

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK DOKTORA PROGRAMI

**PROSTAT KANSERİ HÜCRE DİZİNİNDE FOTODİNAMİK
VE SONODİNAMİK TEDAVİLERİN ETKİSİ**

MEHRAN AKSEL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN

Bu tez TUBİTAK-SBAG tarafından 114S491 proje numarası ile ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-15068 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Mehran AKSEL tarafından hazırlanan “Prostat Kanseri Hücre Dizininde Fotodinamik ve Sonodinamik Tedavilerin Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (T.D.) :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

Üye :
*(Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)(İmza)

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit Kum
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenim boyunca olduğu kadar tezimin hazırlanmasında gösterdiği öncülük, titizlik, özveri ve bilimsel katkılarından dolayı danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Dinçer Bilgin'e; bölüm hocalarım Prof. Dr. Mehmet Bilgen ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem Bozkurt Girit'e, tezimin komitesinde yer alan, Prof. Dr. Mehmet Canpolat ve Prof. Dr. Ayfer Atalay hocalarıma teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım sırasında her türlü desteği sağlayan araştırma laboratuvarlarında her türlü desteği sağlayan sayın hocalarım Doç. Dr. Özge Çevik, Doç. Dr. Ali Özmen, Prof. Dr. Bülent Bozdoğan, Prof. Dr. Tülin Karagenç, Doç. Dr. Zeynel Dalkılıç'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın deney aşamalarında bana her zaman destek olan arkadaşlarım Araş. Gör. Ergün Cem Köken, Dr. Mürüvvet Abbak, Öğr. Gör. Adem Yavaş, Dr. Levent Elmas, Öğr. Gör. Harun Çimen, Dr. Erman Oryaşın, Araş. Gör. Ömer Erdoğan, Araş. Gör. Fatih Birtekocak, Mustafa Yılmaz ve Soner Kaya'ya, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline ve mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, bu çalışmanın gerçekleşmesinde önemli rol oynayan ve gerekli maddi imkânları sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğüne ve TÜBİTAK'a da teşekkür ediyorum.

Son olarak, her zaman yanımda olan, beni her daim destekleyen ve bugünlere gelmemi sağlayan aileme, kardeşlerime ve eşime çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Prostat Anatomisi	3
2.1.2. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	4
2.1.3. Prostat Kanserinde Tanı	6
2.1.4. Prostat Kanserinin Gelişimi ve Prostat Kanserinde Sinyal Yolakları	8
2.1.5. Wnt Sinyal İletisinde Rol Oynayan Başlıca Proteinler	12
2.1.5.1. Wnt proteinleri	12
2.1.5.2. Frizzled proteinleri	13
2.1.5.3. Lipoprotein ilişkili reseptör proteinler	13
2.1.5.4. Axin.....	13
2.1.5.5. β - katenin.....	14
2.1.5.6. Adenomatosis polyposis coli.....	14
2.1.5.7. T hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör	15
2.1.5.8. Glikojen sentaz kinaz 3	15
2.1.5.9. Dishevelled.....	16
2.1.5.10. Wnt sinyali ile apoptozun ilişkisi	16
2.1.6. Prostat Kanserinde Tedavi Yöntemleri	17
2.2. Fotodinamik ve Sonodinamik Tedaviler	18
2.2.1. Fotodinamik Tedavi	18
2.2.2. Fotodinamik Tedavinin Tarihçesi	20
2.2.3. Fotodinamik Tedavide Kullanılan Işık Kaynakları	22
2.2.4. Sonodinamik Tedavi	23
2.2.5. Sonodinamik Tedavinin Tarihçesi	26
2.2.6. Fotodinamik ve Sonodinamik Tedavide Kullanılan Ajanlar.....	27
2.2.6.1. Porfirin ve türevleri	29
2.2.6.2. Porfirin olmayan ajanlar	32
2.2.7. Fotodinamik Terapinin Kansere Tedavisinde Kullanımı.....	33
2.2.8. Sonodinamik Terapinin Kansere Tedavisinde Kullanımı	35
2.2.9. Fotodinamik ve Sonodinamik Terapide Hücre Ölümü Mekanizmaları	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
3.1. Hücre Kültürü Yöntemi.....	39

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları	41
3.1.2. Besiyerinin Hazırlanması ve Hücrelerin Çoğaltılması	41
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi	42
3.1.4. Hücre Sayımı ve Deney Düzenine Kurulması	42
3.1.5. Fotosensitif/Sonosensitif Ajanların Uygulanması	43
3.1.6. Işık ve Ultrases Uygulamaları	44
3.2. Ölçüm ve Değerlendirmeler	46
3.2.1. Hücre Canlılığı Testleri	46
3.2.2. Apoptoz ve Nekroz Tayini	46
3.2.3. Western Blot yöntemi	47
3.2.3.1. Hücre lizatının hazırlanması ve uygulanması	47
3.2.3.2. SDS-PAGE elektroforez	48
3.2.3.3. Jelin membrana transfer edilmesi	50
3.2.3.4. Görüntüleme	52
3.2.4. RNA izolasyonu ve RT-PCR	53
3.2.4.1. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu	53
3.2.4.2. cDNA sentezi	54
3.2.4.3. RT-PCR protokolü	55
3.2.5. Biyokimyasal Ölçümler	56
3.2.5.1. Reaktif oksijen türleri miktarının ölçümü	56
3.2.5.2. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	57
3.2.5.3. İndirgenmiş glutatyon ölçümü	58
3.2.5.4. Malondialdehit ölçümü	59
3.2.5.5. Katalaz aktivitesi ölçümü	60
3.2.6. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	61
4.1. PCa Hücre Dizilerinde Sonosensitif/Fotosensitif Ajanların Tek Başına Etkinliği	61
4.2. PC3 ve LNCaP Hücre Dizilerinde Işık ve Ultrasesin Tek Başına Etkinliği	62
4.3. PCa Hücre Dizilerine Sonodinamik Tedavi Uygulanması	64
4.4. PCa Hücre Dizilerine Fotodinamik Tedavi Uygulanması	66
4.5. PC3 ve LNCaP Hücrelerine Sonofotodinamik Tedavilerin Etkisi	67
4.6. PC3 ve LNCaP Hücre Dizilerinde Apoptoz ve Nekroz Tayini Sonuçları	70
4.6.1. PHa-Aracılı Tedavilerin Prostat Kanseri Hücre Dizilerine Apoptotik Etkileri	70
4.6.2. MB-Aracılı Tedavilerin Prostat Kanseri Hücre Dizilerine Apoptotik Etkileri	73
4.7. PCa Hücre Dizilerinde Tedavi Sonrası Western Blot Sonuçları	76
4.8. PCa Hücre Dizilerinde Tedavi Sonrası Wnt Sinyal Yolu Gen İfade Seviyeleri	80
4.9. Prostat Kanseri Hücre Dizilerinde Tedavi Sonrası Biyokimyasal Analizler	84
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	95
KAYNAKLAR	97
EKLER	115
ÖZGEÇMİŞ	116

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALA	:Aminolevulinik asit
AlPc	:Alüminyum Fitalosiyanın
APC	:Adenomatous Polyposis Coli
CAT	:Katalaz
CK-1	:Kazein Kinaz-1
D₂O	:Döteryum
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
Dvl	:Dishevelled
ECL	:Elektrokemilüminesans
FCS	:Fetal Calf Serum
FDT	:Fotodinamik Tedavi
FM	:Metilen Mavisi-Aracılı Fotodinamik Tedavi
FSM	:Metilen Mavisi -aracılı Sonofotodinamik Tedavi
Fz	:Frizzled
GSH	:İndirgenmiş Glutasyon
GSK3β	:Glikojen Sentez Kinaz 3 β
HOPI	:Hoechst-Propidiyum İyodid
LEF	:Lymphoid Enhancer Factor
LRP5/6	:Lipoprotein-ilişkili Reseptör Proteinleri
¹O₂	:Singlet Oksijen
OD	:Optik Yoğunluk
MB	:Metilen Mavisi
MDA	:Malondialdehit
MTT	:3-(4 5-dimethylthiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazolium bromide
NF-κBeta	:Nuclear Factor Kappa Beta

NEMO	:NF-Kappa-B Essential Modulator
PHa	:Fiyorbid a
PPIX	:Protoporfirin IX
PIC	:Protease Inhibitor Cocktail
PI3K	:Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
PSA	:Prostat Spesifik Antijen
PVDF	:Poliviniliden Florid
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
SDT	:Sonodinamik Tedavi
SDS-PAGE	:Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
SFDT	:Sonofotodinamik Tedavi
SFRP2	:Secreted Frizzled-Related Protein-2
SOD	:Süperoksit Dismutaz
SM	:Metilen Mavisi-Aracılı Sonodinamik Tedavi
TBS	:Tris-Buffered Saline
TCF	:T-Cell Factor
US	:Ultrases

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Türkiye’de 2014 yılında erkeklerde 10 kanser türünün insidans hızları.....	2
Şekil 2. 2018 yılı Amerikada kansere bağlı ölüm oranları ve kanser görülme sıklıkları.....	5
Şekil 3. Prostat kanserinde rol oynayan sinyal yolakları.....	8
Şekil 4. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı.....	12
Şekil 5. Axin’in yapısı ve axin’e bağlanan proteinler.....	13
Şekil 6. Fotodinamik tedavi sonucu meydana gelen olaylar ve Fotosensitizasyon yolları.....	19
Şekil 7. Fotodinamik tedavinin tarihsel gelişimi.....	21
Şekil 8. Sonodinamik tedavi mekanizması.....	23
Şekil 9. Ultrasesin termal olmayan etkileri.....	24
Şekil 10. Sonodinamik tedavide olası sitotoksiste mekanizması.....	26
Şekil 11. Sonodinamik tedaviye tarihsel bakış.....	27
Şekil 12. Porfirin sınıfı ve porfirin dışı ajanlar.....	28
Şekil 13. Porfirinoid bileşiklerin temel yapıları.....	28
Şekil 14. Fiyorbid a’nın moleküler yapısı.....	32
Şekil 15. Metilen mavisinin moleküler yapısı.....	33
Şekil 16. Apoptotik yolakların şematik gösterimi.....	37
Şekil 17. Deney düzeneği için hücrelerin 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına ekilmesi.....	43
Şekil 18. Etonolde çözülmüş PHa ve MB’nin spektrumları.....	43
Şekil 19. Işık ve ultrases uygulamalar ile ışık ölçümlerinde kullanılan araç.....	44
Şekil 20. SDS-PAGE jelinin elektroforezde yürütülmesi.....	50
Şekil 21. Membranın transfer edilmesi.....	51
Şekil 22. Membranların Commasive-blue ve Ponceau S ile boyanması.....	51
Şekil 23. Mebranın ECL sonrası filmde görüntülenmesi aşaması.....	52
Şekil 24. Süperoksit dismutaz kit ekim prosedürü.....	58
Şekil 25. Sadece PHa’nın prostat kanseri hücrelerine etkisi.....	61
Şekil 26. Sadece MB’sinin hücrelere etkisi.....	62
Şekil 27. Işığın tek başına prostat kanseri hücrelerine etkisi.....	63
Şekil 28. PCa hücrelerine yalnız ultrases uygulaması.....	64
Şekil 29. PCa hücrelerine uygulanan PHa-aracılı Sonodinamik tedavinin hücrelere etkisi.....	65
Şekil 30. PCa hücrelerine uygulanan MB-aracılı Sonodinamik tedavinin hücrelere etkisi.....	65
Şekil 31. PHa-aracılı Fotodinamik tedavinin prostat hücrelerine etkisi.....	66
Şekil 32. MB-aracılı Fotodinamik tedavinin prostat kanseri hücrelerine etkisi.....	67
Şekil 33. PCa hücre dizinlerinde kontrol, PHa ve tüm tedavilerin etkisi.....	68
Şekil 34. PC3 hücrelerinde kontrol, PHa ve tedavi gruplarının morfolojik görüntüleri.....	68
Şekil 35. LNCaP hücrelerinde kontrol, PHa ve tedavilerin morfolojik görüntüleri.....	68
Şekil 36. PCa hücrelerinde kontrol, MB ve tüm tedavilerin hücre canlılığına etkisi.....	69
Şekil 37. PC3 hücrelerinde kontrol, MB ve tedavi gruplarının morfolojik görüntüleri.....	69
Şekil 38. LNCaP hücrelerinde kontrol, MB ve tedavilerin morfolojik görüntüleri.....	69
Şekil 39. PC3 hücrelerinde kontrol, PHa ve tedavi gruplarının HOPI görüntüleri.....	71

Şekil 40. LNCaP hücrelerinde kontrol, PHa ve tedavilerin HOPI görüntüleri.	72
Şekil 41. PCa hücrelerinde PHa-aracılı tedavilerin apoptotik oranı.	72
Şekil 42. PC3 hücrelerinde MB-aracılı tedavilerin HOPI görüntüleri.	74
Şekil 43. LNCaP hücrelerinde MB aracılı tedavilerin HOPI görüntüleri.	75
Şekil 44. PCa hücrelerinde MB-aracılı tedavilerin apoptotik hücrelerin oranı.....	75
Şekil 45. PCa hücrelerinde PHa-aracılı tedavi gruplarının western blot sonuçları.	76
Şekil 46. PCa hücrelerinde PHa-aracılı tedavilerin western blot grafikleri	77
Şekil 47. PCa hücrelerinde MB-aracılı tedavilerin western blot sonuçları	78
Şekil 48. PCa hücrelerinde MB-aracılı tedavilerin western blot grafikleri.....	79
Şekil 49. PCa hücrelerinde PHa aracılı tedavilerin Wnt yolağı RT-PCR sonuçları	81
Şekil 50. PCa hücrelerinde MB-aracılı tedavilerin Wnt yolağı RT-PCR sonuçları.....	83

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Yaş göre Normal PSA değerleri.	7
Tablo 2. Fotodinamik tedavide kullanılan ışık kaynakları.	22
Tablo 3. Klinik olarak uygulanan fotosensitif ajanlar.	30
Tablo 4. Hücre kültüründe kullanılan malzemeler	39
Tablo 5. Hücre kültüründe kullanılan cihazlar	40
Tablo 6. Çalışmada kullanılan deney grupları.....	45
Tablo 7. Üst ve alt jellerin hazırlanması için gereken malzemeler ve oranları.	49
Tablo 8. cDNA sentezinin ilk aşaması için hazırlanan karışımın içeriği ve hacimleri	54
Tablo 9. cDNA sentezinin ikinci aşaması için eklenen solüsyonlar ve hacimleri	54
Tablo 10. Ekspresyon analizi için gerekli karışımın hazırlanması.....	55
Tablo 11. RT-PCR analizi için kullanılan gen dizileri.....	56
Tablo 12. Süperoksit dismutaz kitine uygun olarak hazırlanan örnekler	57
Tablo 13. Glutatyon aktivitesi ölçümü için kullanılan reaksiyon/standart eğri şeması.....	59
Tablo 14. PHa aracılı tedaviler sonrası PCa hücrelerindeki biyokimyasal değişimler.	84
Tablo 15. MB aracılı tedaviler sonrası PCa hücrelerindeki biyokimyasal değişimler.	85

ÖZET

PROSTAT KANSERİ HÜCRE DİZİNİNDE FOTODİNAMİK VE SONODİNAMİK TEDAVİLERİN ETKİSİ

Aksel M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Programı Doktora Tezi, Aydın, 2019.

Bu çalışmanın amacı, prostat kanseri tedavisinde metilen mavisi veya fiyorbid a-aracılı sonodinamik, fotodinamik ve sonofotodinamik tedavilerin olası antitümör etkilerinin ve etki mekanizmalarının *in vitro* incelenmesidir. Sonodinamik ve sonofotodinamik tedaviler yeni tür noninvaziv yöntemler olup kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda, tedavilerin hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile apoptotik morfolojik değişimler hoechst/propidiyum iyodid boyamayla, apoptotik yolda ve wnt sinyal yolağında bulunan proteinlerin miktarları western blot yöntemiyle ve bu yollardaki proteinlerin gen düzeyindeki ekspresyonlarına etkileri RT-PCR analizi ile incelenmiştir. Ayrıca, tedavi sonrası hücrelerdeki reaktif oksijen türlerinin miktarı ile antioksidan sistemlerdeki değişimler biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Sonuçlara göre tek başına ışık veya ultrases uygulamasının kontrole nazaran hücre canlılığına etkisi yokken, uygulanan tedavilerin hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, kontrol hücrelerine nazaran tedavi gruplarında apoptotik hücrelerin sayısının önemli oranlarda arttığı gözlenmiştir. Uygulanan tedavilerin hücrelerde kaspaz-8, kaspaz-3, Parp ve Bax proteinlerinin seviyelerinde artışa, kaspaz-9 ve bcl2 protein seviyelerinde azalmalara yol açtığı gözlenmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre wnt sinyal yolağındaki proteinlerin gen düzeyinde ekspresyonlarının uygulanan tedavilerle değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca, uygulanan tedavilerin prostat kanser hücrelerinde ROS ve MDA seviyelerinde artış, GSH, CAT ve SOD seviyelerinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak prostat kanseri tedavisinde sonodinamik, fotodinamik ve sonofotodinamik tedavilerin umut verici etkilere sahip olduğu ve bu etkilerin hücre içi ROS miktarı ile indüklenen apoptoz ve wnt yolağı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik Tedavi, Fiyorbid a, Metilen Mavisi, Prostat Kanseri, Sonodinamik Tedavi.

ABSTRACT

THE EFFICIENCY OF PHOTODYNAMIC AND SONODYNAMIC THERAPIES ON PROSTATE CANCER CELL LINES

Aksel M. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Biophysics Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2019.

This study aims to investigate the antitumor effects and possible mechanisms of methylene blue and pheophorbide a-mediated photodynamic, sonodynamic and sonophotodynamic therapies on prostate cancer cell lines *in vitro*. Sonodynamic and sonophotodynamic therapies are new noninvasive methods and may occupy an important area in cancer therapy. Regarding this aim, cell viability was examined by MTT test, apoptotic morphological changes by hoechst/propidium iodide staining, the amount of the proteins in the apoptotic and Wnt signalling pathway by western blotting method and Wnt protein expression levels by RT-PCR method. Furthermore, reactive oxygen species levels and antioxidant changes after treatments in cells were investigated by using biochemical methods.

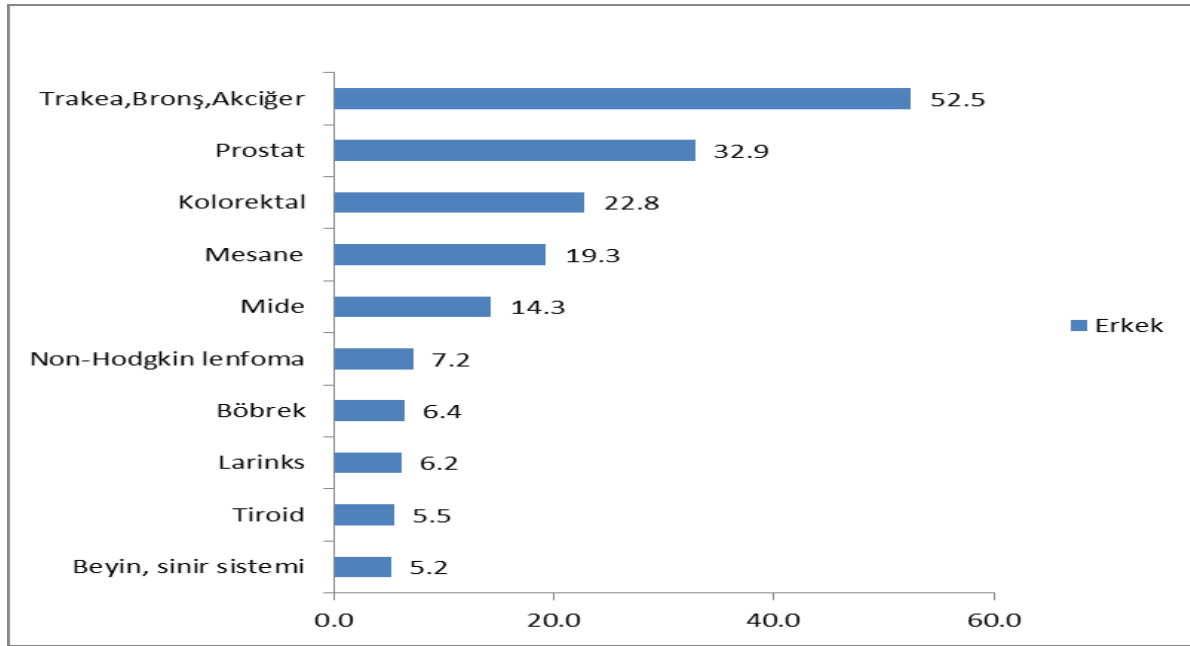
According to the results, light or ultrasound application had no effect on cell viability compared to control, while treatments were found to reduce cell viability. Besides, there was a significant increase in the apoptotic cell populations in treatment groups compared with the control group. After photodynamic, sonodynamic and sonophotodynamic treatments, caspase-8, caspase-3, Parp and Bax protein levels were increased however caspase-9, and Bcl2 levels were decreased. Wnt protein gene expression levels also changed in treatment groups. Moreover, treatments led to an increase in ROS and MDA levels, but a decrease in GSH, CAT and SOD levels. In conclusion, it has been shown that sonodynamic, photodynamic and sonophotodynamic treatments have promising effects in the treatment of prostate cancer and these effects are associated with intracellular ROS induced apoptosis and could be related with Wnt pathway.

Keywords: Methylene Blue, Pheophorbide-a, Photodynamic Therapy, Prostate Cancer, Sonodynamic Therapy.

1. GİRİŞ

Kanser; bir hücre veya hücre grubunun iç ve dış etmenler vasıtasıyla meydana gelen mutasyonlar sonucunda hücrelerin kontrolsüz büyüüp çoğalması ve damar veya lenf sistemi aracılığıyla çevre organlara veya vücuda yayılmasıyla karakterize edilen karmaşık bir hastalık türüdür. Kanser hücreleri normal hücrelerle kıyaslandığında farklı kimyasal, yapısal, metabolik ve biyofiziksel farklılıklar gösterirler. Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi de bu biyokimyasal, biyofiziksel, moleküler ve hücresel düzeyde değişimlerin gerçekleşmesi sonucu meydana gelir (Alves, 2016). Bu olayların gerçekleşmesinde hem çevresel (sigara, kimyasallar, radyasyon maruziyeti ve enfekte organizmalar) hem de hücre içindeki faktörler (kaltımsal mutasyonlar, hormonlar, immün sistem) önemli rol oynar. Söz konusu faktörler tek ya da birlikte etki ettiğinde anormal hücre davranışlarına ve yüksek seviyelerde proliferasyonlara neden olmaktadır. Bu olaylar neticesinde kanser hücreleri büyümeyi inhibe edici sinyallerden ve apoptozdan kaçarak, sınırsız replikasyon potansiyeli ve metastaz yeteneği kazanırlar. Başka bir ifadeyle normal hücreler bölünüp bölünmemesinin gerekliliği, diğer hücrelere farklılaşması ya da ölmesi gerektiğini bildiren sinyallere yanıt verirken, kanser hücreleri ise gelen bu sinyallere otonom cevaplar geliştirerek kontrolsüz çoğalır veya büyürler. Eğer bu çoğalma devam eder ve yayılma gözlenirse o zaman kanser daha ölümcül hale gelmektedir (Rianna ve ark, 2017).

Kanser, Dünyada en ciddi ve en önemli sağlık problemleri arasındadır ve ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 verileri dikkate alındığında Dünya'da 9,6 milyon insanın kanser nedeniyle öldüğü bildirilmiştir. Bu tabloda prostat kanseri %7.1 oranı ile üçüncü sırada yer almaktadır (Bray ve ark, 2018). Ülkemizde de benzer oranlar söz konusudur. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı tarafından (2019) internet sayfasında yayınlanan kanser verilerine göre ülkemizdeki kanser insidansları değerleri göz önüne alındığında prostat kanserinin erkeklerde ikinci sırada olduğu gösterilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Türkiye’de 2014 yılına ait erkeklerde en sık gözlenen 10 kanser türünün insidans hızları. (https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html_17.05.2019).

Erkeklerde prostat kanseri insidansının yüksek oranda olmasına rağmen prostat kanserinin metastazı ve patogenezi tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Benedettini ve ark, 2008). Prostatta kanser gelişiminin altında yatan mekanizmalar halen yürütülen çalışmalarda araştırılmaktadır. Prostat kanseri tedavisinde farklı yöntemler kullanılmaktadır ancak, mevcut yan etkiler sebebiyle alternatif yöntemlerin arayışı devam etmektedir.

Görünür ışık ve fotosensitif ajanın birlikte kullanıldığı fotodinamik tedavi ile ultrases ve sonosensitif ajanın birlikte kullanıldığı sonodinamik tedavi ve bu iki tedavinin birlikte kullanıldığı sonofotodinamik tedavi uygulamaları prostat kanserinde alternatif olarak klinikte kullanılma potansiyelleri bulunmaktadır (Wang ve ark, 2019; Wu ve ark, 2018; Kenyon ve Fuller, 2011).

Bu çalışmada prostat kanser hücre hatları olan hızlı metastatik özellikli PC3 hücre hattı ile daha yavaş çoğalan androjene bağımlı özellikli LNCaP hücre hattı kullanılmıştır. *In vitro* deney modelinde, hem fotosensitif hem de sonosensitif özellik gösteren fiyorbidler grubunda yer alan fiyorbid a ile fenotiazin boyalar grubunda yer alan metilen mavisinin fotodinamik, sonodinamik ve sonofotodinamik tedavilerin etkisi ile moleküler ve biyokimyasal etki mekanizmalarının incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri

Heterojen bir karaktere sahip olan prostat kanseri, prostat bezindeki hücrelerdeki sinyalizasyonun bozulması neticesinde hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla meydana gelmektedir. Prostat kanseri, Dünya genelinde erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almakla birlikte yaş ilerledikçe de görülme sıklığı artan bir kanser türüdür. Prostat kanserinin hemen hemen tüm türleri adenokarsinomadır ve prostat bezindeki prostat sıvısını üreten hücrelerden türemektedir.

