and prostate cancer incidence and mortality: a meta-analysis. *Transl Androl Urol*, **9**(6):2519-2532.
- HA JW, SONG H, HONG SS, BOO YC (2019). Marine alga *Ecklonia cava* extract and dieckol attenuate prostaglandin E2 production in HaCat keratinocytes exposed to airborne particulate matter. *Antioxidants*, **8**:190.
- JIMENEZ B, VOLPERT OV, CRAWFORD SE, FEBBRAIO M, SILVERSTEIN RL, BOUCK N (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.*, **6**:41–8.
- JAN R., CHAUDHRY G (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*, **9**(2): 205-218.)
- KALE J, OSTERLUND EJ, ANDREWS DW (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, **25**, 65–80.
- KIM R-K., SUH Y, YOO , CUI, HWANG E., KIM H-J , KANG J-S, KIM M-J, LEE YY, Lee S-J (2015). Phloroglucinol suppresses metastatic ability of breast cancer cells by inhibition of epithelial-mesenchymal cell transition. *Cancer Science*, **106**(1):94–101.

- KANG M-H, KIM I-H, NAM T-J (2014). Phloroglucinol induces apoptosis via apoptotic signaling pathways in HT-29 colon cancer cells. *Oncology Reports*, **32**: 1341-1346.
- KANG M-H, KIM I-H, NAM T-J (2014). Phloroglucinol induces apoptosis through the regulation of insulin-like growth factor 1 receptor signaling pathways in human colon cancer HT-29 cells. *International Journal of Oncology*, **45**: 1036-1042, 2014.
- KWON Y-H, JUNG S-Y, KIM J-W, LEE S-H, LEE J-H, LEE B-Y, KWON S-M (2012). Phloroglucinol Inhibits the Bioactivities of Endothelial Progenitor Cells and Suppresses Tumor Angiogenesis in LLC-Tumor-Bearing Mice. *PLoS ONE*, **7**(4): e33618.
- KWON Y-H, JUNG S-Y, KIM J-W, LEE S-H, LEE J-H, LEE B-Y, KWON S-M, LEE D-H, LEE K-S (2012). Phloroglucinol Inhibits the in vitro Differentiation Potential of CD34 Positive Cells into Endothelial Progenitor Cells. *Biomol Ther (Seoul)*, **20**(2): 158–164.
- KIM R-K, SUH Y., YOO K-C, CUI Y-H, HWANG, KIM H-J, KANG J-S, KIM M-J, LEE YY, LEE S-J (2015). Phloroglucinol suppresses metastatic ability of breast cancer cells by inhibition of epithelial-mesenchymal cell transition. *Cancer Science*, **106**(1):94–101.
- KUMAR LR, PAUL P T, ANAS KK, TEJPAL CS, CHATTERJEE NS, ANUPAMA TK., MATHEW S, RAVISHANKAR C N (2022). Phlorotannins–bioactivity and extraction perspectives. *Journal of Applied Phycology*, **34**:2173–2185.
- KHAN F, JEONG G-J, KHAN MSA, TABASSUM N, KMY-M (2022). Seaweed-Derived Phlorotannins: A Review of Multiple Biological Roles and Action Mechanisms. *Mar. Drugs*, **20**, 384.
- LI MX., DEWSON G (2015). Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. *F1000Prime Reports*, **7**:42.
- LAWSON JS, GLENN WK (2022). Multiple pathogens and prostate cancer. *Infect Agent Cancer*, **17**: 23.
- MARTINO J-CI., YOULE RJ (2011). Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev Cell*, **21**(1): 92–101.
- MERRIEL SWD, FUNSTON G, HAMILTON W (2018). Prostate cancer in primary care. *ADV THER*, **35**(9): 1285-1294
- MATSUSHITA M, FUJITA K, NONOMURA N (2020). Influence of Diet and Nutrition on Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1447.