2.1.1. Prostat Anatomisi


Erkek genital sistemin en büyük aksesuar bezi olan prostat, derin pelviste yerleşik kapsülle koni şekilli, kırmızı renkli, sıkı dokulu, sert kıvamlı kestaneye benzer bir organdır. Pelvis boşluğunda yer almakla birlikte prostatın anatomik yeri rektum'un önünde, ürogenital diyaframın yukarısında, symphysis pubica'nın arkasında ve mesanenin aşağısında bulunmaktadır. Bununla birlikte prostat bezi erişkin bir erkekte yaklaşık 4 cm genişliğinde, 3 cm uzunluğunda, 2 cm kalınlığında ve yaklaşık 20 gram ağırlığındadır (Lee ve ark, 2011). Prostat, embriyolojik olarak üretranın mukoza ve kas tabakasından köken aldığından dolayı büyük bölümünü bez dokusu, daha küçük bölümlerini ise kas ve bağ dokusu oluşturmaktadır. (Kaplan ve Elhan, 2014). Prostat facies posterior, facies anterior ve facies inferolateralis olmak üzere üç yüze sahiptir (Yıldırım, 2005). Prostat aynı zamanda transizyonel zon, santral zon, perifer zon olmak üzere üç kısma ayrılmaktadır. Bu bölgeler histolojik, fizyolojik ve biyolojik fonksiyonlarının farklı olması nedeniyle farklı embriyolojik orijinlere sahiptir. Prostat kanserinin gelişimi de yüksek oranda periferel zonda gerçekleşmektedir (Lee ve ark, 2011). Prostatın histolojik olarak en önemli özelliği elastik fiber ve düz kasların karışımından oluşan fibromuskuler stroma yapısıdır. Bu yapı içerisinde 30 ile 50 tane arasında tübuloalveolar bezden meydana gelmektedir ve bu bezler de mukozal, submukozal ve periferik olmak üzere üç tabakadan ibarettir. Mukozal tabaka bezleri direkt olarak üretraya

salgıllama yaparken, esas prostatik bezleri içeren periferik tabaka ve submukozal tabaka ise üretranın posteriyor duvarındaki krista üretralisin her iki yanında yer alan prostatik sinüslere açılan kanallara sahiptir (Ross ve Pawlina, 2014). Prostatın başlıca görevi semen içerisindeki sperm hücrelerini koruyan ve hücrelerin beslenmesini sağlayan bir sıvı üretmektir. Böylece oluşan spermin kadın üreme sistemi içerisinde kolaylıkla ilerlemesini ve fertilizasyonun kolaylaştırılmasına olanak sağlar (Gervasi ve Visconti, 2017).


2.1.2. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Prostat kanseri tüm Dünya’da erkeklerde tanısı en sık konulan ve kanserin neden olduğu ölümlerde ikinci sırada yer alan bir kanser türü olup görülme sıklığı da ileri yaşlarda arttığı bilinen bir gerçektir (Humphrey ve ark, 2016). Prostat kanserinin klinik heterojenliği nedeniyle hastalığın epidemiyolojisi oldukça karmaşıktır (Lee ve ark, 2017). Son yıllarda yapılan çalışmalar prostat kanserinin öneminin tüm Dünyada arttığını göstermiştir (Haas ve ark, 2008). Prostat kanseri görülme insidansı yaşa bağlı artmakla birlikte kanserin insidansının ve mortalitesinin farklı coğrafi bölgelere ve ülkelere göre farklılıklar gösterdiği, buna göre en düşük insidansın Çin ve Japonya, en yüksek insidansın ise İskandinav ülkeleri ve Amerika’da olduğu bilinmektedir (Quinn ve Babb, 2002). 1900’lü yılların ikinci yarısında uygulanmaya başlanan prostat spesifik antijen (PSA) testi sayesinde hastalığın teşhisi kolaylaşmış bu sayede hastalığın insidansında önemli derece artış olduğu görülmüştür (Kvale ve ark, 2007). Bu tanı yöntemleri sonucunda Amerikan Kanser Topluluğunun 2018 yılı için Birleşik Devletlerde 1,735,350 yeni vakanın görüleceğini, yaklaşık 609,640 kişinin de bu hastalıktan öleceğini tahmin edilmektedir (Siegel ve ark, 2018) (Şekil 2). Türkiye için de benzer durum söz konusudur. Ülkedeki erkeklerde en sık tanı alan kanser türleri arasında prostat kanseri ikinci sırada yer almaktadır (Yılmaz ve Sarıkaya, 2017).

Tahmin edilen yeni vaka sayısı

Prostat	164,690	19%		Meme Kanseri	266,120	30%
Akciğer	121,680	14%		Akciğer	112,350	13%
Kolon	75,610	9%		Kolon	64,640	7%
Üriner Sistem	62,380	7%		Rahim	63,230	7%
Melanoma	55,150	6%		Tiroid	40,900	5%
Böbrek & renal pelvis	42,680	5%		Melanoma	36,120	4%
Lemfoma	41,730	5%		Lemfoma	32,950	4%
Ağız boşluğu & farinks	37,160	4%		Pankreas	26,240	3%
Lösemi	35,030	4%		Lösemi	25,270	3%
Karaciğer	30,610	4%		Böbrek & renal pelvis	22,660	3%
Tüm organlar	856,370	100%	Tüm organlar	878,980	100%	

Tahmini Ölümlerin Sayısı

Akciğer	83,550	26%		Akciğer	70,500	25%
Prostat	29,430	9%		Meme	40,920	14%
Kolon	27,390	8%		Kolon	23,240	8%
Pankreas	23,020	7%		Pankreas	21,310	7%
Karaciğer	20,540	6%		Yumurtalık	14,070	5%
Lösemi	14,270	4%		Rahim	11,350	4%
Özofagus	12,850	4%		Lösemi	10,100	4%
Üriner Sistem	12,520	4%		Karaciğer	9,660	3%
Lemfoma	11,510	4%		Lemfoma	8,400	3%
Böbrek & renal pelvis	10,010	3%		Beyin & sinir sistemi	7,340	3%
Tüm organlar	323,630	100%	Tüm organlar	286,010	100%	

Şekil 2. 2018 yılı Amerikada cinsiyete göre tahmin edilen kansere bağlı ölüm oranları ve kanser görülme sıklıkları (Siegel ve ark, 2018).

Prostat kanserinin etyolojisi ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen hastalığın kesin nedeni hakkında net bir bilgi bulunamamıştır. Bununla birlikte hastalığın görülmesinde hem çevresel faktörlerin hem de genetik faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir. En önemli risk faktörleri arasında yaş, ırk, genetik yatkınlık, diyet, sigara ve alkol kullanımı yer almaktadır (Gann, 2002).

Prostat kanserinin görülme sıklığı yaşla birlikte artış göstermektedir. Özellikle 50 yaşın üstündeki erkeklerde hem görülme sıklığı hem de hastalığa bağlı ölüm oranının daha yüksek oranlarda olduğu belirlenmiştir (Bostwick ve ark, 2004). Hastalığın en sık tanı aldığı yaş aralığı 55-70 dir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar 40 yaşın altındaki bireylerde prostat kanseri tanısı oranı 1/10.000 iken bu oran yaş ilerledikçe hızla düşmektedir. Örneğin 40-59 yaş aralığında bu oran 1/38, 60-69 yaş aralığında ise 1/15'e kadar artış göstermektedir (Rentsch ve ark, 2009).

Prostat kanserinin etyolojisinde bir diğerk önemli etken de etnik özellikler ve çevresel faktörlerdir. Literatür taraması sonucunda Uzakdoğulu erkeklerde prostat kanseri görülme sıklığı en düşük düzeyde olduğu belirtilmiş, özellikle Afrika kökenli Amerikalı kişilerde ise bu oranın en yüksek düzeylerde olduğu ifade edilmiştir (Verma ve ark, 2011). Başka bir deyişle Amerika'daki erkeklerin PCa'ne yakalanma riski %17 iken Çin'de yaşayan erkekler için ise bu oranın %2 olduğu ifade edilmiştir. Ancak bir Çinli erkeğin batı yemek kültürünün ön planda olduğu bir yerde yaşadığında, prostat kanserine yakalanma riski de artmaktadır (Ito, 2014). Bu durum prostat kanseri insidansında diyetinde önemli olduğunun göstergesidir. Zira yapılan çalışmalar yüksek oranda yağ içeren besin tüketiminin prostat kanserinin gelişmesine katkı sağladığına işaret etmesine karşın, (Sebastiano ve Mourtzakis, 2014), bu görüşü kabul etmeyen yaklaşımlar da mevcuttur (Park ve ark, 2007).

Prostat kanserinin görülme sıklığında ailesel öykünün ve genetik faktörlerin oldukça etkili olduğu bilinen bir gerçektir. Elde edilen kaynakça verilerinde, aile öyküsü olan ya da genetik yatkınlığı bulunan bireylerde prostat kanseri görülme sıklığının daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Prostat kanserinin oluşumunda genetik faktörlerin rolünün %40 civarlarında olduğu belirtilmektedir (Bratt, 2002). Ayrıca yapılan çalışmalarda prostat kanseri tanısı konulan hastaların yaklaşık %18'inde aile öyküsünün etkin olduğu gözlenmiştir (Roemeling ve ark, 2006). Ailesel kanser hikâyesi olan bireylerde yapılan çalışmalarda 1.kromozom, 17.kromozom ve X kromozomunda gensel etkenler saptanmıştır. Bu bağlamda Rubin ve arkadaşları kromozal bozuklukların da hastalığın görülmesinde etkili olduğunu, özellikle 7p, 7q, 8q, Xq, 8p, 10q, 13q ve 16q kromozom bölgeleri ile bağlantılı olabileceğini rapor etmişlerdir (Rubin ve De Marzo, 2004).

Tüm bu etkenlerin yanında beslenme tarzının hastalığın görülmesinde ilişkili olduğunu gösteren çalışmalara rastlamak mümkündür. Özellikle yağ oranı yüksek besinler ve kırmızı et tüketiminin, prostat kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Story ve ark, 1993).

2.1.3. Prostat Kanserinde Tanı

Prostat kanserinin tanısında kullanılan başlıca yöntemler arasında prostat spesifik antijen(PSA), parmakla rektal muayene (PRM) ve transrektal ultrasonografi TRUS metotları sayılmaktadır.

PSA, insan kallikrein gene ailesine ait bir tümör belirteçidir ve prostat kanserinin tanısında en sık kullanılan belirteçtir (Ayyıldız ve Ayyıldız, 2014). Prostat bezi normal

koşullarda PSA salgıerken hastalık durumunda PSA salgılama seviyesi 10 kat artabilmektedir (Duffy, 2011). İlk olarak 1979'lu yıllarda Wag ve arkadaşları prostat dokusunda PSA'dan bahsetmişler ve bu yıllardan sonra PSA etkin olarak tanıda kullanılmaya başlanmıştır (Wang ve ark, 1979). Bununla birlikte PSA değerlerinin yaşa bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Tablo 1) ve bu durum göz önüne alınarak tanı konmaya çalışılmakta ve gereksiz tedavilerin uygulanmasının önlenmesi amaçlanmaktadır (Nogueira ve ark, 2009).

Tablo 1. Yaş göre Normal PSA değerleri.

Yaş	Normal (ng/ml)
40-49	0-2,5
50-59	3,5
60-69	4,5
70<	6,5

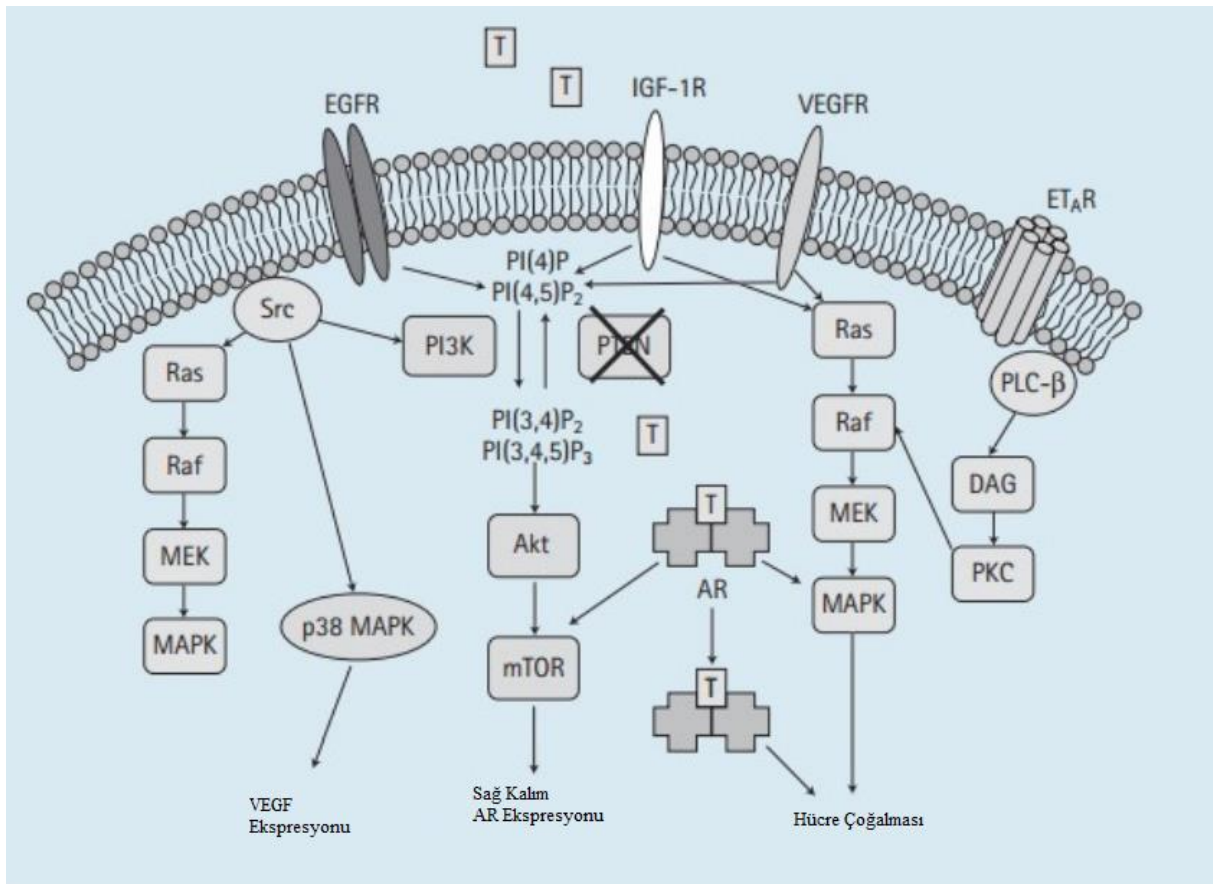
Prostat kanseri tedavisinde kullanılan bir diğer yöntem ise parmakla rektal muayene yöntemidir. Bu yöntemde rektal bölgenin hemen önünde yer alan prostat bezinin büyüklüğü ve sertlik durumunun incelenmesi söz konusudur. Bu yöntem tek başına prostat kanserinin tanısında kullanılmakla birlikte güvenilirliği tartışılır durumdadır (Ng ve ark, 2005).

Prostat kanserinin tanısında kullanılan TRUS yöntemi önemli bir görüntüleme yöntemidir. Bu yöntemin en önemli özelliği PRM ile belirlenemeyen birçok tümörün belirlenmesidir. Bu yöntem, hastalardan biyopsi alınarak inceleme yapılmasına olanak sağlar ve kanserin tanısında önemli bir yer tutar (Fei ve ark, 2017).

Prostat kanserinin evrenmesinde Gleason skoru, rektal muayene sonucu ve PSA'nın serumdaki konsantrasyonu dikkate alınarak, birincil tümörün durumu (T), lenf nodlarına yayılıp yayılmadığı (N) ve metastaz durumu (M) esas alınarak belirlenen TNM denilen sınıflama sistemi kullanılarak yapılmaktadır (Pienta ve Bradley, 2006).

2.1.4. Prostat Kanserinin Gelişimi ve Prostat Kanserinde Sinyal Yolakları

Prostat kanserinin heterojenik karakterli olması, hastalığın görülmesinde rol oynayan sinyal yolaklarının karmaşıklığı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Şekil 3). Bu yolakların arasında androjen (AR) sinyali (Lonergan ve Tindall, 2011), NF- κ B yolağı (Gasparian ve ark, 2002), PI3K-Akt (Toren ve Zoubeidi, 2014), EGFR sinyal yolağı (Chen ve ark, 2012) ve Wnt yolağı (Yamamoto ve ark, 2010) başlıca yolaklar arasındadır.



Şekil 3. Prostat kanserinde rol oynayan sinyal yolakları (Hacıbey, 2019)

Androjen reseptörü (AR) farklı dokularda eksprese olan ligand bağımlı transkripsiyon faktörüdür ve hem prostat hücrelerinin hem de prostat kanserinin gelişiminde oldukça önemlidir. AR'nün başlıca görevleri arasında hücrelerin büyüme çoğalmasının ve fizyolojik olarak işlevini yerine getirmesi yanı sıra cinseyete bağılı hücrel farklılaşmasına katkısı sayılabilir (Pienta KJ ve Bradley, 2006). AR'ünün başlıca ligandları, androjenler, 5 α -dihidrotestosteron (DHT) ve testosterondur. Bu ligandların bağlanması ile erkeklerde seksual gelişim ve spermatogenez, kemik mineral yoğunluğunun gelişimi gibi olaylar gerçekleşir

(Gaove ark, 2005). AR hedef genleri arasında PSA, FGF8, Cdk1, Cdk2, PMEPA1, Tmprss2 bulunur ve prostat kanseri tanısında kullanılan PSA'nın serumda yüksek düzeylerde görülmesi yine AR'nin aktivitesinin fazla olmasıyla ilişkilidir (Lonergan PE ve Tindall DJ, 2011). AR aktivasyonu üç mekanizma üzerinden gerçekleşir. Bunlardan birincisi klasik AR olarak bilinir ve androjen ligand bağlayıcı domainine bağlandıktan sonra aktive olur. Bu aktivasyon sonrasında AR çekirdek içine girer ve DNA bağlı domaine bağlanarak AR'üne özgün genlerin transkripsiyonuna neden olur (Eder ve ark,2001). İkinci olarak AR, sitozolde ikinci mesajcı yolağını tetikleyerek MAPK/ERK ve AKT yollarını ile birlikte diğer yolları aktive edebilir (Zarif ve Miranti, 2016). Son olarak da büyüme faktörleri (interlökin-6) üzerinden AR'nün ligandan bağımsız aktivasyonu sonucunda protein kinaz ve MAPK yolağının aktive edebilir (Kim ve Lee, 2009).

Önemli bir transkripsiyonel düzenleyici sınıfı içinde yer alan NF- κ B proteini; immün yanıt, enflamasyon, hücre çoğalması, hücre adezyonu, farklılaşması, hücre ölümü, oksidatif stres cevapları ve apoptozun inhibisyonu gibi pek çok biyolojik olayda rol oynarken aynı zamanda kanser ve diyabet gelişimiyle de ilişkilidir (Karin ve Greten, 2005; Vallabhapurapu ve Karin, 2009). NF- κ B'nin çekirdek seviyesinin artması sonucu prostat kanserinin oluşumuna önemli etkileri olduğu düşünülmektedir (Suh ve ark, 2002). Bu etkilerin görülmesinde ise NF- κ B'nin AR ekspresyonunu düzenlemesi oldukça önemlidir (Zhang ve ark, 2009). Yapılan diğer çalışmalarda bu yolağın prostat kanserinin ilerlemesi, kemoresistans ve metastatik yayılım gibi durumlarda da rol oynadığını göstermiştir (Lessard ve ark, 2005; Ismail ve ark, 2004).

PI3K/Akt sinyal yolağı eski zamanlardan bu yana insanlarda korunmuş en eski yollardan biridir. Bu yolak, hücre metabolik olayları, tümör gelişimini, tümörün büyümesi ve çoğalması ile metastazını düzenler. Bu yolak prostat kanseri hücrelerinin sağ kalımı ve proliferasyonu için de oldukça önemlidir (Toren ve Zoubeidi, 2014). Yine bazı çalışmalar bu yolağın AR yolağı ile etkileşimli olarak prostat kanseri hücrelerinde androjen duyarsızlığıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (Carver ve ark, 2011).

Epidermal büyüme faktörü, transmembran protein tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olup büyüme faktörü ve onun reseptörü, androjenler birlikte prostatın büyümesinde ve fonksiyonel işlevinde önemli bir role sahiptir (Shah ve ark, 2006). Ligandın reseptörüne bağlanmasıyla birlikte tirozin kinazlar fosforillenir ve PI3K/Akt/mTOR ve MAPK yollarını aktive eder. Bu durum hücrenin göçüne, çoğalmasına ve farklılaşmasına neden olmaktadır (Jorissen ve ark, 2003). Yapılan çalışmalar, EGFR'in aşırı ekspresyonu ya da EGFR ile ilişkili yolağın bozukluğu prostat kanseriyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Baek ve ark, 2012).

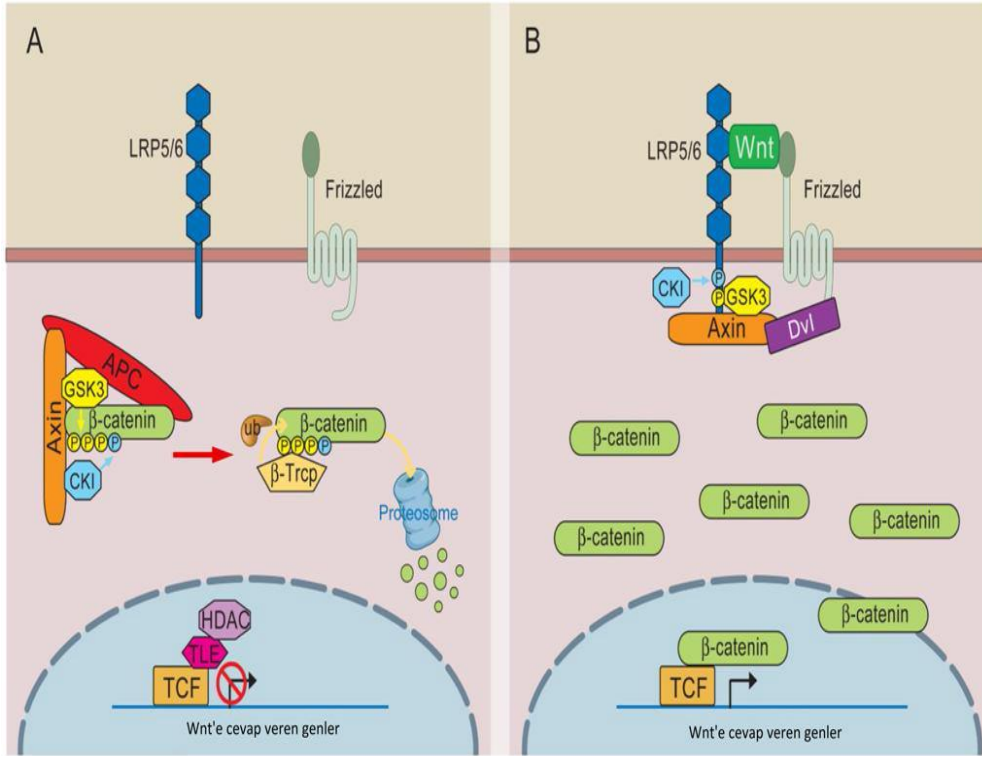
Prostat kanserinde önemli bir role sahip diğer bir yolak da Wnt sinyal yolağıdır. Wnt proteinleri; sisteince zengin bir glikoprotein olup, hücre adezyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücrenin çoğalması, farklılaşması, göçü gibi birçok hücrenel sürecin yanında tümör oluşumunda, apoptozis, sinaps oluşumu, adipogenezin inhibisyonu ve anjiyogenezin uyarılması gibi önemli biyolojik olaylarda da anahtar rol oynayan evrim süresince yüksek düzeyde korunmuş bir proteindir. Bu sinyal yolağı, wnt proteininin hücre zarındaki reseptörlerine bağlanması ile aktifleştikten dolayı bu isimle anılmaktadır. Organizmalarda tanımlanmış üç wnt sinyal yolağı bulunmaktadır. Bunlardan ilki hücre çoğalması, farklılaşması, adipogenez ve apoptozun düzenlenmesi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynayan β -katenine yolağıdır. Tanımlanan diğer iki yolak ise hücre kutuplaşmasının sağlanmasında görev alan PCP (düzlemsel hücre polaritesi) Wnt sinyal yolağı ile Wnt/Kalsiyum sinyal yolağıdır. Bu iki yolak birlikte standart olmayan (non-canonical) olarak isimlendirilmektedir.

β -katenin sinyal yolağı, hücre zarında bulunan reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Bu mekanizmanın sinyal molekülü wnt proteindir. Üretildiği embriyonik ve erişkin kök hücrelerden salgılanan bu protein hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanır. Bu başlangıç sinyali hücre içinde önemli fosforilasyonlara neden olur ve ekstraselüler bir sinyal, intraselüler hale gelerek bu şekilde sinyal hücre zarından sitozole aktarılır. Sitozolda bu sinyali karşılayan β -katenin, sinyal yolağında anahtar rol oynayan bir sitozol proteindir. Sinyalin sitozole aktarılmasıyla, bu mekanizmada görev alan birçok molekülde çeşitli değişiklikler (transkripsiyon faktörleri aktifleşir, c-myc, cyclin-D1, VEGF, c-jun, follistatin gibi birçok gen ifade olur) meydana gelir ve sonuçta da β -katenin proteini sitozolde birikir. Sitozolda biriken β -katenin, çekirdeğe geçer ve buradaki transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek sinyal yolunun hedef genlerinin ifadesinin aktivasyonuna neden olur. Eğer bu sinyal yolu kontrollü bir şekilde devam ederse, organizma için gerekli olan çoğalma, farklılaşma, hücre göçü gibi olaylar gerçekleşir.

Wnt proteinleri, hücre yüzeyinde bulunan Frizzled (FZD) reseptör ailesi ve LRP5/6 reseptör proteinlere bağlanırlar (Tamai ve ark, 2000). Bu proteinlerin Frizzled reseptörlerine ya da FZD/ LRP5-6 reseptörlerine bağlanmaları sonucunda üç farklı sinyal kaskadından birini aktifleştirir (Li ve ark, 2006). Bu kaskadlar; kanonikal Wnt sinyal yolağı (Rattner ve ark, 1997), kanonikal olmayan Wnt/PCP yolağı (Nusse, 1999) veya kanonikal olmayan Wnt/ Ca^{2+} (Kato, 2002) yolağı olarak adlandırılmaktadır.

Kanonik Wnt yolağının en önemli görevleri arasında programlı hücre çoğalması, hücre ölüm olayları, hücre farklılaşması, hücrenin akıbetinin belirlenmesi, gelişim ve neoplazinin başlaması ile devamındaki programlanmamış olayları düzenlemesinin yanı sıra (Lin ve ark, 2010; Nusse, 2005) β -kateninin sitoplazmik stabilitesini de kontrol ettiği bilinmektedir. Wnt proteinleri reseptörlerine bağlanmadığı durumda, β -katenin; Axin, APC, kazein kinaz 1 ve glikojen sentez kinaz 3 β proteinlerinden oluşan bir komplekse bağlı durumda kalır. Kazein kinaz 1 ve GSK3 β sırasıyla β -katenini N-terminal ucundan fosforiller. Fosforillenen β -katenin, E3 ubiquitin ligaz β -Trep tarafından tanınır ve proteozomal yıkıma uğrar. Bu durumda, TCF/LEF transkripsiyon faktörü, Groucho proteine bağlanır. Böylece TCF, Wnt sinyali yokluğunda β -kateninin hedef genlerinin aktif transkripsiyonel represörü olarak görev alır (Şekil 4) (MacDonald ve ark, 2009). Wnt ligandının yokluğunda β -katenin sitoplazmada birikir ve çekirdek içine girer. Burada DNA bağlayıcı bir protein ailesi üyesi olan lenfoit arttırıcı faktör1'e (T hücresi faktörü) bağlanır. İki birlikte c-MYC, siklin D1 gibi hedef genlerin transkripsiyon programını aktive eder. Bu durum wnt yolağının kanser oluşumundaki etkisini açıklamaktadır.

Wnt ligandı, FZD ve LRP5/6 reseptörüne bağlanınca, Dvl proteini plazma membranında tutularak (Sugimura ve Li, 2010) Kazein kinaz 1 ve PKC α , Dishevelled proteinlerinin fosforilasyonuna neden olur. Fosforillenen Dishevelled; Axinin, Axin-APC-GSK3 β kompleksinden ayrılır ve GSK3 β 'nin β -katenini fosforillenmesini engeller. Fosforillenmeyen β -kateninde yıkım gerçekleşmez ve sitoplazmada birikmeye başlar. Biriken β -katenin hücre nükleusuna geçerek, burada TCF/LEF ailesi transkripsiyon faktörleri ile bağlanarak, aralarında c-myc ve siklin D, VEGF'nin de bulunduğu birçok hedef genin transkripsiyonunu değiştirir (Şekil 4) (Badiglian ve ark, 2009).



Şekil 4. Wnt/β-katenin sinyal yolağı A) Wnt yokluğunda B) Wnt aktif iken meydana gelen olaylar (Peifer ve Polakis, 2000).

2.1.5. Wnt Sinyal İletisinde Rol Oynayan Başlıca Proteinler

2.1.5.1. Wnt proteinleri

Wnt proteinleri, doku bütünlüğünü, kök hücre üretimini, hücreyel çoğalmayı ve tümör baskılamayı içeren birçok biyolojik süreci kontrol eden salgılanmış proteinlerdir (Chien ve ark, 2009). Wnt proteinleri genellikle, Afrika pençeli kurbağası embriyosunda ikincil vücut eksenini oluşumunu sağlama ve belirli sinyal kaskatlarını aktive edebilme özelliklerine sahiptir. Bu proteinler, FZD membran reseptörü ve LRP5/6 yardımcı reseptörünün aktivasyonunu kolaylaştırır. Sonuçta bu aktivasyon kanonik Wnt/β-katenin yolağını etkinleştirir. Wnt5a sınıfında yer alan proteinler (Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a ve Wnt11) FZD membran reseptörüne bağlanarak kanonik olmayan sinyal yollarını aktifleştirirler. Wnt proteinleri üzerine yapılan çalışmalar bu proteinlerin çok çeşitli hücre içi yolları tetikleyerek fizyolojik değişikliklere sebep olduğunu göstermektedir (Heisenberg ve ark, 2000).

2.1.5.2. Frizzled proteinleri

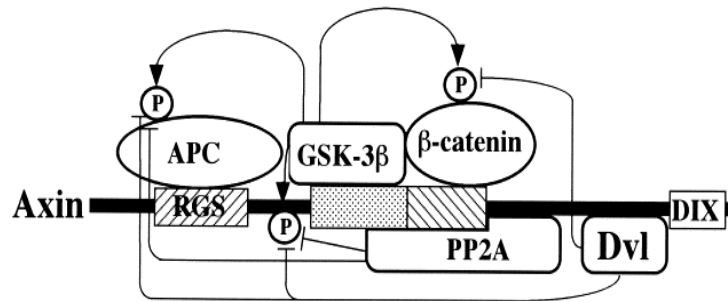
FZD proteinleri, G-protein aracılı reseptör proteini ailesinin bir üyesidir. FZD, wnt sinyalinde ve diğer sinyal yollarında reseptör görevi yapmaktadır. Hücre polarizasyonunun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptirler. Ayrıca embriyonik gelişim, doku ve hücre polarizasyonu, nöronal sinapsların oluşumu, hücre çoğalmasının düzenlenmesi için gereklidir. Bu proteinler süngerden insana kadar birçok canlıda tanımlanmıştır (Wang ve ark, 1996).

2.1.5.3. Lipoprotein-ilişkili reseptör proteinleri

LRP5/6 ve onların homoloğu membranı tek seferde geçen Wnt/ β -katenin sinyal iletimi için gerekli proteinlerdir (Pinson ve ark, 2000). LRP reseptörünün uzantısı, wnt sinyal yolağının uyarılması ile fosforillenerek Wnt/ β -katenin sinyal iletimini başlatır (Tamai ve ark, 2004). LRP'nin bu fosforilasyonu, Axinin bağlanmasını sağlar (Mao ve ark, 2001) ve bu durum GSK3 ve CK1 gamma olmak üzere iki protein kinaz tarafından düzenlenmektedir (Nusse, 2005).

2.1.5.4. Axin

Axin; APC, β -catenin ve GSK-3 β 'ya doğrudan bağlanarak, β -kateninin down-regülasyonunda merkezi bir rol oynamaktadır. Axin, N-terminal bölgesinde G protein sinyal iletim düzenleyici birimi içermekte olup, bu birim, APC proteini için bağlanma bölgesidir. Ayrıca axin, GSK-3 β , β -katenin, Dvl ve protein fosfataz 2A için bağlanma bölgelerine sahiptir (Peifer ve Polakis, 2000).



Şekil 5. Axinin yapısı ve axine bağlanan proteinler (Pecina-Slaus, 2010).

Şekil 5’de gösterildiği gibi axin, GSK-3 β tarafından β -kateninin fosforilasyonunu arttırmaktadır. Axin, β -katenini GSK-3 β çevresine yerleştirerek ve etrafında tutarak β -kateninin fosforilasyonunu kolaylaştırır. Axin ayrıca APC’nin GSK-3 β tarafından fosforilasyonunu da kolaylaştırmaktadır (Pecina-Slaus, 2010).

2.1.5.5. β - katenin

β -katenin, adheran bağlantıları oluşturan kadherin kompleksinin bir alt birimidir ve wnt sinyal yolağının en temel bileşenlerinden biridir. Bu bağlantılar, hücrenin gelişimini ve hücreler arası bağlantıları düzenleyerek epitel hücre tabakalarının oluşturulmasını ve sürekliliğini sağlar (Yochum ve ark, 2008). Wnt proteininin yokluğunda GSK3 β , β -katenin proteinini fosforiller ve GSK3 β ve APC ile kompleks olan axine bağlı durumda kalır. Bileşik durumda GSK3 β ’ün etkisini kolaylaştırarak β -kateninin fosforilasyonunun arttırır. β -katenin fosforillendiğinde hücre içinde yıkıma uğrar ve sitoplazmada birikmesi engellenir. Wnt ligandının FZD reseptörüne bağlanmasıyla β -katenin, Axin-APC-GSK3 β kompleksinden ayrılır GSK3 β tarafından fosforillenmesi inhibe olur. Böylece sitoplazmadaki β -katenin seviyesindeki artmanın neticesinde β -katenin çekirdeğe geçer. Bu geçiş ile TCF/LEF transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek c-myc, siklin D gibi belirli hedef genleri aktive etmek için TCF ve LEF ile etkileşir. β -kateninin onkogen olarak etki gösterebildiği düşünülmektedir (Wang ve ark, 2008).

2.1.5.6. APC

APC geni, farklı fonksiyonel domainleri ile çeşitli fetal ve yetişkin insan dokusunda eksprese edilirler. (Pecina-Slaus, 2010). APC proteini, ilk başta insan kolon kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak keşfedilmiştir. Bunun ardından proteinin, Wnt sinyalinde β -katenin’in kararlılığını artırdığı keşfedilmiştir (Polakis, 2000).

2.1.5.7. TCF/LEF

TCF/LEF, β -katenin aracılı gen regülasyonunun önemli bir bileşeni olup DNA bağlayan transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila*'da tek TCF geni bulunurken memelilerde Tcf-1, Tcf-3, Tcf-4 ve Lef-1 olmak üzere dört üyesi bulunmaktadır (Panhuysen ve ark, 2004). Wnt sinyali yokluğunda, Tcf proteinleri, hedef genlerin promotör ve kuvvetlendirici dizileriyle etkileşerek, DNA'nın eğilerek katlanmasına neden olur. β -katenin yokluğunda TCF, histon deasetilasyonunu ve kromatin yoğunlaşmasını teşvik eden represör protein Groucho ile etkileşerek gen ekspresyonunu baskılar (Niemann ve ark, 2002). β -katenin nukleusa hücre içine girdikten sonra, TCF'nin N-terminal ucuna bağlanır ve TCF'yi transkripsiyonel aktivatör olarak uyarır (Zechner ve ark, 2003). β -katenin, Groucho eş-baskılayıcısını Tcf'den ayırarak ve wnt hedef genlerinde bölgesel kromatin yapısında değişiklikler yapabilecek çeşitli proteinleri bir araya getirerek sağlar (Junghans ve ark, 2005).

2.1.5.8. Glikojen sentaz kinaz 3

GSK3 proteinleri glukoz metabolizmasında görev alan serin/treonin kinazlardır. Memelilerde, GSK3 α ve GSK3 β olmak üzere iki izoform eksprese etmektedirler. (Wada, 2009). GSK3'lerin, aralarında wnt sinyal yolağının da bulunduğu çeşitli sinyal yolaklarında, önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (Ali ve ark, 2001). Bir çok çalışmada GSK3 düzen bozukluğunun başta obezite olmak üzere diyabet, enflamasyon, nörolojik bozukluklar ve tümör oluşumu gibi birçok patolojik durumlara neden olmaktadır (Wada ve ark, 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda GSK3'ün nörogenez, nöronal migrasyon, nöronal polarizasyon ve akson büyümesi gibi süreçlerde de anahtar düzenleyici enzim olduğu gösterilmiştir (Hur ve Zhou, 2010). GSK3'ün alt ürünleri; cyclic AMP response element, Nuclear Factor activated T cells protein ailesi, neurogenin 2, SMAD1, c-Jun ve β -katenin gibi birçok transkripsiyon faktörüdür. GSK3, bu transkripsiyon faktörlerini, onların protein seviyelerini, DNA bağlama aktivitelerini ve nükleer lokalizasyonlarını değiştirerek kontrol eder. Bu faktörlerden birçoğu β -kateninde olduğu gibi, GSK3 ile fosforile edildikten sonra proteozomal yıkıma uğrar (Grimes ve Jope, 2001).

2.1.5.9. Dishevelled

Wnt sinyal iletiminde anahtar görev oynayan Dishevelled (Dvl) proteini, wnt sinyalini, reseptörlerden efektörlerine aktarır. Dvl proteini, wnt sinyal iletimi ve embriyogenezdeki önemi bildirilmiştir. Kanonikal Wnt yolağında, dishevelled proteinleri, FZD reseptör tarafından alınır ve sitozolik β -katenin yıkılımını önler (Wallingford ve Habas, 2005).

2.1.5.10. Wnt sinyali ile apoptozun ilişkisi

Wnt sinyal yolağının wnt-BMP sinyalizasyonu, SFRP2 (secreted FZD-related protein-2) gen ekspresyonu, β -catenin, GSK3 β -NF- κ Beta, c-Jun N-terminal kinaz sinyali veya gen Dickkopf-1, NEMO, tau, sox 10'un ekspresyonu gibi farklı mekanizmalar üzerinden apoptozu düzenlediği bildirilmiştir (Li ve ark, 2006; Crowder ve Freeman, 2000; Ellies ve ark, 2000). Hücrelerin büyümesinde, wnt sinyal iletimi var olan çevresel uyaranlara bağlı olarak apoptozu kolaylaştırır veya engeller (Ellies ve ark, 2000). Bu bağlamda en çok araştırılan wnt1, apoptoz sürecinin kontrolü ile ilişkilendirilmektedir (Chen ve ark, 2001). Wnt1 ekspresyonundaki artış β -katenin, siklooksigenaz ve 'Wnt1 induced secreted protein' (WISP-1) sinyalinin tetiklenmesine neden olur. Bu durum hücrelerin c-myc ile tetiklenen apoptozdan korunmasına neden olur (You ve ark, 2002). Wnt1, kaspaz-9 aktivitesini inhibe ederek apoptozu baskılayabilmektedir (Chen ve ark, 2001). APC geni de apoptozu düzenleyen başka bir faktördür. APC, β -katenin seviyesini düşürerek, Tcf/Lef transkripsiyon faktörlerinin down regülasyonuna neden olur. Tcf/Lef aktivasyonu olmadan, APC, kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9 aktivasyonuna neden olarak, bu proteinler aracılığıyla poli ADP-Riboz polimeraz (PARP) ile apoptoza neden olur (Chen ve ark, 2003). Wnt antagonistleri de ayrıca Wnt-FZD sinyal yolağının baskılanması aracılığıyla apoptozu tetiklemektedir (Mirkovic ve ark, 2002). Dkk-1'in dışarıdan etkisiyle Wnt-FZD sinyalinin engellenmesinin apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Glinka ve ark, 1998). Diğer benzer çalışmalar, wnt sinyal yolağının, NF- κ B sinyalinin aktifleştirilip GSK3 β proteinini inhibe ederek apoptoz sürecini kısıtladığını ve sağ kalımı artırdığını göstermektedir (Bournat ve ark, 2000).

2.1.6. Prostat Kanserinde Tedavi Yöntemleri

Prostat kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan yöntemler arasında gözlem altında tutma, cerrahi uygulama, radyasyon tedavisi, hormon tedavisi, kriyocerrahi ve HIFU (yüksek şiddette odaklanmış ultrases) tedaviler yer almaktadır. Bu tedavilerin uygulanmasında hastalığın evresi ya da tümörün durumu, hastanın yaşı, diğer önemli sağlık durumları belirleyici olmaktadır.

Gözlem altında tutma yöntemi, yapılan tetkik ve incelemeler doğrultusunda düşük riskli hastalar için kullanılan bir yöntemdir. Bu uygulama ile belli periyotlarda PSA ve PRM yapılarak hastalığın ilerlemesini ve erken bulguların saptanması amaçlanmaktadır ancak hızlı gelişen tümörler için bu yöntem yetersiz kalmaktadır (Cooperberg ve ark, 2011).

Prostat kanserinde kullanılan bir diğer tedavi yöntemi radikal prostatektomi yöntemidir ve hastalığın tedavisinde kullanılan ilk ve standart yöntemlerden biridir. Radikal prostatektomi üretra ve mesane arasındaki tüm prostat dokusunun ve seminal vezikülleri içeren çevre dokunun alınmasıdır. Bu yöntem, laparoskopik, robotik, retropubik ve perineal olarak uygulanabilmektedir. Radikal prostatektomi cerrahi bir yöntem olduğundan hastaların iyileşme süresi diğer alternatif tedavi yöntemlere göre daha uzundur. Ayrıca hastaların yaklaşık %70'inde erektil fonksiyonlarda azalma olması da tedavinin bir diğer dezavantajıdır. Ancak laparoskopik radikal prostatektomide bağırsak yaralanmaları, bazı organların hasar görmesi ve uzun süreli tıkanmalarla karşı karşıya kalınabilmektedir. Ayrıca cerrahi müdahaleler sonucunda hastalarda ciddi kanama sorunları, rektum yaralanması, derin ven trombozu gibi sorunlar ile karşılaşmak da olasıdır (Stolzenburg ve ark, 2009; Rassweiler ve ark, 2001; Srinualnad ve Udompunterak, 2007).

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan radyasyon terapisi lokalize prostat kanseri hastaları için kullanılmakta ve bu tedavi ile tümör hücrelerinin ölmesi ya da tümörün küçülmesi amaçlanmaktadır (Cooperberg ve ark, 2010). Prostat kanseri tedavisinde kullanılan iki tür radyasyon tedavisi bulunmaktadır. Eksternal ışın tedavisinde hastaya dış kaynaklı radyasyon verilir. Brakiterapi yönteminde ise tohum olarak isimlendirilen küçük radyoaktif çekirdeklerin prostat dokusuna yerleştirilmesiyle düşük dozda ve sürekli kullanılmasıyla mümkün olur. Ancak bu tedavi sırasında mesane ve rektum da yüksek doz etkisi nedeniyle bazı komplikasyonlara neden olabilmektedir (Rios ve ark, 2017).

Prostat kanserinin başlangıç evrelerinde kanser hücrelerinin gelişiminde androjen önemli bir rol oynamasından dolayı ileri derece prostat kanseri hastalarında hormon tedavisi önemli bir seçenek haline gelmiştir. Bu tedavi ile prostat hücrelerinin androjene bağımlı

büyümelerini sağlamaktadır. Androjen yoksunluk olarak isimlendirilen bu yöntemde androjene bağımlı hücrelerde apoptotik yolların başlatılması ile sonuçlanır. Ancak çoğu hastada bu tedavi sonrasında kanser hücrelerinde androjene direnç kazanır ve bu agresif duruma geçiş hastanın ölümüne neden olmaktadır (Senthilmurugan ve ark, 2017).

Kriyocerrahi ya da kriyoterapi olarak adlandırılan bu yöntem ilk olarak 1940'lı yıllarda kullanılmaya başlanmış bir yöntem olmakla birlikte bu yöntem ile kanser hücrelerinin sıvı nitrojen yardımıyla ileri derecede soğutma ile kanseröz hücrelerin destrüksiyonu ve tümörlü dokuların hücre ölümü hücre membranı veya organellerin hasarı ile direk yoldan veya vasküler sıkışma ile indirek yoldan ölümü sağlanmaktadır (Rees ve ark, 2004; Baust ve Gage, 2005; Hoffmann ve Bischof, 2002). Kriyocerrahi sonrası hastalarda erektil ve üriner problemler ortaya çıkabilmekte, hatta bu yöntem sonrası impotans görülme eğiliminin çok yüksek olduğu belirtilmiştir (Ranjan ve ark, 2008).

Prostat kanseri tedavisinde özellikle T1-T2 evrede bulunan ve yaşları, genel durumları göz önüne alındığında prostatektomi ve cerrahi girişim için uygun olmayan hastalar için yüksek şiddette odaklanmış ultrasesin kullanıldığı HIFU yöntemi sıklıkla kullanılır. Bu yöntemde ultrases enerjisi endorektal bir prob vasıtasıyla iletilmektedir. Ultrases dalgaları rektal duvarı aşarak prostat dokusu üzerine odaklanırlar. Bu odaklanma işlemi ile hedef bölgede dokuda tahribatı oluşturulmaktadır. Ancak bu yöntem de impotans ve inkontinans potansiyeline sahiptir (Crouzet ve ark, 2014). Tüm bu yan etkiler göz önüne alındığında prostat kanseri tedavisi için kullanılacak yan etkisi minimize edilmiş alternatif ya da yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulması su götürmez bir gerçektir. Fotodinamik ve sonodinamik tedaviler bu bağlamda kanser tedavisinde heyecan uyandıracak ümit vaat eden yöntemler arasında olduğu düşünülmektedir.

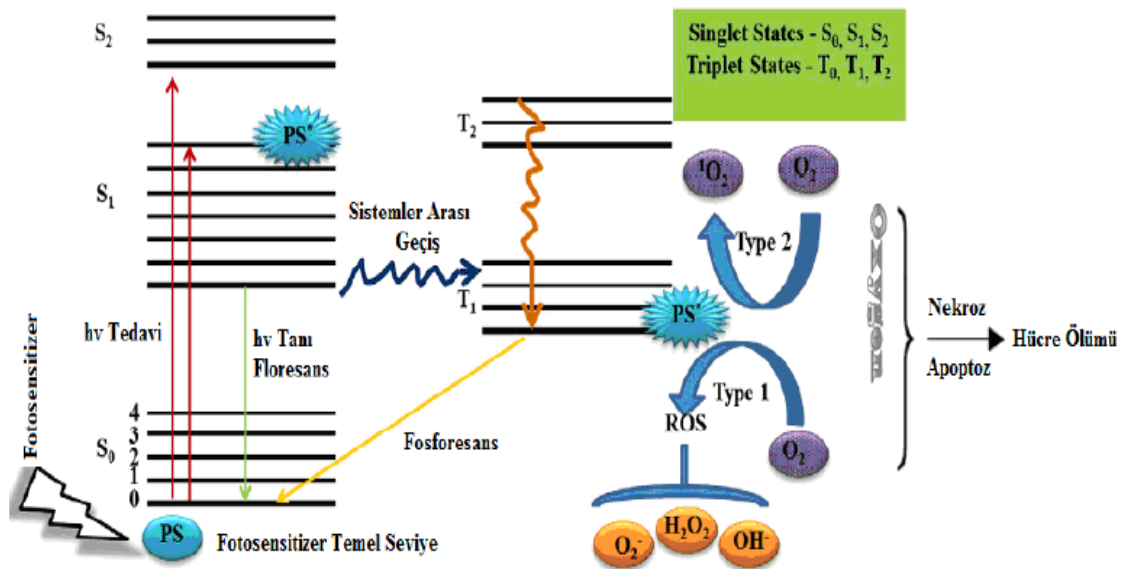
2.2. Fotodinamik ve Sonodinamik Tedaviler

2.2.1. Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik terapi (FDT), tümör dokusuna seçici olarak lokalize olan ve hedeflenen doku tarafından alınan ışığa duyarlı ajanın ortamda bulunan moleküler oksijen varlığında, uygun dalga boyunda görünür ışık ile uyarılması sonucu hücrelerde başlıca singlet oksijen oluşturarak hücrelerin ölmesi prensibine dayanan bir fotokemoterapi yöntemidir (Bilgin 1999;

Grossweiner, 2005; Çalışkan ve Bilgin, 2018). FDT, yalnızca kanser tedavisinde değil, bunun yanı sıra farklı alanlarda da kullanılmaktadır (Çalışkan ve ark, 2017). FDT uygulamalarında kullanılan ışığın dalga boyu genellikle 600-1000 nm arasında değişmektedir. FDT, ajanın hastaya damar yoluyla verilmesinin (veya topikal olarak uygulanmasının) ardından bu ilacın tümörlü dokuda birikmesini ve belli dalga boyundaki ışık ile uyarılarak tümörü yok etmesi ilkesine dayanır. Fotosensitif ajan veya ışık tek başına kanser hücrelerini tedavi etmemektedir. İkisinin birbirini takip eden biçimde kullanılmasıyla fotodinamik etki oluşmaktadır (Bilgin 1999).

FDT; ışığa duyarlı ajan, ajanı uygun dalga boyunda uyaracak ışık kaynağı ve oksijen olmak üzere üç bileşenden oluşmaktadır. Bu üç bileşen tek başlarına toksik bir etkiye sahip olmamasına rağmen birlikte fotokimyasal olayları başlatarak FDT'ye neden olurlar. FDT mekanizmasının gerçekleşebilmesi için gerekli ilk adım ışığa duyarlı ajanın uygun dalga boyunda (kırmızı veya yakın kızıl ötesi) bir fotonu absorblaması ve bunun sonucunda ajanın S_0 temel durumundan S_n kararsız, uyarılmış duruma geçmesidir. Molekül kısa bir zaman diliminde iç dönüşüm süreci ile S_1 uyarılmış singlet durumuna geçebilirken aynı zamanda farklı mekanizmalar (ışığa yapılarak ya da ışımsız) ile temel seviyeye geri dönebilir (Şekil 6). Bu mekanizmalara ek olarak, ajan ilk uyarılmış singlet durumdan (S_1 , $1P^*$) sistemler arası geçişler ile daha uzun ömürlü triplet uyarılmış (T_1 , $3P^*$) hale geçebilir. Bu durumun kararlı olması kullanılan ajan ile diğer komşu moleküller arasında meydana gelen reaksiyonları kolaylaştırır (Grossweiner, 2005).