- MATULJA D, VRANJEŠEVIĆ, F, KOLYMPADI MM, PAVELIĆ SK, MARKOVIĆ D (2022). Anticancer Activities of Marine-Derived Phenolic Compounds and Their Derivatives. *Molecules*, **27**, 1449.
- NEGARA BFSP, HAK SJ, KIM J-S, CHOI J-S (2021). Effects of Phlorotannins on Organisms: Focus on the Safety, Toxicity, and Availability of Phlorotannins. *Foods*, **10**, 452.
- NACUSI LP, TINDALL DJ (2011). Targeting 5 α -reductase for prostate cancer prevention and treatment. *Nat Rev Urol.*, **8**(7): 378–384.
- NEVEDOMSKAYA E, BAUMGART SJ, HAENDLER B (2018). Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery., *Int J Mol Sci.*, **19**(5): 1359.
- NWOSU F, MORRIS J, LUND VA, STEWART D, ROSS HA, MCDUGALL GJ (2011). Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chemistry*, **126** :1006–1012.
- NORBURY C.J, HICKSON I D . (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toksikol.*, **41** :367-401.
- National Health Commission of the People's Republic of China. National guidelines for diagnosis and treatment of prostate cancer 2022 in China. (2022) *Chin J Cancer Res.*, **34**(3): 270–288.
- O'BRIEN MA, KIRBY R (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **18**(6), 572–585.
- ÖZKAN Burak, ÖBEK Can (2008). Prostate Specific Antigen-2 8. *Türkiye Klinikleri J Urology-Special Topics*, **1**(2):7-13.
- ÖZAY Güleş, ÜLKER Eren. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78.
- PISTRITTO G, TRISCIUOGGIO D, CECI C, GARUFI A., GABRIELLA D (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *AGING*, **8**(4), 603-619.
- PERNAR CH, EBOT EM, WILSON KM, MUCCI LA (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, **8**(12): a030361.
- PARK SJ, AHN G, LEE NH, PARK JW, JEON YJ, JEE Y (2011). Phloroglucinol (PG) purified from *Ecklonia cava* attenuates radiation-induced apoptosis in blood lymphocytes and splenocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **49**:2236–2242.

- PARK C, CHA H-J, HONG SH, KIM G-Y, KIM S, KIM H-S, KIM BW, JEON Y-J, CHOI YH (2019). Protective Effect of Phloroglucinol on Oxidative Stress-Induced DNA Damage and Apoptosis through Activation of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in HaCaT Human Keratinocytes. *Mar. Drugs*, **17**, 225.
- ROCHA DHA, SECA AML, PINTO DCGA (2018) Seaweed Secondary Metabolites In Vitro and In Vivo Anticancer Activity. *Mar Drugs*, **16**(11): 410.
- RAWLA P (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.*, **10**(2):63-89.
- REED JC (2000). Mechanism of Apoptosis. *Am J Pathol.*, Now; **157**(5): 1415-1430.
- SARANYUTANON S, DESHMUKH SK., DASGUPTA S, PAI S, SINGH S, SINGH AP (2020). Cellular and Molecular Progression of Prostate Cancer: Models for Basic and Preclinical Research. *Cancers*, **12**, 2651.
- SFANOS KS, ISAACS J. (2011). The “infectious” nature of human prostate cancer: A cautionary note. *Oncotarget*, **2**:281–283.
- SFANOS K.S, DE MARZO AM (2012). Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*, **60**:199–215.
- SFANOS KS, ISAACS WB, DE MARZO AM (2013). Infections and inflammation in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*, **1**(1): 3–11.
- SUMANASURIYA S, DE BONO J (2018). Treatment of Advanced Prostate Cancer—A Review of Current Therapies and Future Promise. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **8**(6): a030635.
- SPERANDIO S, DE BELLE I, BREDESEN DE (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci, USA* **97**:14376–81.
- SUSAN E (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, **35**(4): 495–516.
- SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **20**(3): 175–193.
- SANTOS BM, ZIBRANDTSEN JFS, GUNBILIG D, SØRENSEN M, COZZ F, BOUGHTON BA, Heskes AM, Neilson EHJ (2019). Quantification and Localization of Formylated Phloroglucinol Compounds (FPCs) in Eucalyptus Species. *Front. Plant Sci*, **10**:186.
- SINGH IP, SIDANA J, BHARATE SB, FOLEY WJ (2010). Phloroglucinol compounds of natural origin: synthetic aspects. *Nat Prod Rep*, **27**(3):393-416.
- SO M.J, CHO EJ (2014). Phloroglucinol Attenuates Free Radical-induced Oxidative Stress. *Prev. Nutr. Food Sci*, **19**(3):129-135.

- SUEN D-F, NORRIS L, YOULE RJ (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & Development*, **22**:1577–1590.
- SHEN MM, ABATE-SHEN C, (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*, **24**:1967–2000.
- TESTA U, CASTELLI G, PELOSI E (2019). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines*, **6**:82.
- Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer (2015). *Cell*, **163**(4):1011-25.
- WALLIS C.D, NAM RK (2015). Prostate Cancer Genetics: A Review. *EJIFCC*, **26**(2): 79–91.
- WANG G, ZHAO D, SPRING DJ, DEPINHO RA (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev.*, **32**(17-18): 1105–1140.
- WONG RSY (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **30**:87.
- VENKATESANA J, KEEKANA KK, ANILB S, BHATNAGARC I, KIM S-K (2019). Phlorotannins. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 515–527.
- YOON J-Y, CHOI H, JUN H-S (2017). The Effect of Phloroglucinol, A Component of Ecklonia cava Extract, on Hepatic Glucose Production. *Mar. Drugs*, **15**, 106.
- ZHANG KQ, SALZMAN SA, REDING DJ, SUAREZ BK, CATALONA WJ, BURMESTER JK (2003). Genetics of Prostate Cancer. *Clin Med Res*, **1**(1): 21–28.