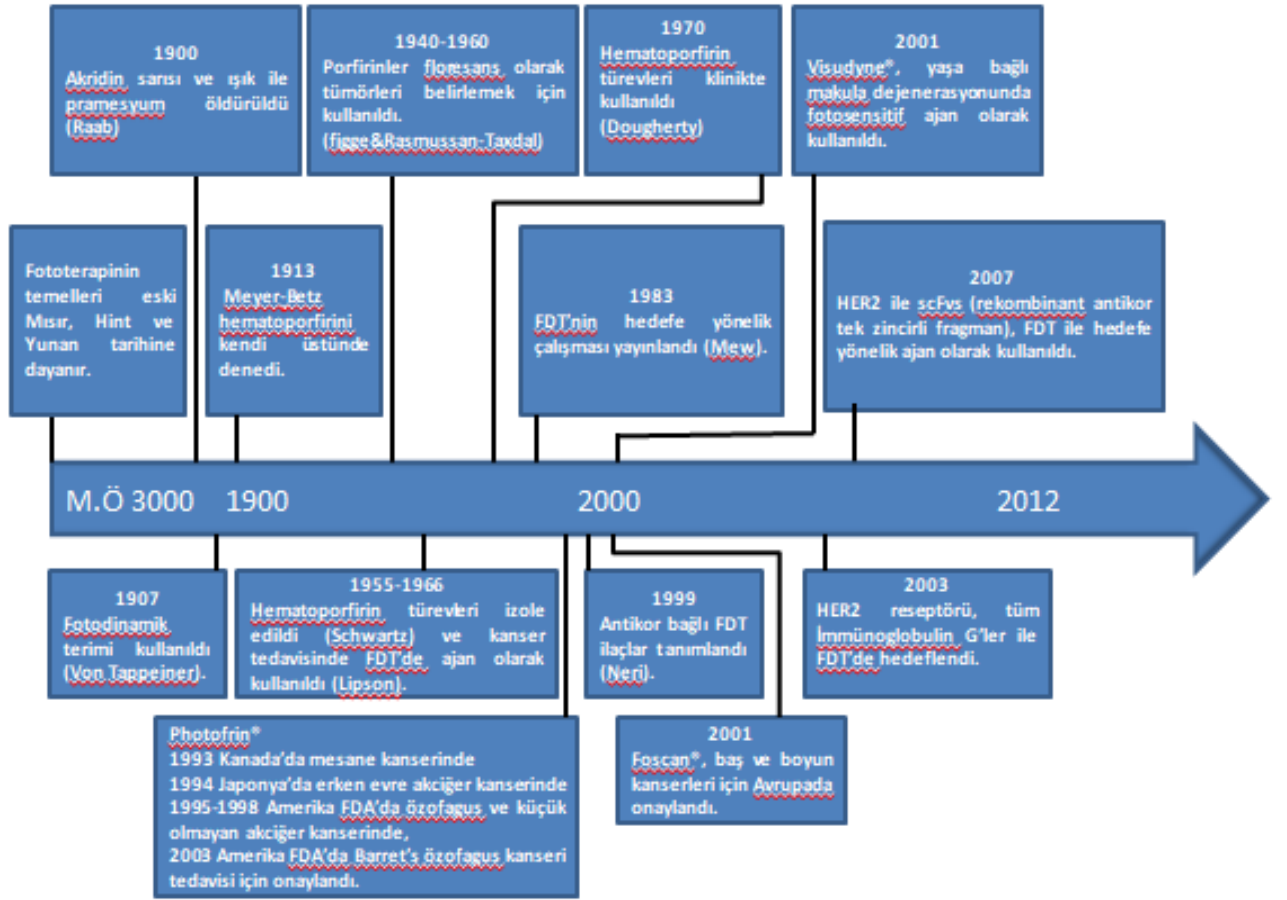
Şekil 6. Fotosensitif bir ajanın ışık ile uyarılması sonucu meydana gelen olaylar. (Lakshmanan 2014, makalesinden uyarlanmıştır) ve Fotosensitizasyon yolları.

Fotodinamik tedavide Tip I ve Tip II olmak üzere iki tip fotosensitizasyon reaksiyonundan bahsetmek gerekir (Şekil 6). Tip I fotosensitizasyon reaksiyonunda, uyarılmış triplet enerji durumundaki fotosensitif ajan bir elektronu (veya eşdeğer şekilde hidrojen atomunu) reaktant moleküle bağışlar veya molekülden geri alır. Bu olay oksijensiz ortamda gerçekleşir. Sonra reaktant oksijenle ya direk olarak veya genişletilmiş bir yol yardımıyla reaksiyona girer ve sitotoksik peroksitler, süperoksit iyonlar ve hidroksil radikalleri oluşturabilirler. Tip II fotosensitizasyon reaksiyonunda, moleküller oksijen, triplet temel seviyedeki çiftleşmemiş elektronu ile en kararlı durumdadır. Aynı moleküller oksijen yörüngesinde bulunan düşük enerjili çiftleşmemiş elektronlar, çiftleşmemiş elektronu bulunmayan singlet oksijen durumunu uyarılabilirler. Tip II reaksiyonda uyarılmış ışığa duyarlaştıran ajanlar önce oksijenle etkileşerek singlet oksijen (1O_2) oluştururlar (Fernandez ve ark, 1997; Grossweiner ve ark, 1999). FDT’de hedef hücrelerde başlıca singlet oksijen (ve/veya serbest oksijen radikalleri) meydana gelmektedir. Ortamda oluşan singlet oksijen ise direk ve dolaylı mekanizmalarla hedef hücrelerde ölüme (apoptoz ve nekroz) kadar giden reaksiyonları başlatmaktadır (Allison ve Moghissi, 2013). FDT’deki hücre ölümlerinden başlıca oksijene bağımlı tip II fotosensitizasyon reaksiyonları sorumlu tutulmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucu açığa çıkan aşırı reaktif ve son derece toksik olan singlet oksijen (dokudaki yarı ömrü yaklaşık 40 nanosaniye ve dokudaki yayılım yarıçapı yaklaşık 20 nanometre) sadece hedef hücrelerde ölüme neden olmaktadır. Böylelikle çevre dokuya zarar vermeden tümörlü bölgedeki hücrelerin ölmesi sağlanır. FDT etki mekanizmasında hücrel olaylar (hem apoptoza hem de nekroza yol açan yolaklar), vasküler olaylar (mikrovasküler yıkım) ve sistemik immunolojik cevabın uyarılmasını içermektedir (Bilgin ve ark, 2000). FDT hedef bölgesinde birçok tümör/hedef hücre döküntüsüne neden olmaktadır ve ayrıca bu bölgede çeşitli sitokin ve kemokinlerin oluşumuna neden olmaktadır (Allison ve Moghissi, 2013; Garg ve ark, 2010; Bilgin ve ark, 2005).

2.2.2. Fotodinamik Tedavinin Tarihçesi

Fotodinamik tedavinin geçmişi antik mısır zamanında deri hastalıkları için bitki özlerinden elde ettikleri malzemeyi deri üstüne sürerek direk gün ışığına tutmalarına dayanmaktadır. Buna rağmen 1900’lü yılların başına kadar kimse fotodinamik tedaviden bahsetmemiştir. Oscar Raab, okridin sarısını ışıkla kombine ederek paramesyumları

öldürmeyi başarmış ve fotodinamik tedavinin temellerini atmıştır. 1907 yılında Von Tappeiner bazal hücreli kanserlerde özünü kullanmış ve fotodinamik tedaviden bahseden ilk kişi olmuştur. 1979 yılında fotofrin FDA tarafından onaylanmış ilk fotosensitif ajan olarak kayıtlara geçmiş ve bu yıldan sonra FDT'ye ilişkin birçok ajan ve ışık kaynağı ile ilgili çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. FDT'nin tarihsel gelişimi Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. FDT'nin tarihsel gelişimi (Pye ve ark, 2013'den uyarlanmıştır).

2.2.3. FDT’de Kullanılan Işık Kaynakları

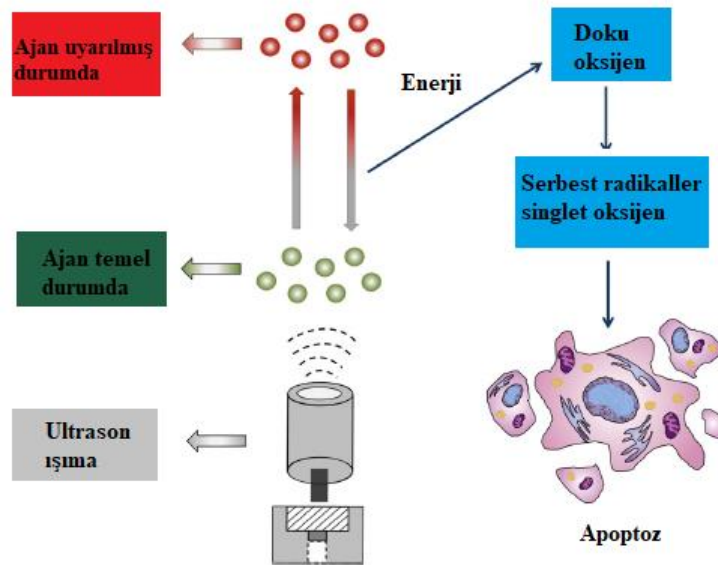
FDT’de ajanları uyuracak ışık kaynağı, kullanılan ajanın tümörlü dokuya gitmesinin ardından ajanın uygun dalga boyunda uyarılması açısından oldukça önemlidir. Tümörlü dokunun yerine bağlı olarak FDT’de kullanılan ışık kaynakları lambalar ve lazerler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Son zamanlarda LED’lerin de kullanılmasıyla bu sınıflandırma farklı şekilde yapılabilmektedir. Fotodinamik tedavide kullanılan lazerler ve ışık kaynakları Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. FDT’de kullanılan ışık kaynakları (Brancaleon ve Moseley, 2002).

Işık Kaynağı	Dalgaboyu	Işıma Gücü
Argon lazer	488 ve 514.5 nm	0.5-1 W/cm ²
Argon pompalı boya lazeri	500-750 nm (boyaya bağlı)	10-200 mW/cm ²
Metal buhar lazeri	UV veya görünür bölge (metale bağlı)	10 W/cm ² ye kadar
Metal buhar lazer pompalı boya lazer	500-750 nm (boyaya bağlı)	10-500 mW/cm ²
Katı hal lazerler: Nd:Yag lazer	1054, 532, 355, 206 nm	10 W/cm ² ye kadar
Yarıiletken diyot lazer	600-950 nm	700 mW/cm ² ye kadar
Tungsten Lamba	400-1100 nm	250 mW/cm ² ye kadar
Ksenon ark lamba	300-1200 nm	300 mW/cm ² ye kadar
Metal halojenür lamba	250-730 nm (metale bağlı)	250 mW/cm ² ye kadar
Sodyum (fosfor kaplı) lamba	590-670 nm	100 mW/cm ² ye kadar
Floresan lamba	400-450 nm	10 mW/cm ² ye kadar
LED lambalar	Görünür ve kızılötesi	150 mW/cm ² ye kadar

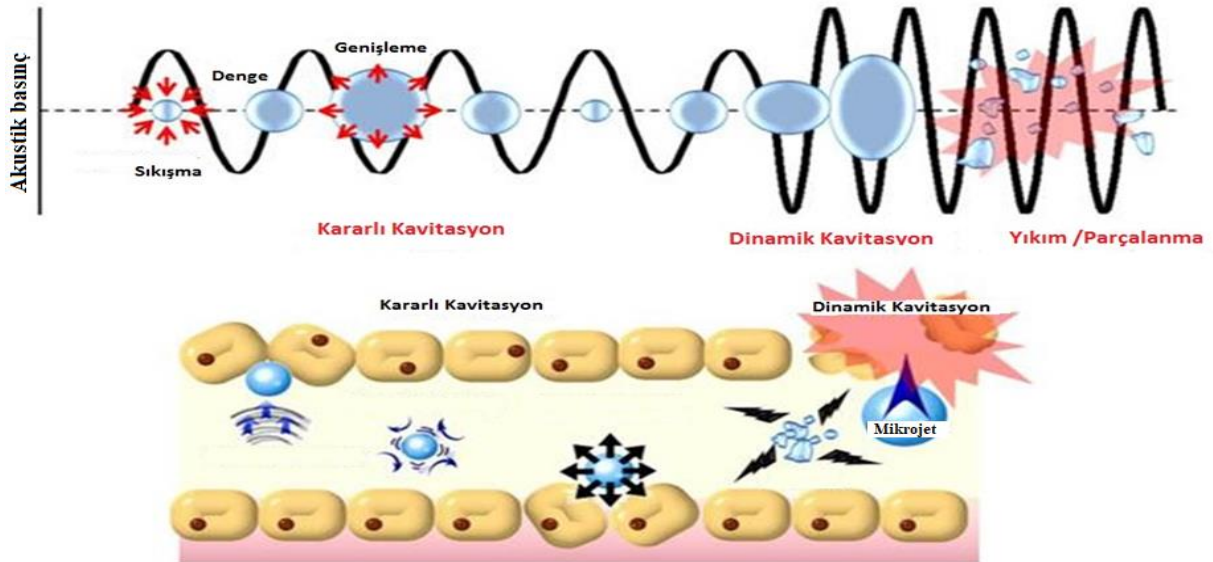
2.2.4. Sonodinamik Tedavi

FDT’de kullanılan ışığın hedef dokulara ulaştırılması gerekmektedir. Bu derin dokularda yer alan tümörün konumu nedeniyle her zaman mümkün olmayabilir. Bu sebeple ulaşılması zor olan derin dokulara ışığın daha iyi nüfuz edebilmesi için alternatif yollar aranmış ve Umemura ve arkadaşları tarafından fotosensitif bir ajanın ultrases ile aktive edilebildiği gösterilmiştir. Bu ajanın düşük şiddetli ultrases ile uyarıldıktan sonra benzer etkilerin gözlemlendiği ifade edilmiş ve bu alternatif tedavi yöntemine “**Sonodinamik Tedavi**” ismini vermişlerdir (Yumita ve ark, 1990; 1996; Umemura K ve ark, 1996; Umemura S ve ark, 1990, 1999). Başka bir ifadeyle, fotodinamik tedaviden türetilen sonodinamik tedavinin en önemli özelliği biyolojik dokulara fotondan daha iyi nüfuz eden düşük frekanslı ultrasesin kullanılmasıdır. SDT’nin apoptotik etkisi FDT’ye benzer şekilde uygulamadan sonra oluşan ROS radikalleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. FDT’ye benzer şekilde ultrasese duyarlı ajanlar uygun şiddette ve frekansta ultrases ile uyarıldıklarında temel durumdan uyarılmış duruma geçmektedirler. Uyarılmış durumdan tekrar temel duruma dönerlerken enerjilerini ortamdaki oksijene verirler ve singlet oksijen veya serbest radikaller gibi ROS radikallerini oluştururlar. Bu olaya sonokimyasal etki denmektedir. Oluşan ROS ise apoptotik yolları indükleyerek hücrelerin apoptoza gitmelerini sağlarlar (Şekil-8) (Pang ve ark, 2016; Trendowski, 2014; Shibaguchi ve ark, 2011).



Şekil 8. SDT Mekanizması (Pang ve ark, 2016)

Bilindiği üzere terapötik ultrasesin dokuyla etkileşimi termal ve termal olmayan olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Buna göre, SDT'nin birincil mekanizması termal olmayan etkiyle açıklanmaktadır ki bu etki kavitasyon etkisi olarak nitelendirilmektedir. Bu etki, ultrases ile uyarılmış bir ortamda mikro baloncukların üretilmesi, genişletilmesi ve çökmesi ile meydana gelmektedir. Diğer bir deyişle, sıvı ortamda bazı mikro kabarcıklar ultrasonik ışığa altında büyür ve daralır (Baker ve ark, 2001). Kavitasyon etkisi biyofiziksel bir etki olup ultrases etkisiyle dokularda mikrobaloncukların oluşmasını neden olmaktadır. Kavitasyon etkisi de iki kısımda incelenmektedir. Dengeli kavitasyon; birkaç mikronluk küçük baloncukların ultrasonik basınç dalgalarının etkisiyle ileri geri hareketidir. Ultrason tedavisi esnasında ortaya çıkar. Bu sırada hücre zarının geçirgenliği artar ve potansiyeli değişir. Dinamik kavitasyon ise, terapötik ultrases dozlarından daha yüksek dozlarda ortaya çıkar. Diğer bir deyişle sıvı içindeki mikrobaloncukların rezonans boyutlarına kadar büyür ve bu sayede maksimum oranda genişler ve son olarak şiddetli bir şekilde bir çöküş meydana gelir. Bu şekilde hızla büyüyen baloncuklar gelişerek hızlı hücre harabiyeti meydana getirir (Şekil 9). Dinamik kavitasyon ile hücre membranının geçirgenliği artırılarak hücre içine ilaç vb malzemelerin daha kolay geçmesine neden olur. Bu olaya da sonoporasyon denilmektedir (Tachibana ve ark, 2008; Didenko ve Suslick, 2002; Rosenthal ve ark, 2004).

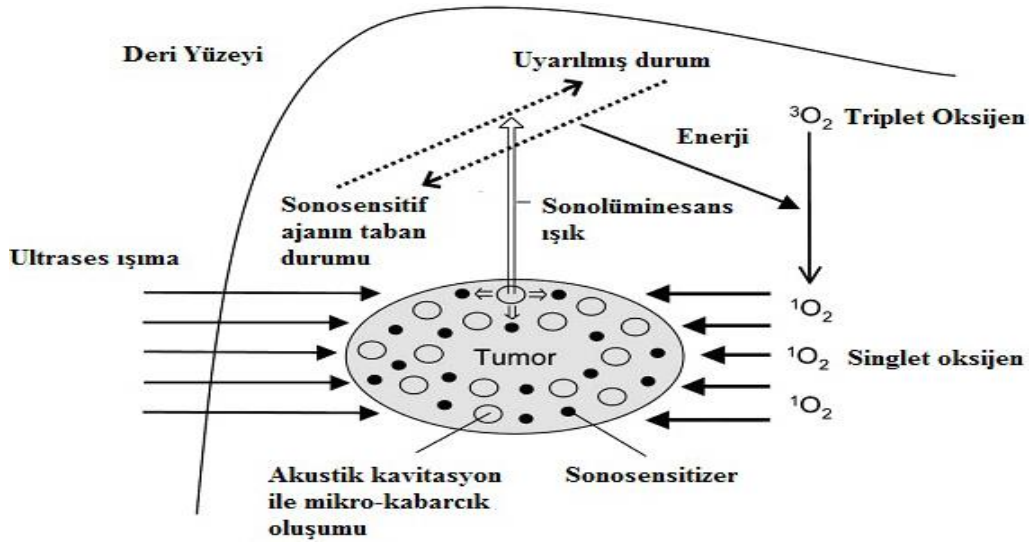


Şekil 9. Ultrasesin termal olmayan etkileri (Liu ve ark, 2014)

Bazı ilaçların ultrases ışına maruziyetiyle birlikte aktif süperoksit radikalleri ve singlet oksijen gibi oksijen türlerinin oluştuğu ve oluşan bu türlerin kanserli dokulara hasar verdiği belirlenmiştir (Miyoshi ve ark, 1997). Yapılan çalışmalarda hematoporfirin sonolüminesans ile foto-uyarılması sonucu sitotoksik singlet oksijen oluştuğu gösterilmiştir (Yumita ve ark, 1990, 1996; Umemura K ve ark, 1996; Umemura S ve ark, 1999; Liu ve ark, 2007). Diğer bir çalışma ile sonodinamik etki için ışımaya maruz bırakılmış ortamda oksijenin olmasının önemli olduğu ifade edilmiştir. Bazı hematoporfirinlerin kimyasal aktivasyonu kavitasyon etkisi ile indüklenir (Misik ve Riez, 2000). Literatür bilgilerine göre ultrasonik kavitasyon etkisinin meydana getirdiği enerji ile porfirin gibi bazı fotosensitif ajanların aktive edildiği ve bu aktivasyon sonucunda önemli hücre hasarlarının gözlemlendiği gösterilmiştir (Tachibana ve ark, 1993; Yumita ve ark, 1989; Tata ve ark, 1996; Umemura S ve ark, 1997). Bu aktivasyon, hematoporfirin türevlerinin pirolizi veya çöken kabarcıkların çevresindeki hidrojen atomları ve OH radikalleri ile reaksiyonu ile gerçekleşir ve sitotoksik serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Esasen, floresans emisyonu, temel durumdan uyarılmış duruma geri dönen ışık ile ajanın uyarılması sonucu oluşur. Bu bilgilere ek olarak, Nomura ve arkadaşları porfirinin ultrases ile uyarılmasıyla ortamda NO_3^- ve H_2O_2 konsantrasyonlarının arttığını belirtmişlerdir (Nomura ve ark, 1996). Bu nedenle, fotosensitif bir ajan, ultrases ile kombine edildiğinde sonosensitif ajan olarak etki etmektedir ve bu etkinin uygulanabilirliği oldukça yüksektir. Bu sonosensitif ajanlar, tümör dokusu etrafında seçici olarak birikirler ve ultrasonik ışına ile aktifleştirilebilirler.

Yapılan çalışmalar kullanılan ajanların tek başına anti tümör aktivitesi olmamasına rağmen, ultrases yayılımı ile bu aktivitenin arttığını göstermiştir (Tachibana ve ark, 2008). SDT'in başlıca çalışma alanları, kemoterapinin geliştirilmesi, gen terapisi ve apoptoz terapilerdir (Yu ve ark, 2004). Ultrases yayılımının uygulanan enerjisi, dokulara daha az zarar vermesi ve biyolojik dokulara daha fazla nüfuz etmesi sebebiyle radyoterapi ve ışık kullanılan tedavilere göre daha üstün olduğu belirtilmiştir (Tachibana ve ark, 2008).

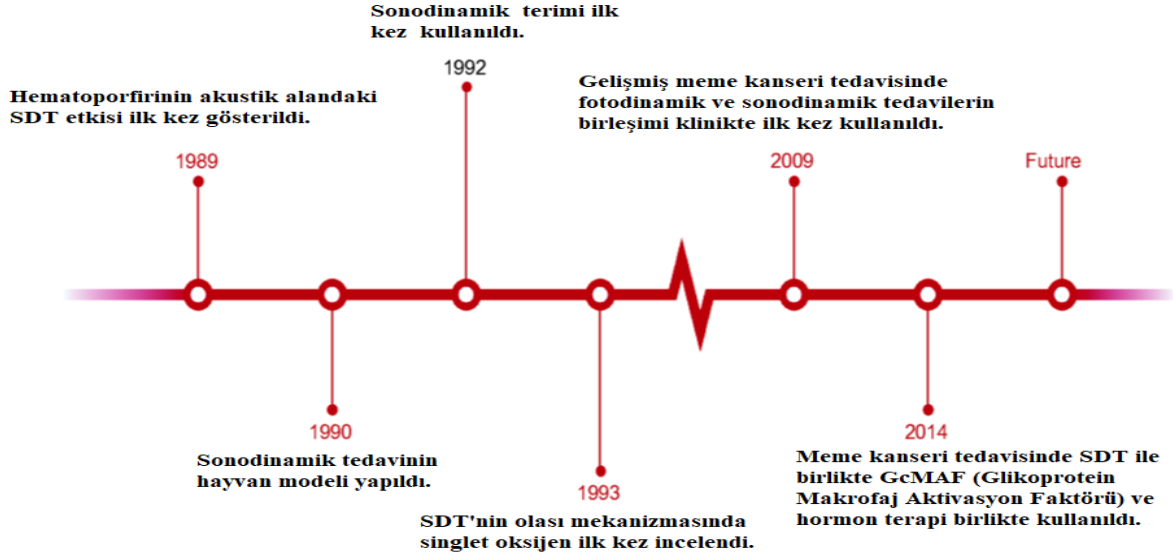
SDT'nin sitotoksikite mekanizması FDT ile benzer özellikler göstermektedir (Bilgin ve ark, 2017). SDT'de kullanılan ajanın ultrases ile uyarılmasıyla elde edilen akustik kavitasyon aktif oksijen üretimini sağlamaktadır (Didenko ve ark, 2000; Rosenthal ve ark, 2004). Beyaz ses, sonokimyasal reaksiyonlar ile elde edilen ultrases yayılım tümör hücresi etrafında kavitasyon oluşumunu sağlamaktadır. Tümör hücresinin yüzeyine tutunan bir sonosensitif ajan, sonolüminesans ışık ile uyarıldığında, temel seviyeden uyarılmış seviyeye aktive olur ve aktifleşmiş ajan temel seviyeye geri dönerken enerji salarak hücrel toksisiteye sebep olan singlet oksijen, serbest radikaller gibi reaktif oksijen türleri oluştururlar (Şekil 10).



Şekil 10. SDT’de olası sitotoksikite mekanizması (Kuroki ve ark, 2007).

2.2.5. Sonodinamik Tedavinin Tarihçesi

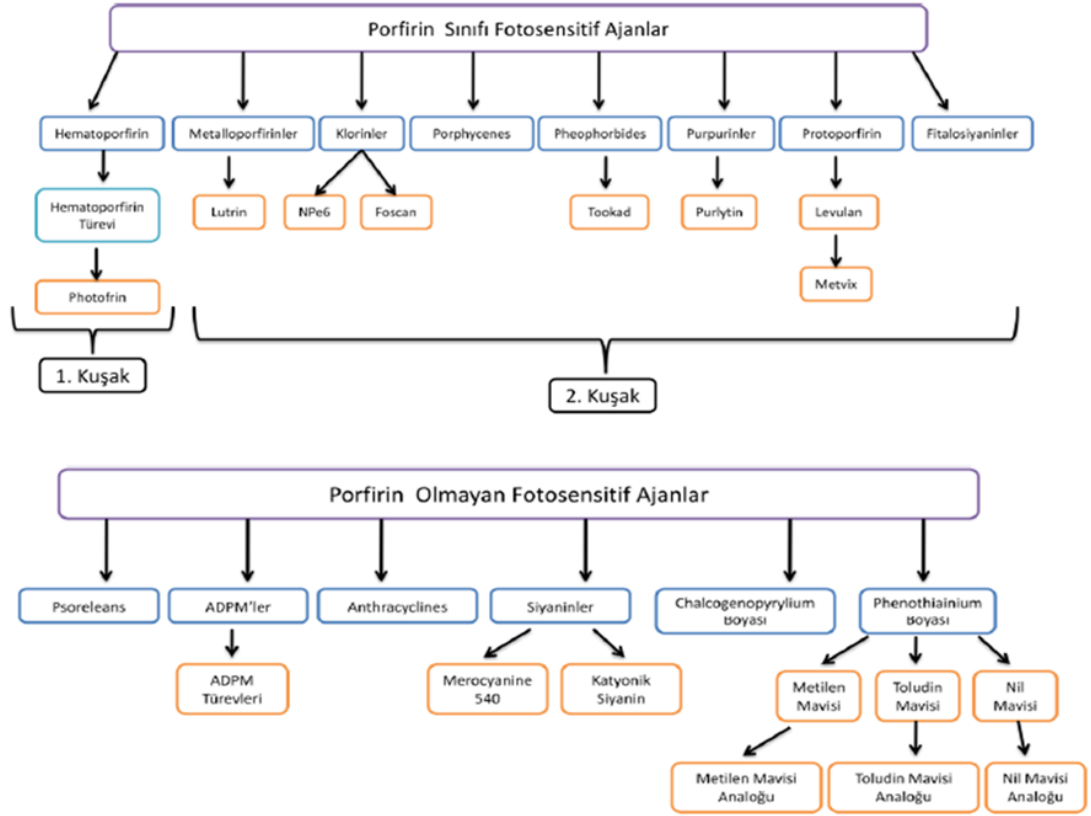
Sonodinamik tedavinin tarihsel gelişimi Şekil 11’de özetlenmiştir. Sonodinamik tedavi etkisi ilk olarak 1989 yılında Yumita ve Umemura tarafından, hematoportfirinin akustik alanda sitotoksik etkilerini gözledikleri çalışmayla gözlenmiştir. (Yumita ve ark, 1989). Yine aynı grup 1990 yılında SDT’nin etkisini in vivo olarak incelemişlerdir (Yumita ve ark, 1990). Umemura ve arkadaşları ise 1992 yılında porfirinin ultrases etkisinde toksik etkisini göstermişler ve sonodinamik tedavi terimini ilk kez kullanmışlardır (Umemura ve ark, 1992). Bir sene sonra yine Umemura ve arkadaşları SDT’nin olası mekanizmasını incelemişler ve singlet oksijenin SDT’nin mekanizmasında önemli olduğunu bildirmişlerdir (Umemura ve ark, 1993). SDT’nin bu temel ve önemli çalışmalarından sonra SDT’nin olası mekanizmaları, SDT’de kullanılan yeni ajanlara yönelik çalışmalar devam etmiş ve hala etmektedir (Huang ve ark, 2010; Wang ve ark, 2009; Inui ve ark, 2014).



Şekil 11. SDT'ye tarihsel bakış (Pan ve ark, 2017).

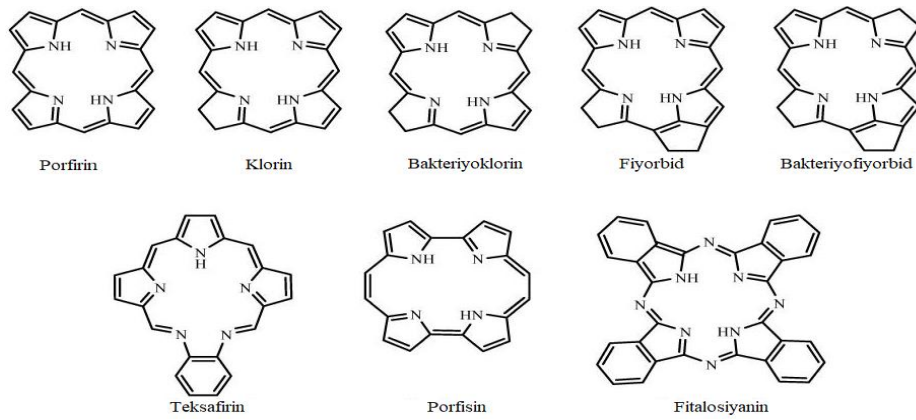
2.2.6. Fotodinamik ve Sonodinamik Tedavide Kullanılan Ajanlar

FDT ve SDT'de kullanılan ajanlar sırasıyla ışığa duyarlı (fotosensitif) ve ultrasese duyarlı (sonosensitif) ajanlar olarak isimlendirilmektedir. Kullanılan ajanın tek başına anti tümör etkisi olmamasına rağmen, ışık veya ultrases ışıma ile birlikte kullanıldığında anti tümör bir aktivite ortaya çıkmakta ve dolayısıyla hücreler üzerinde bir etki oluşmaktadır. Işığa duyarlı bir ajanın, ultrases ile kombine edildiğinde sonosensitif etki göstermektedir ve bu etkinin uygulanabilirliği oldukça yüksektir. Bu ajanlar, tümör dokusu etrafında seçici olarak birikirler ve ışık veya ultrasonik ışıma ile aktifleştirilebilirler. FDT veya SDT'de gerçekleşecek reaksiyonlarda kullanılan ajanın özellikleri oldukça önemlidir. Bu özellikler arasında düşük maliyet, düşük toksik etki, vücutta çabuk atılım, yüksek absorpsiyon etkisi sayılabilir. FDT ve SDT'de kullanılan ajanlar porfirin sınıfı ve porfirin olmayan ajanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 12).



Şekil 12. Porfirin sınıfı ve porfirin dışı ajanlar (O'Connor ve ark, 2009).

FDT ve SDT'de kullanılan ajanlar porfirin ve türevleri olarak bilinen klorinler, bakteriyoklorinler, fitalosiyanimler ve porfirin dışı bileşikler olarak kabul edilen antraquinonlar, fenotiazinler, ksantenler, siyaninler, curcuminoidler ve benzer bileşiklerdir (Şekil 13).



Şekil 13. Porfirinoid bileşiklerin temel yapıları (Lucky ve ark, 2015).

2.2.6.1. Porfirin ve türevleri

FDT’de kullanılan ilk ışığa duyarlı maddeler hematoporfirin türevleri ve fotofrinidir. Porfirinler bütün yaşayan organizmaların biyolojik aktivitelerinde rol oynayan bir maddedir. Bu moleküller yüksek oranda bileşik yapıya sahip, heterosiklik moleküllerdir ve merkezinde genelde metalik atom bulundurlar. Çeşitli porfirin türevleri bulunmaktadır ve bunlar yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının kontrolünde görev alırlar. Bunlardan birisi olan protoporfirin IX, hemoglobin, sitokrom c ve diğer biyolojik olarak ilişkili moleküllerde doğal olarak bulunan porfirin bileşenidir. Bir diğer porfirin türevi ise ALA (aminolevulinik asit) olarak bilinir ve dokuda protoporfirin IX oluşumunu tetiklemektedir (Uehlinger ve ark 2000). Hematoporfirin türevi ajanlar onkolojide FDT ilacı olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (O’Conner ve ark 2009; Başoğlu ve ark, 2016). Ancak, bu maddelerin ışık emiliminin zayıf olması, seçici olarak tümörde birikme eğilimlerinin düşük olması, 4-6 hafta süreyle vücuttan uzaklaşmaması nedeni ile bu zaman içinde fototoksik etki oluşturması ikinci nesil ajanların sentezlenmesine neden olmuştur.

İkinci nesil ajanlar kimyasal olarak birinci nesile göre daha saf, daha uzun dalga boylarında ışığı soğurmakta ve tedavi sonrası deride daha az ışık hassasiyeti oluşturmaktadır (OConnor ve ark, 2009). İkinci nesil ajanlar arasında metaloporfirinler (Magda ve Miller, 2006.), fiyoorbidler (Taneja ve ark, 2016), fitalosiyeninler (Muehlmann ve ark, 2015), klorinler (Biel, 2010), protoporfirin IX öncülleri (Ormond ve Freeman, 2013), fenotiyazinler (metilen mavisi ve toludin mavisi) (Tardivo ve ark, 2005; Graciano ve ark, 2015), siyaninler (Delaey ve ark, 2000) ve ksantenler (Rose Bengal) sayılabilirler (Chen ve ark, 2018). Tablo 3’de klinik olarak fotodinamik tedavide kullanılan ajanlar yer almaktadır.

Tablo 3. Klinik olarak uygulanan fotosensitif ajanlar.

Kimyasal Grup	Fotosensitizer	Dalga Boyu	Kullanılan Kanser Türü	Referans
Porfirin ve Türevleri	Fotofrin	630 nm	Akciğer, özofagus, mesane, beyin, over	Panjehpour ve Overholt, 2006
	ALA	635 nm	Deri, mesane, beyin, özofagus	De Haas ve ark, 2006
Klorin ve Türevleri	Temoporfin (Foscan)	652 nm	Baş ve boyun, akciğer, beyin, deri	Betz ve ark, 2008
	verteporfirin	690 nm	Pankreas, deri	Sato ve ark, 2010
	HPPH ¹	665 nm	Baş ve boyun, özofagus, akciğer	Loewen ve ark, 2006
	Purlitin	660 nm	Deri, meme	Bellnier ve ark, 2003
	Talaporfin	660 nm	Karaciğer, kolon, beyin	Kujundzic ve ark, 2007
	Ce6-PVP (Fotolon), Ce6 türevleri (Radachlorin, Photodithazine)	660 nm	Nazofaringeal, sarkoma, beyin	Thong ve ark, 2008
	Fitalosiyeninler	Silikon fitalosiyenin (Pc4)	675 nm	Kutanöz T-cell lenfoma
Bakteriyoklorin	Tookad	762 nm	Prostat	Woodhams ve ark, 2006
Teksafirin	Moteksafin lutesyum (Lutex)	732 nm	Meme	Patel ve ark, 2008

HPPH¹; 2-[1-Hexyloxyethyl]-2 Devinyl Pyropheophorbide-a

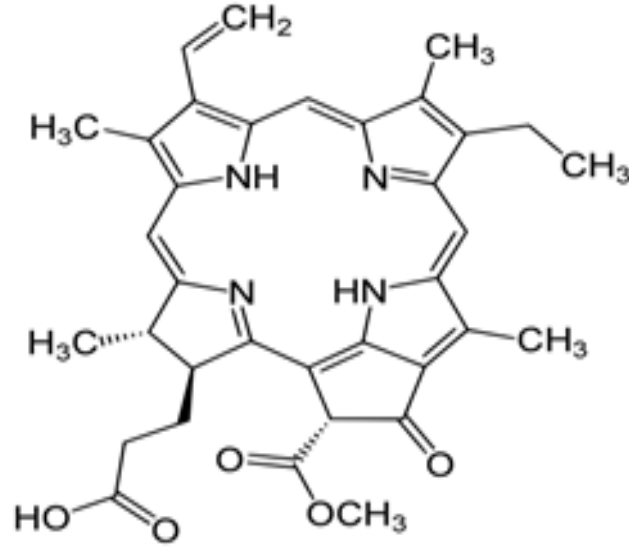
İkinci nesil ajanlardan olan klorinler, geniş heterosiklik aromatik moleküller olup, üç pirol halkası ile bir indirgenmiş pirol halkasına dört metin bağının bağlanmasıyla oluşurlar. Magnezyum içeren klorinler klorofil olarak bilinmektedir. Klorinler ilk olarak 1980'li yıllarda fotosensitif ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu zamana kadar birkaç klorin türevi geliştirildiği bilinmektedir ve klorin e6 (Foscan®), verteporfirin, talaporfin, mono-L-aspartil klorin e6, diaspartil klorin e6, monoseril klorin e6 gibi türevleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler ikinci nesil ajanlar arasında yer alır ve bu ajanların etkisi artırılmış, yan etkileri azaltılmış

durumdadır. Bununla birlikte tümörlü dokularda daha etkili şekilde biriktiği, vücuttan hızla atıldığı ve 650-670 nm dalga boyu aralığında kuvvetli absorpsiyon gösterdiği bilinmektedir (Nyman ve Hynninen, 2004).

Fitalosiyaninler, bir diğer ikinci nesil ajanlardandır ve doğada bulunan porfirin halka yapısının analogu olan, sentetik makrosiklik yapıya organik bir moleküldür ve FDT’de kullanılan ve çalışılan en sık ajanlardan biridir. Bununla birlikte fitalosiyaninlerin yapısı, yeşil yapraklı bitkilerin pigmenti olan klorofil ve kana renk veren hemin ile yakın benzerliğe sahiptir (Cook, 2002). Fitalosiyaninlerin hidrofobik ve hidrofilik özellikleri arasında önemli bir uyum vardır ve bu sebeple diğer metaller ve makromoleküller kullanılarak istenilen özellikte ve yapıda özel ürünlerin tasarlanıp sentezlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu özelliğinden dolayı fitalosiyaninler katalizörler, kanser tedavisinde foto dinamik eleman, optik bilgi depolama sistemleri, kimyasal sensörler, sıvı kristal malzemeler, non-lineer optik malzemeler, Langmuir-Blodgett filmleri gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu uygulamaların çeşitliliği fitalosiyaninlerin merkezinde bulunan metal iyonunun değiştirilme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Maree ve ark, 2002). Bu durum fitalosiyaninlerin fotofiziksel özelliklerini etkilemekte ve yüksek absorpsiyon bandına sahip olmalarına neden olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı FDT’de sıklıkla kullanılmaktadır. Suda çözünebilen sülfü yapıya fitalosiyaninler arasında alüminyum fitalosiyanin ve çinkofitalosiyanin en çok kullanılan fotosensitif ajanlar olarak bilinmektedir (Lukyanets, 1999). Ancak fitalosiyaninlerin metali bileşiklerindeki sulu çözeltilerde agregasyona neden olmakta bu da fotokimyasal reaksiyonların özelliklerinde azalmaya neden olmaktadır. Bu sebeple fitalosiyaninlerle ilgili çalışmalar güncelliğini hala korumaktadır (Gorman ve ark, 2004; Tedesco ve ark, 2003). Tüm bu özellikler fotosensitif ajanın fotodinamik tedavinin etkinliğinde nasıl bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Fiyorbidler, klorofil yıkımında ortaya çıkan bir üründür ve ikinci nesil ajanlar arasında yer almaktadır. Bu ajanlar birçok bitki ekstratında aktif bileşen olarak rol oynamakla birlikte, fotofrin gibi birinci nesil ajanlara göre ışığı daha uzun dalga boylarında (666 nm) absorplama özelliğine sahiptir (Gheewala ve ark, 2018; Choi ve ark, 2014). Fiyorbidlerin FDT’de en sık kullanılan türevleri arasında fiyorbid a ve Tookad® gelmektedir. Fiyorbid a’lar, kırmızı bölgede uyarılma özelliğine sahiptir ve hücrede mitokondri, çekirdek ve lizozomlarda lokalize olabilirler (Şekil 14). Bu özellikleri sayesinde hücrede ışık ile uyarıldıktan sonra singlet oksijen oluşturarak ölümcül hasarlarımıza neden olabilirler (Tanielian ve ark, 2001). Tookad®, paladyum bakteriyofiyorbid olarak bilinir ve ikinci nesil ajanlardan biridir. Bu ajan özellikle damar hedefli FDT’de kullanılan ajanlardandır. Tookad uzun dalga boylarında (762 nm)

nüfus edilebilen ışık ile uyarılan bir ajandır. Tookad uyarıldıktan sonra süperoksit ve hidroksil radikalleri oluşturarak kanserli hücrelerde ölüme neden olmaktadır. Bu ajanların tümör hücrelerinde seçici birikimi, düşük toksisitesi ve hematoporfirin türevlerinden 20 kat daha fazla fototoksik etkiye sahip olması FDT ve SDT'ye uygun ajanlar arasında yer almasına neden olmaktadır (Segelman ve ark, 1987;Baskaran ve ark, 2018).

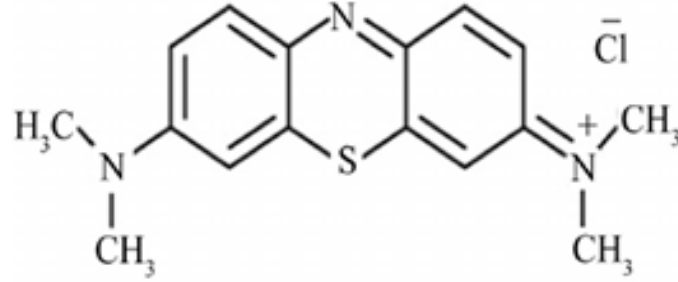


Şekil 14. Fiyorbid a'nın moleküler yapısı.

2.2.6.2. Porfirin olmayan ajanlar

FDT ve SDT'de kullanılan porfirin olmayan ajanlar arasında psoralenler, antrasiklinler, siyaninler ve metilen mavisinin de içinde yer aldığı fenotiyazin boyalar yer almaktadır. Bu ajanların kullanılmasındaki en büyük etken ucuz olmalarıdır. Bu boyalardan biri olan metilen mavisi 550-700 nm dalga boyu aralığında (maksimum tepe değeri 664 nm) kuvvetli bir soğrulma tepe değeri bulunan, güçlü bir fotodinamik etkinliği olan ucuz bir boyadır. Bazik bir boya olan metilen mavisi suda, etanolde ve kloroformda kolay çözünen koyu mavi renkte bir boyar maddedir. Metilen mavisi fotokimyasal özellikleri iyi bilinen bir moleküldür (Şekil 15). Antifungal, antibakteriyel ve antimalaryal aktiviteye sahip olan metilen mavisi, yaygın olarak canlı organizmaları boyamada ve methemoglobinemi tedavi etmede kullanılmaktadır. Metilen mavisi son zamanlarda yapılan klinik araştırmalarda fotosensitizer olarak bazal hücreli karsinom, Kaposi sarkomu, metastatik melanom gibi

kanserlerin ve psöriyazis, HPV-bağlı lezyonlar, Herpes simpleks 1 ve 2'ye bağlı deri lezyonları, Kondiloma akuminata, onikomikoz gibi kanser dışı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Tardivo ve ark, 2005).



Şekil 15. Metilen mavisinin moleküler yapısı.

Porfirin olmayan ajanlar arasında yer alan Rose Bengal, özellikle oftalmoloji alanında kullanılan ikinci nesil ajanlardan biridir. Bu ajan 450-500 nm dalga boyu aralığında uyarılır. Rose Bengal, fotodinamik tedavide virüslerin, protozoaların, gram pozitif bakterilerin öldürülmesinde kullanıldığı gibi, kardiyomiyositler, retinal pigment epitel hücrelerde de kullanılmaktadır (Panzarini ve ark, 2011).

Diğer bir ajan olan indosiyanın yeşili, FDA tarafından onaylanmış, suda çözülebilen, anyonik ikinci nesil boyalardandır. Bu ajanda diğerleri gibi düşük toksisiteye sahiptir ve 700-800 nm dalga boyu aralığında güçlü absorpsiyon özelliğine sahiptir. İndosiyanın yeşili anjiyografide kullanıldığı gibi fotodinamik tedavide özellikle melanoma kanserlerinde kullanılan uygun ajanlardan biri olarak da kullanılabilir (Urbanska ve ark, 2002)

2.2.7. Fotodinamik Terapinin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Fotodinamik tedavi (FDT) prostat kanseri tedavisinde yakın bir gelecekte (uygun fotosensitif ajan ve uygun ışın dozu gibi sorunlar çözüldükten sonra) alternatif bir yöntem olarak kabul göreceği düşünülmektedir. Minimal derecede invaziv bir yöntem olan FDT, kanser prognozu üzerine iyi sonuçlar vermekte ve hastanın yaşam kalitesini iyileştirmektedir. Ayrıca gerektiğinde farklı dozlarda (birden fazla) ve başka tedavi protokolleriyle birlikte

uygulanabilirliğe sahiptir (Brown ve ark, 2004). Fotodinamik tedavinin Barrett's özefagus, yaşa bağlı makular dejenerasyon, psoriyazis, romatoid artrit, benign prostatik hiperplazi, servikal displazi ve aktinik keratoz gibi pre-kanseröz hastalıkların yanı sıra bazal hücreli karsinoma, endobronşiyal kanser, özefagus kanseri, gastrik kanser, serviks kanseri, baş-boyun kanserleri, papillar mesane kanserleri gibi hastalıklarda kullanımları çeşitli ülkelerin sağlık kuruluşları (FDA-ABD, Avrupa Birliği, İngiltere, Almanya, Fransa, Kanada ve Japonya Sağlık Bakanlıkları, vb) tarafından onaylanmıştır (Dolmans ve ark, 2003; Fayter ve ark, 2010). Günümüzde prostat, meme, beyin, serviks, deri ve peritoneal boşluk (bağırsak, karaciğer, safra yolları, pankreas, vb) kanserleri için klinik FDT araştırmaları sürdürülmektedir. Fotodinamik tedavinin diğer kanserlerin ve hastalıkların tedavisinde gelecekte kullanılabileceği belirtilmektedir.

Chakrabarti ve arkadaşları *in vitro* bir çalışmada üç farklı prostat kanseri hücre dizisinde (PC-3 ve LNCaP ve benign TP-2), endojen olarak protoporfirin IX'a dönüşerek etki eden Aminolevulinik asit (ALA) ile görünür ışığın etkileşimini incelemişler ve PC-3 hücrelerinde protoporfirin IX'un (PPIX) arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca hedef hücrelerin mitokondrilerinin fonksiyonel ve yapısal özelliklerine ile PPIX'un konsantrasyonuna bağlı olarak FDT'nin etkisinin değişebileceğini de ifade etmişlerdir. ALA'nın alımı, PPIX üretimi, oksidatif hasar için mitokondri hassasiyeti ve mitokondri hasarına bağlı olarak hücrelerin onarabilme kabiliyeti ALA ve FDT sinerjik etkisine bağlı olduğunu ancak bu değişkenlerin FDT ve ALA'nın sinerjik etkisini etkileyen mekanizmaların hala açıklanabilmiş olmadığını ifade etmişlerdir (Chakrabarti ve ark, 1998). MPPa (Pirofiorbid-a methyl ester)'nin fotosensitif ajan olarak kullanıldığı diğer bir çalışmada ise, PC-3 prostat hücrelerine ışık ve ajan etkisinde hücre ölümleri *in vivo* ve *in vitro* incelenmiş, elde edilen sonuçlara göre prostat kanseri hücrelerinin ajan ve ışık etkisiyle G0/G1 fazında hücre döngüsünün durduğu gözlenmiş ve asıl olarak mitokondriyal kaspaz-9 ve kaspaz-3 yolları üzerinden apoptotik yollarla hücre ölümü sürecine girdiği belirlenmiştir (Tian ve ark, 2006). Fateye ve arkadaşları fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) yolağının hücre sağ kalımı ve büyümesinde etkin rol oynadıklarını ve bu sebeple PI3K inhibitörü olan BEZ235'e verteporfirin ve FDT uygulayarak PC-3 prostat kanseri ve SVEC endotel hücrelerinin hücre büyümesini inhibe ettiklerini göstermişlerdir (Fateye ve ark, 2012). FDT ile fitalosiyanınin birlikte kullanıldığı bir çalışmada fitalosiyanınin mitokondrideki sitozolden Bax proteinlerinin translokasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Mitokondriden sitokrom c'nin salınımı MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki apoptozun intrensek yolağı için erken sinyalizasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca DU-145 prostat kanseri hücreleri için Bax negatif olduğunu

belirtilmiştir. Mitokondriden sitokrom c salınımı, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, kaspaz aktivasyonu, kromatin yoğunlaşması ve kırılmasını içeren apoptoz belirteçlerinin bu hücrelerde tamamen bloke olduğu ifade edilmiştir (Chiu ve ark, 2003). Prostat kanserinin FDT ile incelendiği başka bir çalışmada ise FDT'nin nitrik oksit ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Bhowmick ve Girotti, 2014). Bir fotosensitif ajan olan Fiyorbid a ile yapılan fotodinamik tedavi ölümsüz insan oral keratinosit ve oral skuamöz hücre karsinomu hücre dizinlerinde apoptoz yollarını aktive ettiği belirtilmiştir. Bu apoptotik yollarla oluşan etki yanında wnt sinyal yolağını etkileyen (TCF4/Beta-katenin kompleksi ile birleşerek) RUNX3'ün FDT'in etkisini belirlemede kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (Moon ve ark, 2015). Ayrıca fotodinamik tedavide kullanılan bazı ajanların wnt sinyal yolağı üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir. Örneğin çinko-protoporfirin hemoksijenaz-1'den bağımsız olarak kanser hücre canlılığını wnt/beta katenin sinyal yolağı üzerinden baskıladığı gösterilmiş ve DU145 prostat kanseri hücre dizininde Wnt/beta-katenin sinyal yolağının çinko protoporfirin anti kanser etkinliğinde rol aldığı belirtilmiştir (Wang ve ark, 2013).

2.2.8. Sonodinamik Terapinin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Sonodinamik tedavinin kanser tedavisinde kullanımı henüz sınırlı olmakla birlikte bununla ilgili çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Bu çalışmalardan birinde Suzuki ve ark. akridin sarısı ile SDT'nin sinerjik etkisinin sarkoma 180 hücrelerinde etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonunda 1.0 µg/ml akridin sarısı ile 2.0 W ultrases uygulaması sonrası hücrelerin sağ kalım oranını %35 olarak belirtmişler, sağ kalan hücrelerin üçte birinin apoptoza hazırladığını bildirmişler ve sonuç olarak bu terapinin tümör hücrelerinde hem apoptoza hem de nekroza neden olduğunu ifade etmişlerdir (Suzuki ve ark, 2007). Metilen mavisinin sonosensitif ajan olarak kullanıldığı başka bir SDT çalışmada Xiang ve ark. SDT uygulamasının over kanseri HO-8910 hücreleri üzerinde ROS artışına bağlı olarak hücrelerde apoptozu tetiklediğini bildirmişlerdir (Xiang ve ark, 2011). Başka bir çalışmada protoporfirin IX (PpIX) ve SDT'nin L1210 lösemi hücreleri üzerinde otofajik ve apoptotik etkisi olduğu ortaya konmuştur (Zhao ve ark, 2011). Sarkoma 180 hücrelerinde PpIX ajanı ile SDT'nin etkisinin incelendiği in vivo bir çalışmada ultrases ve ilacın birlikte kullanıldığı grupta tümörün inhibisyonunun gözle görülür şekilde arttığı belirtilmiştir (Wang ve ark, 2008). İnsan akciğer adenokarsinoma SPAC-1 hücrelerinde klorin e6 ve SDT uygulamasının *in vivo* incelendiği bir çalışmada klorin e6'nın konsantrasyonunun normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde daha fazla olduğunu belirtmiştir ve hem ajanın hem de ultrasesin tek başına

herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığını ancak ikisinin birlikte kullanıldığında ortaya çıkan etkinin tümör hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Chen ve ark, 2013). Hepatoma-22 hücrelerinde PpIX ve SDT'nin antitümör etkisinin incelendiği diğer bir *in vivo* çalışmada SDT uygulamasından sonra dokulardaki MDA konsantrasyonu, GSH, CAT ve SOD aktiviteleri incelenmiştir. Sonuç olarak PpIX'un tümörlü dokularda seçici biriktiği ve SDT etkisiyle lipid peroksidasyon düzeyini arttırarak ve anti-oksidatif enzimlerin aktivitesini azaltarak tümör hücrelerinin büyümesini engellediği belirtilmiştir (Wang ve ark, 2010).

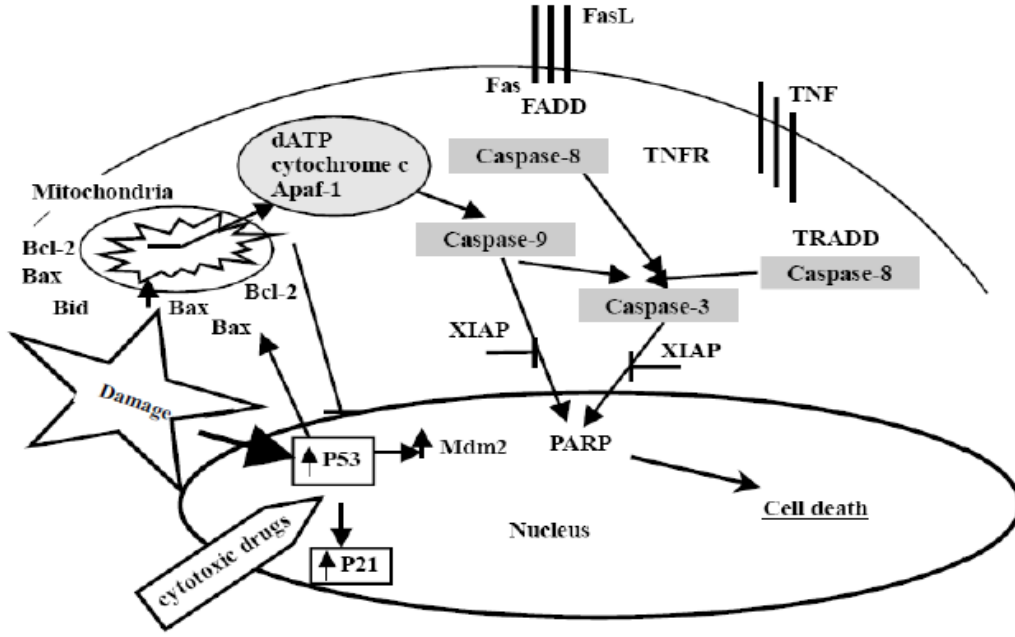
Siu ve arkadaşları piezo elektrik transdüser (ultrases kaynağı) ve doksorubisinin birlikte kullanılmasıyla PC-3 hücreleri üzerinde hücre lizisi ve sitotoksitenin arttığına dikkat çekmişlerdir (Siu ve ark, 2007, 2008). Bu iki çalışma da prostat kanserinde SDT'nin etki mekanizması hakkında bilgi içermemektedir. Yapılan literatür taramasında sonodinamik tedavinin prostat kanseri üzerine etkisiyle ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.2.9. Fotodinamik ve Sonodinamik Terapide Hücre Ölümü Mekanizmaları

Foto- ve sono-sensitizasyondan sonra, hücreler iki farklı tipte hücre ölümüne gidebilir. Apoptoz ve nekroz olarak tanımlanan bu ölüm tipleri farklı morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimler ile karakterize edilirler.

Apoptoz, hücrenin morfolojik olarak hücre kromatininin yoğunlaşması ve bu kromatinlerin endonükleaz enzimi ile 180-200 baz çiftine bölünmesi ile tanımlanan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptoz aktif bir süreçtir. Bu süreçten sonra, çekirdek yoğunlaşır, plazmik membranda çıkıntı oluşur ve sitoplazma tomurcuklanır, apoptotik hücreler oluşur. DNA'nın parçalanması ile birlikte, hücre membranı fosfotidilserinin dışta kalması ile fosfotidik simetrisini kaybeder. Hücrede pro-apoptotik uyarıya bağlı olarak farklı apoptotik yollar gözlenir. Bütün apoptotik yollarda mitokondri merkezi bir role sahiptir. Mitokondriye müdahale doğrudan mitokondri veya DNA hasarı ile oluşabildiği gibi Bid ve Bax proteinleri ile diğer pro-apoptotik faktörler üzerinden de gerçekleşmektedir. Mitokondrinin hasarı Apaf-1 ile etkileşen sitokrom c'nin salınmasına ve kaspaz sinyal yolağının aktivatörü olan apoptozomun oluşumuna neden olmaktadır. Etkör kaspazların aktivasyonu, endonükleazların aktifleşerek DNA'nın bozulmasına ve PARP bölünmesiyle DNA onarımının engellenmesine neden olur (Şekil 16). Eğer DNA doğrudan hasar görürse, p53 proteinleri aktive olur. Bu durum, Bax gibi pro-apoptotik proteinlerin aktive olması ile apoptozun başlamasına neden olur. Diğer yandan, p53 proteini, hücre döngüsünü başlatan ve

hücre sağ kalımı için DNA'nın onarılmasını sağlayan p21 proteinlerinin aktivasyonunu sağlayarak apoptozun önlenmesinde önemli bir role sahiptir. Apoptozu başlatan FDT, mitokondrideki sitokrom c'nin sitozol içerisine salınması ve bunun sonucunda apoptozom ve prokaspaz 3'ün aktivasyonu ile devam eden olaylar zinciri ile karakterize edilir. Sitokrom c'nin salınması ile başlayan hücre ölümü sinyal yolağı Bcl-2 protein ailesi (pro-apoptotik-Bax, Bak, anti-apoptotik-Bcl-2 vb) ile düzenlenir (Bentley ve Pepper, 2000) (Şekil 16).



Şekil 16. Apoptotik yolların şematik gösterimi (Bentley ve Pepper, 2000).

Nekrotik hücre ölümü hücrenin sitoplazmik olarak şişmesi, hücre organellerinin parçalanması, piknotik nükleus, hücre membranı ve hücre bütünlüğünün bozulması gibi fiziksel olaylarla tanımlı programlanmamış hücre ölümüdür (Danial ve Korsmeyer, 2004; Kitsis ve Molkenin, 2010). Nekroz; pasif ve dejeneratif bir süreçtir. Nekroz oluşumu sitotoksik bir ajanın büyük oranlarda hücre içine alınımı ile meydana gelir. Nekrotik ayrışma temelde proteolitik bir aktivitedir ve hücrede yapısal ve fonksiyonel proteinlerin yıkılmasına neden olur. FDT uygulamadan sonra hücrelerde nekroza neden olan parametrelerin çalışılması apoptoz çalışmalarından daha zordur.

FDT'den sonra hücre ölümünde gözlenen apoptoz ve nekrozun belirlenmesinde en önemli faktörler; hücre tipi, sensitif ajanın hücre içindeki lokalizasyonu, uygulanan ışığın şiddeti ve dozu ve oksijenin kısmi basıncıdır (Buytaert ve ark, 2007). Yüksek dozda FDT

(yüksek ajan konsantrasyonu, yüksek ışık şiddeti veya her ikisi) uygulanması sonucu hücreler nekroza giderken, düşük doz uygulanmasında ise hücrelerde apoptoz görülmektedir. Nagata ve ark. yaptıkları bir çalışmada ATX-10 sensitif ajanı kullanarak malign melanom kanserindeki etkilerini incelemişler, sonuçta ışığın şiddetine bağlı olarak hücrelerin apoptoza ve nekroza gittiğini ifade etmişlerdir (Nagata ve ark, 2003). FDT'nin neden olduğu apoptozun genel özelliği apoptozom ve prokaspaz 3'ün aktivasyonu sonrasında sitozolden mitokondriyal sitokrom c'nin hızla salınmasıdır. Fotosensitif ajanın plazma membranına lokalize olmasıyla birlikte fotosensitizasyon süreci, hızlı bir şekilde plazma membran bütünlüğünün kaybolmasına ve hücre içi ATP'nin hızla tükenmesine bağlı olarak nekrotik hücre ölümüne neden olabilmektedir (Kessel ve Poretz, 2000). Ayrıca, ışık şiddetinin yüksek olması sonucu diğer apoptotik kaspaz bileşenleri ve gerekli enzimler fotokimyasal olarak etkisiz hale gelebilirler. Fitalosiyaninin ışık etkisinde Mcf7 meme kanseri hücrelerinin kaspaz 3 aktiviteleri incelenmiş ve sonuçta apoptotik indikatörlerin sadece kaspaz ekspres eden hücrelerde olmasına rağmen klonogenik değerlendirmeler neticesinde sitotoksosite değerlerinin bütün hücrelerde eşit olduğu ileri sürülmüştür (Xue ve ark, 2001).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Yöntemi

Prostat kanseri hücre hatları olan PC3 ve LNCaP kullanılarak oluşturulan kanser modelinde kullanılan malzemeler ve cihazlar sırasıyla Tablo 4 ve 5'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Hücre kültüründe kullanılan malzemeler

Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler	Malzemenin Adı	Firma
	RPMI-1640 Besiyeri	(Sigma)
	L-Glutamin	(Sigma)
	Penisilin-Streptomisin	(Sigma)
	Tripsin-EDTA	(Sigma)
	Fötal Dana Serumu	(Sigma)
	Dimetil sülfoksit DMSO	(Sigma)
	Propidyum İyodür	(Sigma)
	Hoechst Boya-33342	(ThermoFisher)
	Muse® Oksidatif Stress Kit	(Merck Millipore)
	Lipid peroksidasyon kit	(Sigma)
	Glutasyon kit	(Sigma)
	Superoksid dismutaz kit	(Sigma)
	Katalaz kiti	(Sigma)
	ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep Sistemi	(ABM Inc.)
	EasyScript™ cDNA Sentez kiti	(ABM Inc.)
	Hücre kültür pleyti	(Falcon)
	Santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml)	(Sigma)

Hücre dondurma tüpleri	(Sigma)
6 kuyucuklu hücre kültür kabı	(Sigma)
24 kuyucuklu hücre kültür kabı	(Sigma)
48 kuyucuklu hücre kültür kabı	(Sigma)
Steril serological pipet	(Sigma)
Steril mikropipet uçları (10, 100, 200, 1000 µl)	(Sigma)
Otomatik mikropipetler	(Sigma)
Thoma Lamı	(Sigma)
Eppendorf Tüp	(Sigma)

Tablo 5. Hücre kültüründe kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Markası
Santrifüj	(Eppendorf)
Mikro santrifüj	(Eppendorf)
Class II LaminAir	(Labcon)
Işık mikroskobu	(Olympos)
CO ₂ inkübatörü	(Nuair)
Sıvı azot tankı	(Thermo)
Buzdolabı	(Beko)
Laboratuar tipi derin dondurucu	(Termo)
Vortex	(Merck)
Su banyosu	(Mammert)
Derin dondurucu(-20)	(Beko)
Western Blot Seti	(Biorad)
Step one Real-Time PCR Sistemi	(Applied Biosystems)

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada androjenden bağımsız PC3 prostat kanseri hücre hattı ile androjene duyarlı LNCaP prostat kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Her iki hücre hattı da insandan elde edilmiş hatlar olup her ikisi de yapışarak üreyen hücre hatlarıdır.

3.1.2. Besiyerinin Hazırlanması ve Hücrelerin Çoğaltılması

Bu çalışmada kullanılan PC3 ve LNCaP hücrelerinin canlılıklarını sürdürebilmesi için RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. Kullanılan besiyerinin içeriğinde %10 FCS, %1 Penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin bulunmaktadır. Hazırlanan besiyeri filtreden geçirilerek 50 ml'lik falkon tüplere alınmış ve +4°C'de saklanmıştır. Besiyeri hazırlandıktan sonra dondurulmuş olarak temin edilen hücre dizinleri, 37°C'lik su banyosunda 1-2 dakikada yavaşça çalkalanarak hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Ardından hücre süspansiyonu tüp içeriği 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 3-4 ml ılık taze besiyeri ilave edilmiş ve 800 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet taze besi yerinde resüspanse edilip hücreler kültür şişelerine aktarılmıştır. Hücrelerin proliferasyonu, pasajlanmaları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlenmiş ve hücreler kendileri için uygun kültür ortamı olan 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyona bırakılan hücreler her gün kontrol edilmiş ve konfluent duruma gelen hücreler için pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hücre hatları yapışarak üreyen hücreler oldukları için pasajlama öncesinde 0,75 ml tripsin-EDTA ilave edilerek 5 dakika inkübe edilmiş bu sayede hücrelerin kalkması sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra hücre süspansiyonuna 5ml taze besi yeri eklenerek hücreler mikropipet yardımıyla resüspanse edilmiş ve ardından 5 dk 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant atılmış ve pellet 5 ml taze besi yeri ile nazikçe pipetlenerek flaslara alınmıştır.

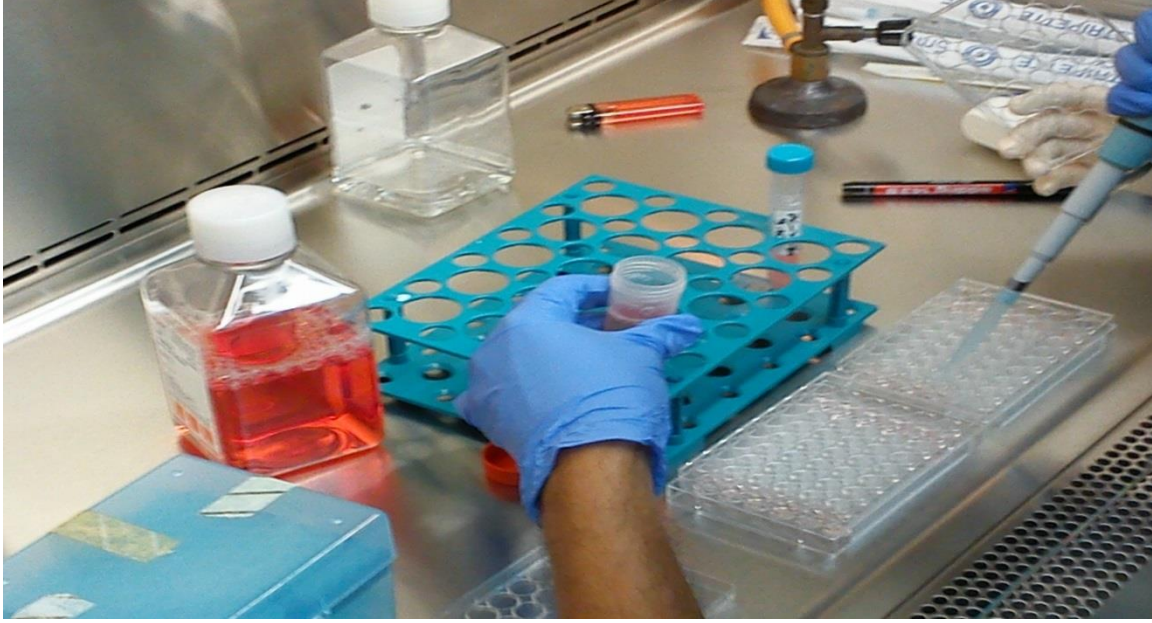
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücreler pasajlama işlemi sırasında tripsin ile kaldırılıp 15 ml' lik falkon içerisine alınmıştır ve 800 rpm' de, 4°C' de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atıldıktan sonra falkon içerisine taze besiyeri, DMSO ve FBS eklenip pelet homojen hale getirilmiş ve hücre içeriği dondurma tüplerine alınmıştır. Tüpler -80°C' de bir gece muhafaza edildikten sonra likit nitrojen tankında -196 °C' de saklanmıştır.

Hücreler -196°C' den alınıp su banyosunda (37 °C) çözüldükten sonra hücre süspansiyonu 15 ml' lik falkon içerisine alınmıştır. Hücre süspansiyonu üzerine besiyeri ilave edilerek hücreler seyreltilmiştir ve 800 rpm' de 5 dk. santrifüj edilerek yıkanması sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılıp elde edilen pelet üzerine taze besiyeri eklenerek pelet homojen hale getirilmiş ve flaslara alınıp kültürün devamı sağlanmıştır.

3.1.4. Hücre Sayımı ve Deney Düzeneginin Kurulması

Deney düzenegi için yeterli sayıya ulaştığı düşünölen hücreler yine tripsin-EDTA ile muamele edilip santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış, pellet üzerine taze besiyeri eklenerek hücreler mikropipet yardımıyla nazikçe pipetlenmiştir. Ardından hücreler hücre canlılığı testleri için ml'de 100.000 hücre olacak şekilde 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına, diğer testler için ml'de 1.000.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına aktarılmıştır. Kuyucuklu hücre kültürü kabı hazırlanırken öncelikle kullanılacak olan hücre hattının hücre yoğunluğu Thoma lamı ile sayım yapılarak belirlenmiştir. Hazırlanacak olan kültürün miktarı da göz önünde bulundurularak son konsantrasyon ml'de 100.000 veya 1.000.000 hücre olacak şekilde ayarlanıp bu hesaplamalara göre stok şişeden gerekli miktar alınıp kuyucuklu hücre kültürü kabı içerisine eklenmiştir. Yapılan hücre ekimi sırasında alınan bir fotoğraf Şekil 17'de görölmektedir.

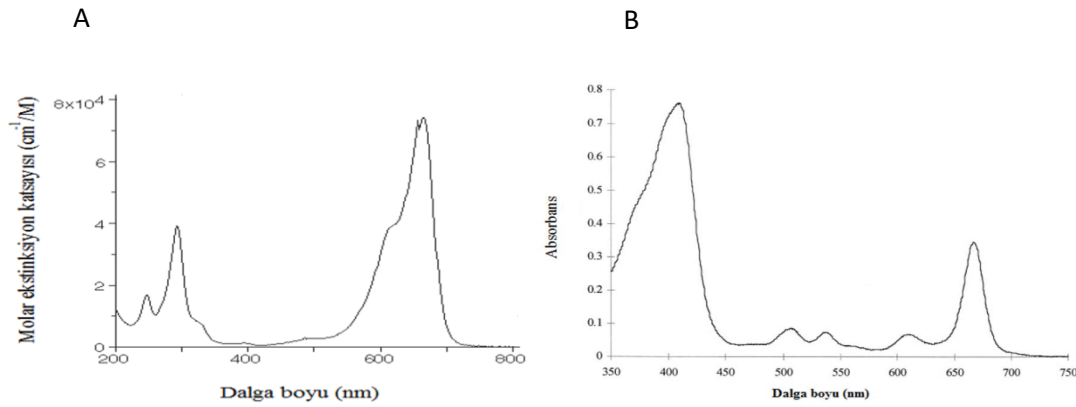


Şekil 17. Deney düzeneği için hücrelerin 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına ekilmesi.

3.1.5. Fotosensitif/Sonosensitif Ajanların Uygulanması

Bu çalışmada kullanılan ikinci nesil ajanlardan biri olan fiyorbid a (PHa), klorofil yıkımında ortaya çıkan bir üründür. Fiyorbid a, 666 nm’de absorpsiyon veren bir ajandır ve aseton ya da DMSO’da çözülmemektedir.

Metilen mavisi ise 550-700 nm (maksimum tepe noktası 664) dalgaboyu aralığında kuvvetli bir soğrulma tepe değeri bulunan, güçlü bir fotodinamik etkinliği olan ucuz bir boyadır. Fiyorbid a ve metilen mavisinin etonolde çözülmüş spektrumları Şekil 18’de gösterilmiştir.

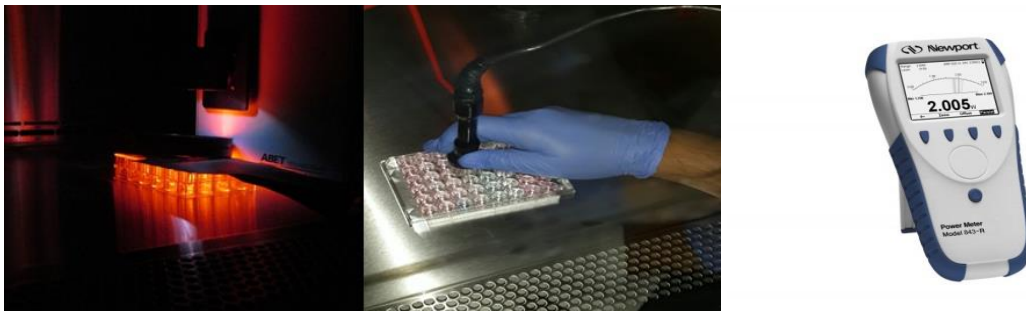


Şekil 18. Etonolde çözülmüş A) PHa’nın spektrumu B) MB’nin moleküler yapısı (https://en.wikipedia.org/wiki/Pheophorbide_A; Elmorsi, 2011).

Kullanılan ajanların stok solüsyonları 1000 μM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Daha sonra kullanılacak ajanların son konsantrasyonu metilen mavisi için 1-100 μM (1; 5; 10; 25; 50 ve 100 μM), PHa için 0.1-100 μM olacak şekilde seyreltmeler yapılarak kuyucuklu hücre kültürü kabı içerisine alınan hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hazırlanan stok solüsyonlar hücrelere eklenene kadar -20°C 'de karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Stok solüsyonlar her ay yeniden hazırlanmıştır.

3.1.6. Işık ve Ultrases Uygulamaları

Deney düzeneği için 48 veya 24 kuyucuklu hücre kültürü kabına ekilen hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hazırlanan ajanlar belirlenen konsantrasyonlarda kuyucuklara ekilmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. Ajanların inkübasyonundan 2 saat sonra da ışık ve/veya ultrases uygulamaları yapılmıştır. Fotodinamik uygulamalar için ABET marka solar simülatör kullanılmış ve midOpt SP785-105 model kızılötesi dikroik blok filtre ile LP590-105 model kırmızı longpass filtreler kullanılmıştır. Kullanılan filtreler ile uygulanan ışığın dalgaboyu 600-800 nm aralığında olması sağlanmıştır. Işık uygulamasında ışığın gücü Newport marka güç ölçer ile ölçülmüştür. Sonodinamik uygulamalar için ise Sonidel marka SP100 sonoprotör kullanılmıştır. Fotodinamik ve sonodinamik uygulamalar için ışık ve ultrasesin nasıl kullanıldığı ve ışık ölçümlerinde kullanılan cihaz Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 19. Fotodinamik ve sonodinamik uygulamalar ve ışık ölçümlerinde kullanılan araç.

Bunun için ilk olarak deney düzeneği oluşturulmuş, ardından ilaç uygulamasına geçilmiş ve son olarak ışık veya ultrases uygulaması yapılmıştır. Uygulanan ışık ve ultrasesin optimizasyonu için farklı şiddetlerde (0, 0.05, 0.1, 0.20, 0.3, 0.50 W/cm²) ve sürelerde (0, 10, 15, 30, 60 sn) ultrases uygulanarak sonodinamik tedavi için uygun süre ve dozlar belirlenmeye çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmalarının ardından uygulanan ultrases şiddet ve süresi 1 MHz, 0.5 W/cm² ve 60 s olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde fotodinamik uygulamalar için kullanılan ışık kaynağı için uygun süreler dolayısıyla ışığın etkin dozu belirlenmeye çalışılmış ve 0,5 mJ/cm², 1 dakika olarak belirlenmiştir. Bu aşamada deney düzenekleri oluşturulmuş ardından değişik konsantrasyonlarda (0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM) ilaçların ekimi yapılmıştır. İlaç ekiminden iki saat sonra değişik sürelerde ışık uygulaması yapılmış ve hücrelerin canlılık değerleri karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda ışığın dozu Newport powermetre ile belirlenmeye çalışılmıştır. Fotodinamik tedavi için ışık uygulaması şiddeti 10mJ/cm² ve süresi 5 dk olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan deney grupları ise Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan deney grupları.

GRUPLAR		UYGULANAN TEDAVİLER	
KONTROL GRUPLARI	PC-3 tümörlü uygulama yok		LNCaP tümörlü uygulama yapılmayacak olan grup
	PC-3 için sadece metilen mavisi (MB)		LNCaP için sadece metilen mavisi (MB) uygulanan grup
	PC-3 için Sadece Fiyoorbid a		LNCaP için Sadece fiyoorbid a (PHa)
	PC-3 için sadece SDT uygulanacak olan grup		LNCaP için sadece SDT uygulanacak olan grup
	PC-3 için sadece FDT uygulanacak olan grup		LNCaP için sadece FDT uygulanacak olan grup
	PC-3 için SDT + FDT uygulanacak olan grup		LNCaP için SDT + FDT uygulanacak olan grup
GRUP I	PC-3 için MB ve SDT uygulanacak	GRUP VII	LNCaP için MB ve SDT
GRUP II	PC-3 için MB + FDT uygulanacak	GRUP VIII	LNCaP için MB + FDT uygulanacak olan grup
GRUP III	PC-3 için MB + SDT + FDT	GRUP IX	LNCaP için MB + SDT + FDT uygulanacak olan grup
GRUP IV	PC-3 için PHa + SDT	GRUP X	LNCaP için PHa + SDT uygulanacak olan grup
GRUP V	PC-3 için PHa + FDT	GRUP XI	LNCaP için PHa + FDT grup
GRUP VI	PC-3 için PHa + SDT + FDT	GRUP XII	LNCaP için PHa + SDT + FDT grup

3.2. Ölçüm ve Değerlendirmeler

3.2.1. Hücre Canlılığı Testleri

Hücre canlılığına ilişkin testler tedavi uygulamasından 24 saat sonra MTT (3-[4 5-dimethylthiazol-2-yl]-2-5-diphenyltetrazolium bromide) boyası ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre, ilk olarak 5mg/ml MTT boyası tartılmış ve PBS’de çözünmesi sağlanmıştır. Ardından hücrelerin bulunduğu 48 kuyucuklu hücre kültürü kabı inkübatörden çıkartılmış ve her bir kuyucuğa 40 µl MTT boyası eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikropipet yardımıyla hücre süspansiyonu alınmış, kuyucuklara 100 µl DMSO eklenmiş ve spektrofotometrede 560 ve 620 nm’de ölçüm alınmıştır. Elde edilen sonuçlardan aşağıdaki formül kullanılarak uygulamalardan sonraki hücre canlılıkları hesaplanmıştır.

Hücre canlılığı = (tedavi gurubu için OD değeri / kontrol gurubu için OD değeri) X 100.

3.2.2. Apoptoz ve Nekroz Tayini

Sonodinamik ve/veya fotodinamik tedavilerin etki mekanizmasına yönelik bu çalışmada tedavilerden sonra apoptoz veya nekrozun gerçekleşip gerçekleşmediği HOPI boyama tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Bu bağlamda, öncelikle HOPI uygulamaları için kullanılacak boyalar (hoechst ve propidium iyodür) 1:1 oranında ependorf tüp içinde mikropipet yardımıyla karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan boya +4°C’de buzdolabında saklanmıştır. Tedaviler uygulandıktan 24 saat sonra kuyucukların içindeki hücrelerin bulunduğu tüm medyum mikropipet ile çekilmiştir. Ardından 24 kuyucuklu hücre kültürü kabındaki her bir kuyucuğa 150µl tripsin eklenmiş ve 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından yine steril kabinde kuyucuklu hücre kültürü kabındaki her bir kuyucuğa 750 µl taze besi yeri ilave edilmiş ve mikropipet yardımıyla hücreler kaldırılarak ependorf tüplere sırası bozulmadan aktarılmıştır. Ardından ependorflar içindeki hücreler 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından yine mikropipet yardımıyla süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tüplerdeki hücre süspansiyonu 50 µl olacak şekilde bırakılmış üzerlerine 5 µl HOPI boyası eklenmiştir. Tüm tüplere boya ekildikten sonra ependorf tüplerin ağzı kapatılarak ependorf kabına sıralanmış ve kap alüminyum folyo ile kaplanarak 37°C’de %5 CO₂ ve %96 nem içeren ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Son olarak

ependorf tüplerin içindeki hücreler floresans mikroskop altında incelenmiştir. Elde edilen görüntülerden normal hücreler ile apoptotik/nekrotik hücrelerin oranı belirlenmiştir.

3.2.3. Western Blot yöntemi

3.2.3.1. Hücre lizatının hazırlanması ve uygulanması

Hücre lizatı hazırlamak için hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü kabına ml'de 10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ardından ilaç ve tedaviler uygulanmıştır. Tedavilerin uygulanmasından 24 saat sonra hücreler 150 µl tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 750 µl taze besi yeri ile pipetlenmiş ve ependorf tüplere alınmıştır. Tüplerin içindeki hücre solüsyonu 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ardından süpernatant atılmıştır. Daha sonra pellet içine 1 ml hazırlanan lizis tampon solüsyonu eklenmiştir. Lizis tampon ise şu şekilde hazırlanmıştır:

Lizis Tamponu: (Triton-X-100 lizis tamponu): 150 mM NaCl (58,44 g/l moleküler ağırlık)+ 50 mM Tris, pH=8.0 (121,1 g/l moleküler ağırlık)+%1 Triton-X-100+ 0,2-1 mM PMSF+ PIC (Protease Inhibitor Cocktail)

Daha sonra hazırlanan lizat solüsyonundan her 50 µl için 1,25 µl PMSF ve 1,25 µl PIC ilave edilmiş 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek SDS-PAGE elektroforez için buz içinde bekletilmiştir.

Hücre lizatları oluşturulduktan sonra Bradford yöntemiyle jelde yürütülecek hücre lizatı konsantrasyonları belirlenmiştir. Ardından örnekler SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve yürütülmüştür.

3.2.3.2. SDS-PAGE elektroforez

SDS-PAGE elektroforez için hazırlanan solüsyonlar aşağıda verilmiştir.

Stok Çözeltiler	<u>100 ml için</u>	<u>250 ml için</u>
100 ml 4X stracking buffer (Üst jel tamponu):	TRIS BASE 18,7 gr	46.75gr
	ddH ₂ O 80 ml	200 ml
	%20 Sodium dodecylsulfate (SDS) 2 ml	5 ml

Tampon çözelti dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 8.8'e HCl ile ayarlanmıştır. Ardından manyetik karıştırıcıda iyice çözülmüştür. Çözelti hazırlanırken en son SDS eklenmiştir.

	<u>100 ml için</u>	<u>250 ml için</u>
100 ml 4X resolving buffer (Alt jel tamponu):	TRIS BASE 6 gr	15 gr
	ddH ₂ O 65 ml	162.5 ml
	%20 Sodiumdodecylsulfate (SDS) 2 ml	5 ml

Tampon çözelti ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 6.8'e HCl ile ayarlanmıştır.

5X Running buffer 1lt : TRIS BASE 15 gr GLYCINE 94 gr

50 ml % 10 SDS çözeltisi (filtrelendi), 1 litreye dH₂O ile tamamlanmıştır. 1X yapılarak kullanılmıştır. Bunun için, 1X running buffer 1 lt : 200 ml 5X running buffer 1000 ml' ye kadar dH₂O ile tamamlanmıştır.

6X SDS loading dye (yükleme boyası) : 100 ml ddH₂O içerisine, 3 ml 1 M Tris HCl, pH 6.8, 1 mg bromofenol mavisi, 1.5 ml gliserol, 0.6 g SDS eklenmiştir. Filtreden geçirilerek tüplere bölünmüştür. - 80°C' de saklanmıştır.

PVDF Membran Transfer buffer : TRIS BASE 7.25 gr
GLYCINE 3.75 gr

1000 ml'ye kadar dH₂O suyu konmuştur. Manyetik karıştırıcıda çözdürülüp, 250 ml metanol eklenmiştir. +4°C' de saklanmıştır.

1X TBS-Tween 20 ÇÖZELTİSİ :

10X TBS	50 ml
tween 20	0.5 ml

500 ml ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.

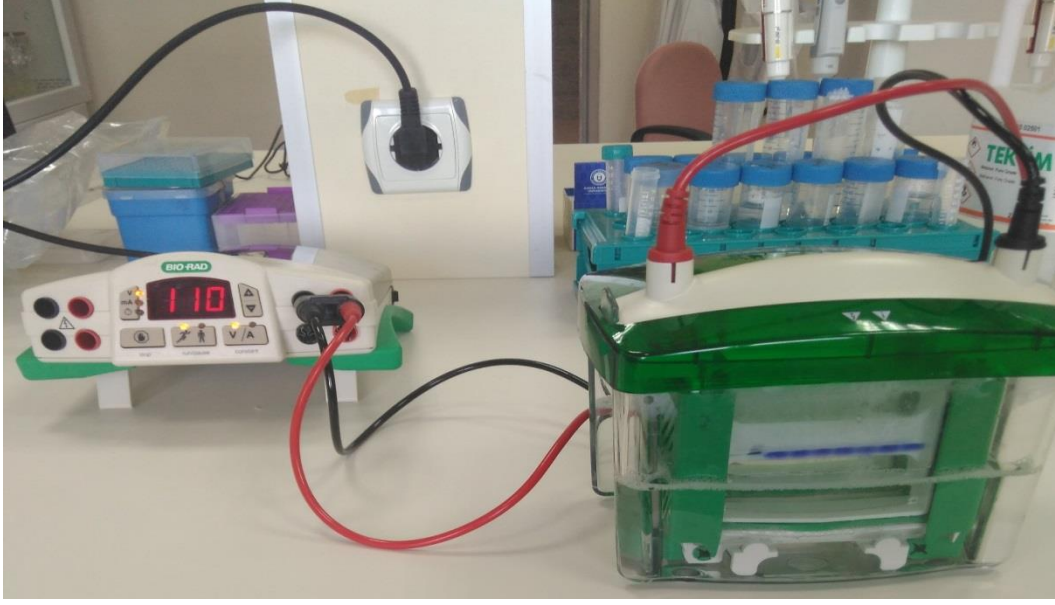
% 10 APS (Amonyum Persülfat): 0,1 gr APS 1 ml dH₂O'da çözülmüştür.

Çözeltiler hazırlandıktan sonra önce %10'luk alt jel hazırlanmış ve donması beklenmiştir. Ardından üst jel hazırlanmıştır. Bu jellerin nasıl hazırlandıkları Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Üst ve alt jellerin hazırlanması için gereken malzemeler ve oranları.

	Resolving jel (Alt Jel)				Stracking (üst jel)
	%7	%10	%12	%15	10 ml'lik
ddH₂O	15 ml	11.55 ml	10.5 ml	7.05 ml	6 ml
Tampon solüsyonu	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	2.5 ml
Akrilamid (29:08)	7.05 ml	10.5 ml	12 ml	15 ml	1.25 ml
%10 SDS	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	100 µl
%10 APS	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	100 µl
Temed	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	10 µl

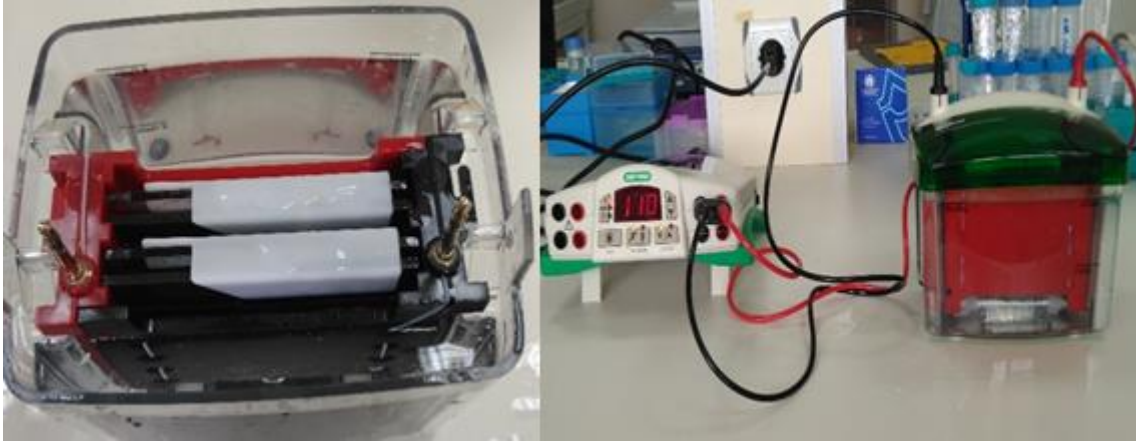
Üst jel donduktan sonra jeller tankın içine konmuş ve üstlerine 1x running buffer eklenmiştir. Daha sonra taraklar çıkartılmış ve hazırlanan kuyulara hem marker hem de buzda bekletilen örnekler yüklenmiştir. Örnekler yüklenmeden önce hazırlanan lizattan ayrı tüplere ve sırası bozulmadan 20 µl alınmış üstüne aynı miktarda SDS yükleme boyası (loading dye) eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan bu örnekler su banyosunda 100°C'de 3 dakika ısıtılmıştır. Örnekler yüklendikten sonra elektroforez tankına yeterli miktarda 1x running buffer eklenmiş ve 110 V'da yaklaşık bir saat yürütülmesi sağlanmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. SDS-PAGE jelinin elektroforezde yürütülmesi.

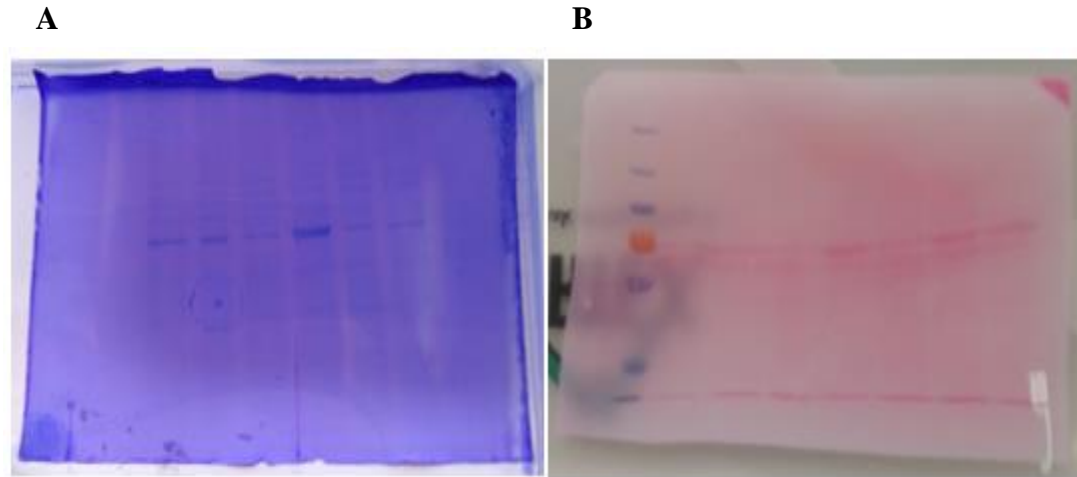
3.2.3.3. Jelin membrana transfer edilmesi

Elektroforez süresi bitince jeller transfer için hazırlanmıştır. Transfer için sandviç aparat, sünger, filtre kağıdı ve membran hazırlanıp hepsi transfer tamponu içerisinde ıslatılmıştır. Yürütülen jel de tampon içerisine alınmıştır. Membran önce saf metanol içerisine alınmış ve kullanılacağı zaman transfer tamponunda ıslatılıp sandviçin içerisine konmuştur. Sandviçin beyaz kısmı alta gelecek şekilde konulup üzerine önce sünger sonra kağıt sonra da membran konmuş ve arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzerine jel yerleştirilmiştir. Jelin üzerine tekrar kağıt ve sünger konulup hazırlanan sandviç transfer kutusuna alınmıştır. Kutu içerisine süngerlerin seviyesine kadar transfer tamponu ilave edilmiştir. Ardından 110 V'da 3 saat transfer işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Membranın transfer edilmesi.

Jel running buffer'dan alındıktan sonra bir kaba konmuş üzerine örtecek kadar commasive-blue eklenmiş ve 30 dk beklenmiştir. İşlem sonunda boya tekrar kullanılmak üzere falkona alınmıştır. Jel üzerine destain çözeltisi (Metanol 75 ml + Asetik asit 25 ml + ddH₂O 150 ml karışımından oluşur) eklenmiştir. 10 dk'da bir destain çözeltisi yenilenip (2-3 kez) son olarak sabaha kadar destainde bırakılmıştır. Ertesi gün bantlara bakılarak jelden proteinlerin düzgün yürüyüp yürümediği tespit edilmiştir (Şekil 22a). Ayrıca başka bir membran da Ponceau S ile boyanarak jelin PVDF membrana transfer olup olmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 22b).



Şekil 22. Membranların A) Commasive-blue ve B) Ponceau S ile boyanması.

Hazırlanan membranların hem jelde iyi yürüdüğü hem de düzgün transfer oldukları belirlendikten sonra tekrar bir düzenek kurulmuş ve yukarıdaki işlemler tekrarlanmıştır. Elde edilen membranlar görüntülenmek üzere transfer tamponundan çıkartılmış ve ilk olarak %5'lik süt tozunda (100 ml 1X TBS-Tween'e - 5 gr süt tozu) poşetlenerek 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak blotlanmıştır. Daha sonra membran % 5 lik süt tozu ile 1:1000 konsantrasyonda hazırlanan primer antikorlarla 2 saat oda sıcaklığında çalkalanarak işaretleme yapılmıştır. Daha sonra 10 dk süreyle 3 defa 1X TBS tamponu ile yıkanmış ve membran anti-rabbit seconder antikorla 2 saat oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Daha sonra 10 dk süreyle 3 defa yıkanarak görüntüleme aşamasına geçilmiştir.

3.2.3.4. Görüntüleme

Son yıkama işleminden sonra membranlar eski bir film üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 23). Üzerine 500 µl ECL (Electrochemiluminescence) damlatılmış ve membran film kasetine yerleştirilmiştir. Karanlık odada ışık kontaminasyonundan kaçınarak membran üzerine yeni film yerleştirilmiştir. 1 dk sonra film makineye koyulmuş ve bantlar gözlenmiştir.



Şekil 23. Membranın ECL sonrası filmde görüntülenmesi aşaması.

3.2.4. RNA izolasyonu ve RT-PCR

Prostat kanser hücrelerinin kontrol ve tedavi gruplarında Wnt yolağı ile ilgili genlerin ekspresyonları Applied Biosystems StepOnePlus kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile kantitasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu, Promega marka ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına hücreler 10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat yapışmaları için bekletilmiştir. Hücreler yapıştıktan sonra tedaviler uygulanmış ve 24 saat hücreler inkübe edilmiştir. 24 saat sonra her bir kuyucuğa kit içinde bulunan BL ve TG çözeltilerinden 250 µl konulup kuyucuklar (kazıyıcı) scraper ile kazınmıştır ve her bir kuyucuk ayrı ependorflara aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine 85 µl %100 izopropanol eklenmiş ve 5 sn vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından her bir örnek minikolon içine alınmış ve 30 sn oda sıcaklığında 15.000 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında minikolon atılmış ve tüpteki sıvı toplama tüpüne alınmıştır. Daha sonra tüpe 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 15.000 rpm'de 5 sn santrifüj edilmiştir. Ardından DNase I inkübasyon karışımı (24 µl Yellow core Buffer, 3 µl MnCl₂, 3 µl DNase I karışımı) minikolondaki membrana eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 200 µl etanol eklenmiş kolon yıkama solüsyonu eklenmiş ve 15.000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Ardından 500 µl RNA yıkama solüsyonu eklenmiş ve 15.000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiş ve yıkama solüsyonuyla toplama tüpü atılmıştır. Ardından yeni toplama tüpüne minikolon yerleştirilmiş ve 300 µl RNA yıkama solüsyonu eklenerek yüksek rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki mini kolon buradan elüsyon tüpüne transfer edilerek üzerine 15 µl Nuclease-free water eklenmiş ve 15.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Son olarak mini kolon atılmış ve elüsyon tüpündeki saf RNA -20°C'de saklanmıştır. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçülmüştür. Nanodrop cihazına 1 µl RNA örneğinden konulup ng/µl cinsinden RNA konsantrasyonu ölçülmüştür. cDNA sentezi sırasında 2 µg RNA kullanılması sağlanmıştır.

3.2.4.2. cDNA sentezi

Elde edilen total RNA'lerden abm EasyScript plus cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi için RNA, primer ve dNTP Tablo 8'de verildiği miktarda karıştırılmıştır.

Tablo 8. cDNA sentezinin ilk aşaması için hazırlanan karışımın içeriği ve hacimleri

Bileşenler	Hacim	Son Miktar
Su	1 µl	
Total RNA	Değişken	2 µg
“Anchored-oligo” primeri (50 pmol/µl)	1 µl	0,5 µM
dNTP mix (10 mM)	1 µl	500 µM

Hazırlanan karışım 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşaması sonrasında cDNA sentezinin ikinci aşaması için gerekli malzemeler Tablo 9'da gösterildiği gibi eklenmiştir.

Tablo 9. cDNA sentezinin ikinci aşaması için eklenen solüsyonlar ve hacimleri

Ajan	Hacim	Son Miktar
5X RT Tamponu	4 µl	1 X
RNAz inhibitörü (40U/µl)	0,5 µl	20 U
OneScript Plus RTase(200U/µl)	1 µl	200 U

Elde edilen reaksiyon karışımı 55°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için sıcaklık 85°C'ye çıkarılmış ve 5 dakika bu sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Böylece istenilen cDNA'lar elde edilmiş ve RT-PCR aşamasına geçilmiştir.

3.2.4.3. RT-PCR protokolü

RT-PCR uygulaması için Applied Biosystems StepOnePlus cihazı ve 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Ekspresyon analizi için Tablo 10'daki karışım hazırlanmıştır.

Tablo 10. Ekspresyon analizi için gerekli karışımın hazırlanması

Etken	Hacim
abm Brightgreen 2X qPCR Master Mix	10 µl
Forward Primer (10 µM)	0,6 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,6 µl
Hazırlanan cDNA	Değişken
Nuclease-free water	20 µl

Tablo 10'da belirtildiği gibi hazırlanan karışım PCR kuyucuklarına 20 µl olacak şekilde dağıtılmıştır ve gerçek zamanlı PCR cihazına konulmuştur. Gerçek zamanlı PCR 95°C'de 10 dakika enzim aktivasyonu (1 döngü), 95°C'de 15 sn standart 3 sn hızlı denatürasyon (40 döngü), 60°C'de 60 sn standart 30 sn hızlı amplifikasyon (40 döngü) koşullarında gerçekleştirilmiştir. RT-PCR prosedürü için kullanılan primerler Tablo 11'de verilmektedir.

Tablo 11. RT-PCR analizi için kullanılan gen dizileri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Wnt3a	CCACACCGTCAGGTA CT	TGTAGCTGGATGGAGTGCAG
Wnt5a	GGGAGGTTGGCTTGAACATA	AGGGCTCAGTGTGAAGAGGA
Wnt7a	CCCACCTTCCTGAAGATCAA	ACAGCACATGAGGTCACAGC
Beta-Catenin	CCATTACA ACTCTCCACAACC	ACCACTAGCCAGTATGATGAG
GSK3B	GCTACCATCCTTATTCCTCCT	ATTCTTTCCAAACGTGACCA
GADPH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTTC

3.2.5. Biyokimyasal Ölçümler

3.2.5.1. Reaktif oksijen türleri miktarının ölçümü

Reaktif oksijen türlerini ölçmek için tüm çalışma grupları daha önce belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Tedaviler uygulandıktan sonra ROS ölçümleri için Muse™ Oksidatif Stres kiti ile Muse Analyser cihazı kullanılmıştır. İlk olarak Muse® oksidatif stres reagent stok solusyonu hazırlamak için kit Assay Buffer ile 1:100 oranında dilüe edilerek ara solüsyon kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan ara solüsyon ile Assay Buffer 1:80 oranında dilüe edilerek çalışmada kullanılacak ana solüsyon hazırlanmıştır. Ardından hücreler kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilip uygun tedavi protokolleri uygulandıktan sonra kuyucuktaki hücreler steril kabin içinde sırası bozulmadan her tüpte 10 µl hücre süspansiyonu ve 190 µl ROS kiti olacak şekilde ependorf tüplere alınmıştır. Tüplerdeki karışım mikropipet yardımıyla 3-5 kere pipetlenerek karışması sağlanmış ve 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Son olarak inkübatörden çıkartılan tüpler muse analyser cihazı ile analiz edilmiştir.

3.2.5.2. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

İlk olarak hücreler patlatıldıktan sonra 800 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Tablo 12’de verilen hacimlerde belirtilen solüsyonların eklenmesiyle ölçüm karışımı hazırlanmıştır. Kuyucuklara öncelikle 20 µl örnek solüsyonu, blank 2, 20 µl distile su (blank 1 ve 3 için) eklenmiştir. Ardından 200 µl Wst working solüsyonu kuyulara ekilmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 20 µl dilüsyon buffer blank 2 ve 3’e eklenmiştir. Ardından 20 µl enzim working solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Tablo 12. Süperoksit dismutaz kitine uygun olarak hazırlanan örnekler

	Örnek	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Örnek solüsyon	20µl		20µl	
dH ₂ O		20µl		20µl
Wst working sol.	200µl	200µl	200µl	200µl
Enzim working sol.	20µl	20µl		
Dilüsyon tamponu			20µl	20µl

Daha sonra kuyucuklu kaptaki hücreler 20 dk 37°C’de inkübe edilmiştir. Son olarak kuyucuklu kaptan mikropate okuyucuda 450 nm’de ölçüm alınmış ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

$$\text{SOD aktivitesi (inhibition rate\%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100.$$

Örneklerin kuyucuklara ekimi ise kitte verilen şekle göre yapılmıştır (Şekil 24).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SOD 200 U/ml		Blank 1			Blank 2			Blank 3			
B	SOD 100 U/ml		SOD 0.05 U/ml			SOD 0.01 U/ml			SOD 0.001 U/ml			
C	SOD 50 U/ml		Sample 1			Sample 7			Sample 13			
D	SOD 20 U/ml		Sample 2			Sample 8			Sample 14			
E	SOD 10 U/ml		Sample 3			Sample 9			Sample 15			
F	SOD 5 U/ml		Sample 4			Sample 10			Sample 16			
G	SOD 1 U/ml		Sample 5			Sample 11			Sample 17			
H	SOD 0.1 U/ml		Sample 6			Sample 12			Sample 18			

Şekil 24. SOD kit ekim prosedürü.

3.2.5.3. İndirgenmiş glutatyon ölçümü

Tüm gruplar oluşturulup tedaviler uygulandıktan sonra hücreler kit içinde yer alan lizis buffer ile patlatılmış ardından 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanmış ve yine 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant atılmış pellete 1ml PBS eklenmiş ve ependorf tüplere alınmıştır. Ardından tüplere lizis solüsyon eklenmiş, vorteks ile karıştırılmış ve 15 dk buz üstünde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 10 dk 15.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından tüplere assay buffer ve GSH solusyonları eklenmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. GSH aktivitesi ölçümü için kullanılan reaksiyon/standart eğri şeması

Örnek	1 mM İndirgenmiş Glutasyon standart çözeltisi (µl)	Bilinmeyen örnek (µl)	Çalışma tamponu (µl)	GST enzimi (µl)	Substrat solüsyonu (µl)
Blank	-	-	92.5	5	2.5
GSH standardı 1.3 nmol	1.3	-	91.0	5	2.5
GSH standardı 2.5 nmol	2.5	-	90.0	5	2.5
GSH standardı 5 nmol	5	-	87.5	5	2.5
GSH standardı 10 nmol	10	-	82.5	5	2.5
Test örneği	-	1-30	92.5 – örnek hacmi	5	2.5

Daha sonra reaksiyonu başlatmak için 2,5 µl substrat solüsyonu eklenmiş ve 37°C’de 60 dk inkübe edilmiştir. Son olarak plate okuyucuda 390-480 nm’de ölçüm alınmıştır.

3.2.5.4. Malondialdehit ölçümü

Malondialdehit (MDA) ölçüm kiti içinde 25 ml MDA lizis buffer, 12,5 ml Phosphotungstic Acid Solution, 1ml BHT, 4 şişe TBA ve 0,1 ml MDA standart solüsyonu bulunmaktadır. İlk olarak hücreler 3µl BHT içeren 300 µl MDA lizis buffer ile homojenize edilmiş ve 15.000 rpm’de 10dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant her tüpte 200 µl olacak şekilde ependorf tüplere alınmıştır. Ardından her tüpe 600 µl TBA eklenmiş ve 95°C’de 60 dk inkübe edilmiştir. Ardından soğuması için buz üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Son olarak örnekler 96’lık kuyucuklu kaplara alınmış ve MDA miktarı 532 nm’de ölçülmüştür.

3.2.5.5. Katalaz aktivitesi ölçümü

Tedaviler uygulandıktan sonra hücreler kit içinde yer alan lizis buffer ile patlatılmış ardından 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanmış ve yine 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant atılmış pellete 1ml PBS eklenmiş ve ependorf tüplere alınmıştır. Ardından tüplere lizis solüsyon eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra dilüsyonları bilinen standartlar ile birlikte her tüpte 200 µl olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmış ve 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve ardından ikincil antikörler eklenmiştir ve 30 dakika oda sıcaklığında beklemeye alınmış ve son olarak elisa okuyucu ile 405 nm de ölçüm alınmıştır. Kullanılan standart eğri ile de CAT ekspresyon düzeyi hesaplaması yapılmıştır.

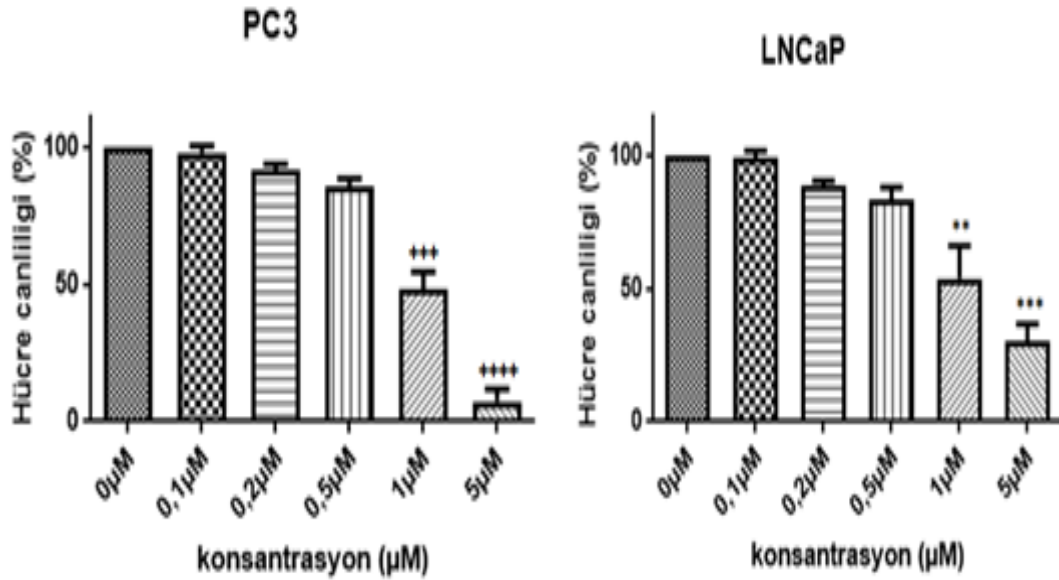
3.2.6. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasında tüm parametrelerin karşılaştırılmasında, Graphpad Prism programı kullanılarak, en az iki grup arasında herhangi bir farklılığın olup olmadığını test etmek için "tek yönlü varyans analizi" (one-way ANOVA) yöntemi ve Dunnet's testi uygulanmıştır ve tüm veriler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirmelerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sayısal değerlerin tümü aritmetik ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir.

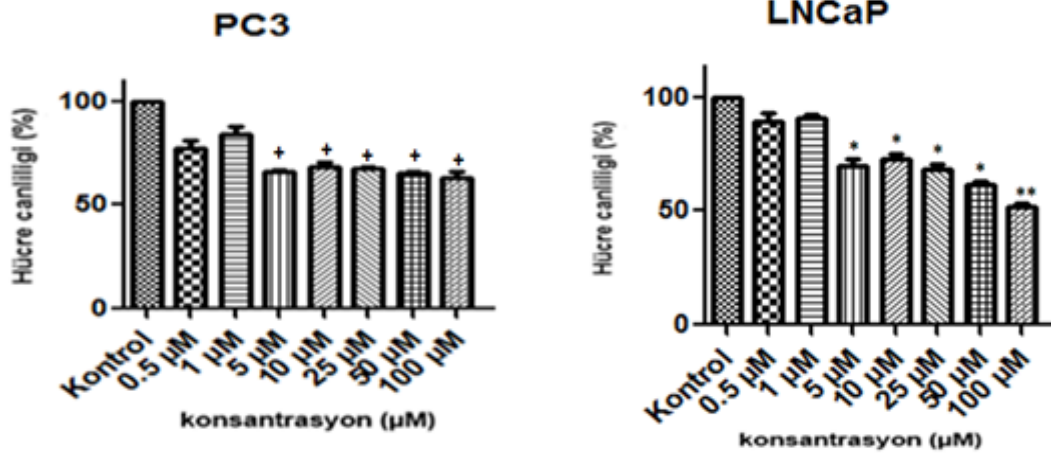
4. BULGULAR

4.1. PC3 ve LNCaP Hücre Dizinlerinde Sonosensitif/Fotosensitif Ajanların Tek Başına Etkinliği

Sono-fotosensitif özellik gösteren fiyorbid a ve metilen mavisi'nin tek başına ve farklı konsantrasyonlarda PC3 ve LNCaP hücre dizinleri canlılığı üzerine olan etkileri Şekil 25 ve 26'da gösterilmiştir. Bunun için 48'lik kuyucuklara her kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde prostat kanseri hücreleri ekilerek, farklı konsantrasyonlarda sadece ilaç uygulaması yapılmış ve kontrol gruplarıyla kıyaslama yapılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra MTT testi protokolleri uygulanmıştır. Yapılan testler 3 kez tekrarlanmış ve her bir grubun absorbans değerleri kontrol grubu değerleri ile normalize edilerek grafikleştirilmiştir.



Şekil 25. Sadece PHA'nın prostat kanseri hücrelerine etkisi (+++p<0.001; ++++p<0.0001; **p<0.01; +++p<0.001).

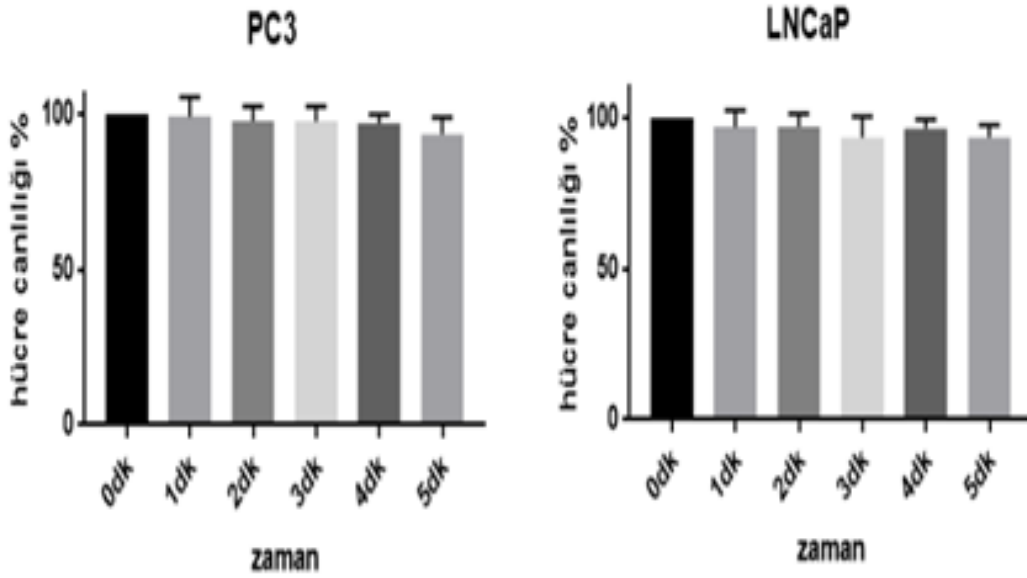


Şekil 26. Sadece MB'sinin hücelere etkisi (+p<0.05; *p<0.05).

Kullanılan ajanlardan PHa'nın farklı konsantrasyonlarda tek başına prostat kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve literatür verileri de (Xodo ve ark, 2012) göz önüne alınarak 0.1-5 µM aralıkta bir uygulama yapılmıştır. Bu bağlamda PHa için etkin doz miktarı 0,25 µM olarak seçilmiştir. MB-aracılı tedavilerde kullanılan konsantrasyon miktarı elde edilen canlılık testlerine göre değerlendirilmiş ve söz konusu doz değeri 10 µM olarak belirlenmiştir.

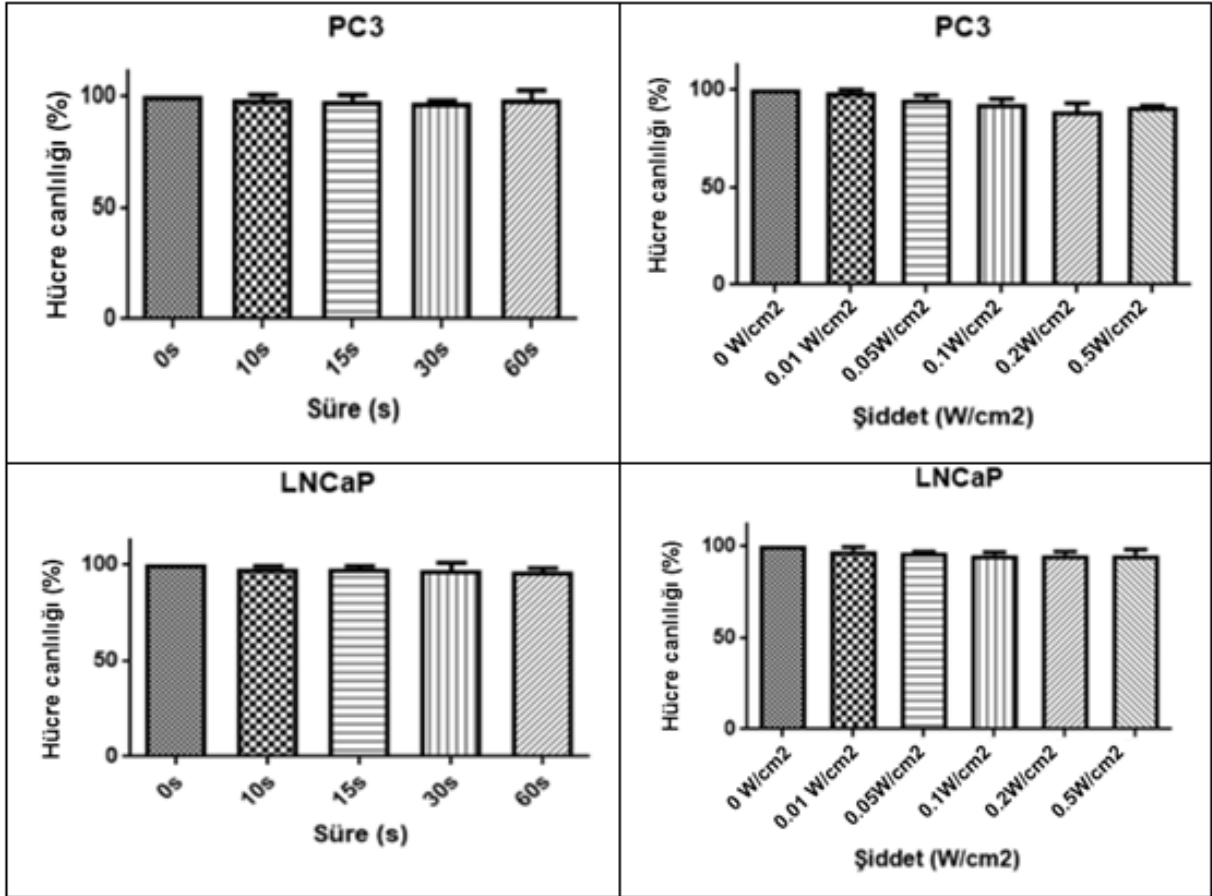
4.2. PC3 ve LNCaP Hücre Dizinlerinde Işık ve Ultrasesin Tek Başına Etkinliği

Hücre kültürü ortamında çoğaltılan prostat kanser hücre dizinleri PC3 ve LNCaP hücre dizinlerine farklı sürelerde sadece ışığın, farklı süre ve şiddetlerde sadece ultrasesin etkileri MTT testi ile incelenmiştir. Bununla birlikte ışık uygulamaları için Abet Solar simülatör kullanılmıştır. Kullanılan cihazın çıkış gücü sabit olduğundan sadece farklı süreler kullanılarak uygulama yapılmıştır. Farklı sürelerde (1, 2, 3, 4 ve 5 dk) uygulanan ışığın tek başına hem prostat hem de LNCaP hücrelerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. Işığın tek başına prostat kanseri hücrelerine etkisi.

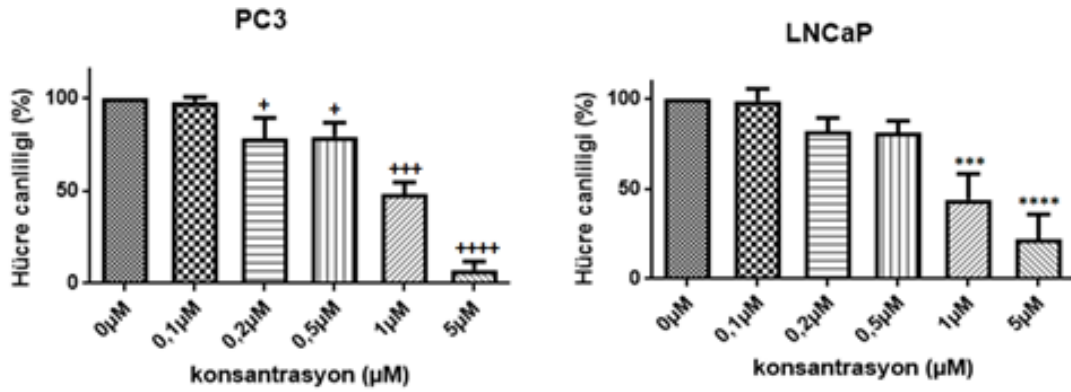
Benzer şekilde PC3 ve LNCaP hücre dizinleri üzerine Sonidel SP100 cihazı ile farklı süre (10, 15, 30, 60s) ve şiddetlerde (0.01, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.5 W/cm²) uygulanan ultrasesin prostat kanseri hücre dizinleri hücre canlılığına tek başına etkileri Şekil 28’de gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere Sonidel SP 100 cihazı kullanılarak PC3 hücre dizinine ve LNCaP hücre dizinine direk ultrases uygulamasının hücrelerin canlılığında önemli bir etkiye sebep olmadığı belirlenmiştir. Benzer etkilerin LNCaP hücre dizinlerinde de gözlemlendiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda ışık uygulamalarında PHa ve MB için seçilen süreler sırasıyla 15 s ve 1 dk; ultrases uygulamalarında her iki ajan için süre 1dk, güç 0.5 W/cm² olarak belirlenmiştir. PHa için 15s ‘nin üstündeki ışık uygulamalarında FDT ve SFDT’nin etkisi maksimum düzeylerde olması bu durumun belirlenmesinde başlıca etkenlerden biridir.



Şekil 28. PC3 ve LNCaP hücrelerine farklı süre ve şiddetlerde tek başına ultrases uygulaması.

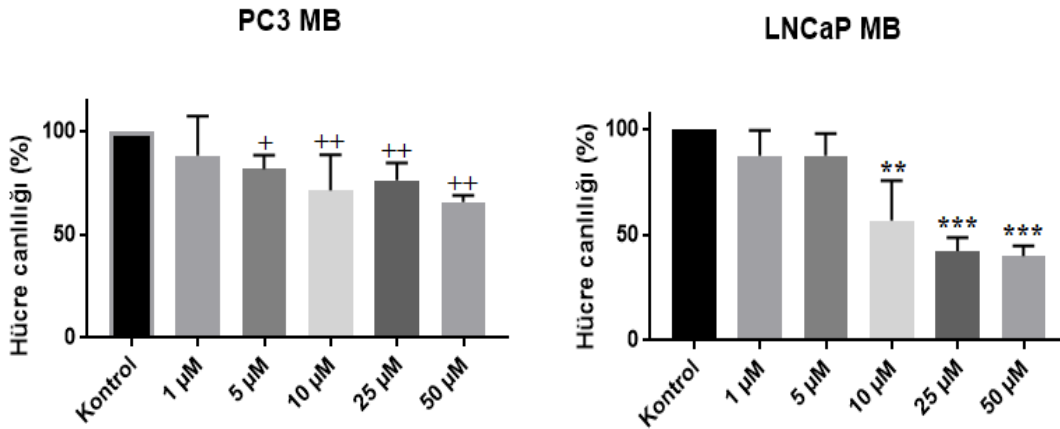
4.3. PC3 ve LNCaP Hücre Dizilerine Sonosensitif Ajan ve Ultrasesin (SDT) Birlikte Uygulanması

Şekil 29’da PC3 ve LNCaP hücre dizilerine uygulanan ultrasesin şiddeti (0.5 W/cm^2) ve süresi (1 dk) sabit kalmak koşuluyla PHa’nın farklı konsantrasyonlardaki PHa’nın SDT etkisi gösterilmiştir. Buna göre, her iki hücrenin canlılığında konsantrasyona bağlı olarak azalmalar olduğu gözlenmiştir. Her iki hücre hattında $1 \mu\text{M}$ PHa konsantrasyonundan itibaren hücrelerin canlılığında %50’nin üstünde azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 29. US şiddeti (0.5 W/cm^2 , 1 dk) sabit tutulmak kaydıyla farklı konsantrasyonlardaki PHa- aracılı SDT'nin hürelere etkisi (+ $p < 0.05$; +++ $p < 0.001$; ++++ $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Benzer şekilde MB'sinin prostat kanseri hücre dizinlerindeki SDT etkisi Şekil 30'da gösterilmiştir. Buna göre LNCaP hücrelerine MB- aracılı SDT uygulandıktan sonra ilacın konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalmalar olduğu gözlenmiştir. Benzer durum PC3 hücrelerinde de gözlenmektedir ancak, 25 µM konsantrasyon uygulanan gruplarda ölçümden kaynaklanan sapmalardan dolayı 10 µM ilaç uygulamasına oranla ufak bir artış olduğu görülmektedir.

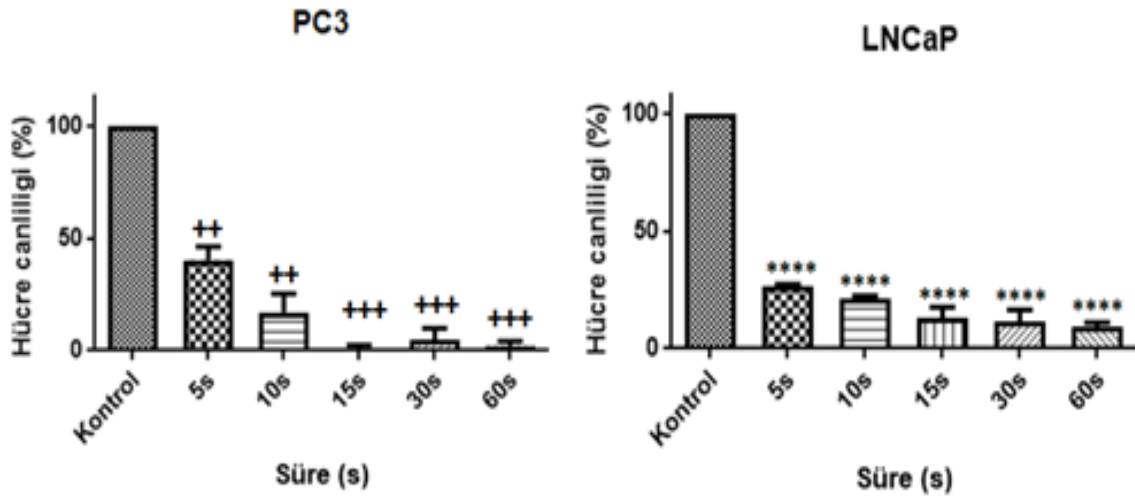


Şekil 30. US şiddeti (0.5 W/cm^2 , 1 dk) sabit tutulmak kaydıyla farklı konsantrasyonlardaki MB- aracılı SDT'nin hürelere etkisi (+ $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

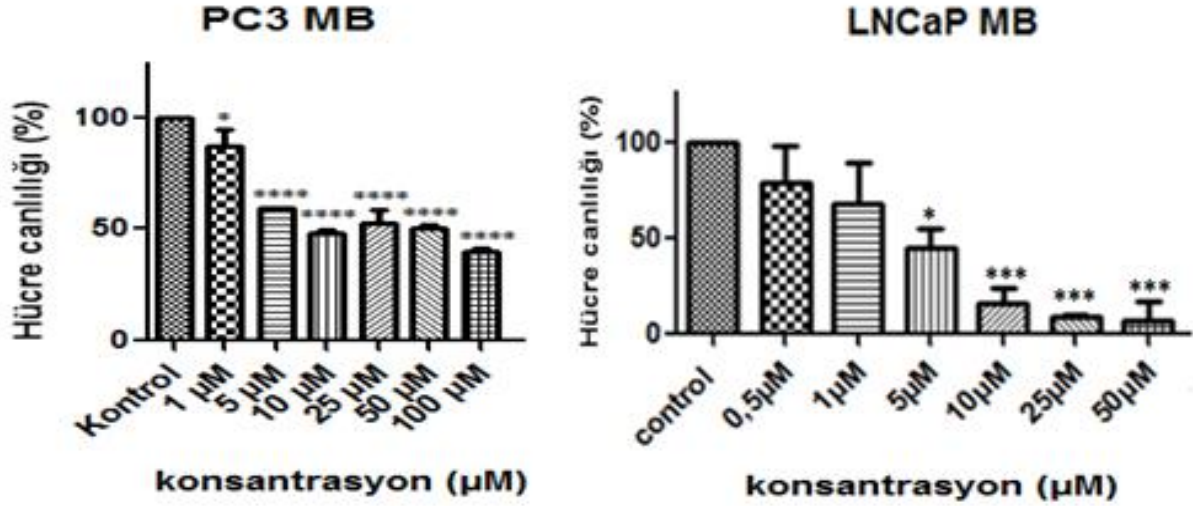
4.4. PC3 ve LNCaP Hücre Dizilerine Fotosensitif Ajan ve (600-800nm) Görünür Işığın Birlikte Uygulanması (FDT)

Prostat kanseri hücre dizilerinde MB ve PHa-aracılı fotodinamik tedavinin etkilerine yönelik denemeler yapılmış ve sonuçlar Şekil 31 ve 32’de gösterilmiştir. Fotodinamik tedavi çalışmalarında ışık kaynağı olarak solar simülasyon cihazı kullanılmıştır.

Prostat kanseri hücrelerine PHa ve MB'nin farklı sürelerdeki ışık ile sinerjik (fotodinamik etki) etkileri gösterilmektedir. Buna göre şekil 31’de gösterildiği üzere prostat kanseri hücrelerine PHa verilmesinden 4 saat sonra farklı sürelerde ışığa maruz bırakılmasının ardından hücrelerin canlılığının süreyle ilişkili olarak azaldığı gösterilmiştir. Şekil 32’de ise ışığa maruz kalma süresi sabit tutularak farklı konsantrasyonlarda uygulanan MB sonrasında konsantrasyona bağlı olarak canlılıkta yine azalmalar olduğu belirtilmiştir. Elde edilen bulgulardan, özellikle PHa-aracılı FDT’nin etkisinin PC3 hücrelerinde daha etkili olduğu görülmüşken, MB-aracılı FDT’nin etkinliği ise LNCaP hücrelerinde daha iyi olduğu belirlenmiştir.



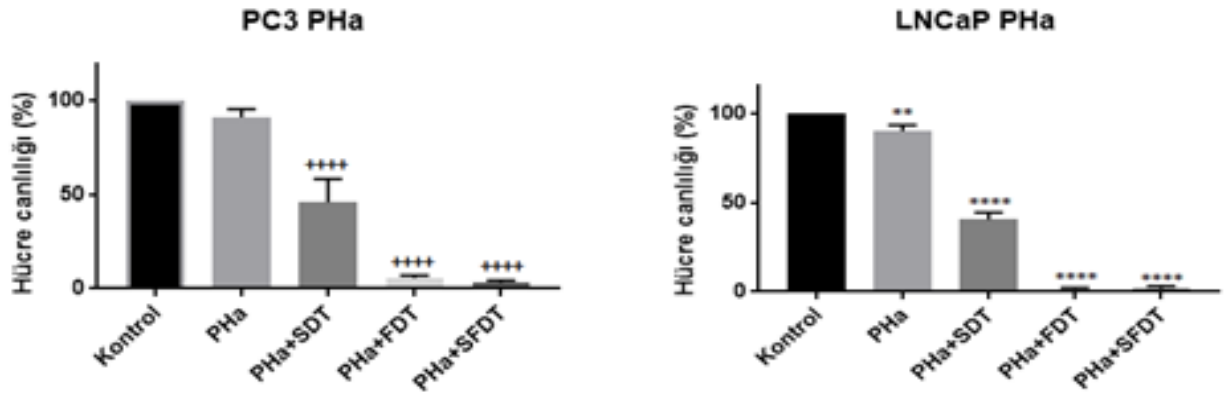
Şekil 31. Farklı sürelerde uygulanan 0.25 µM PHa-aracılı FDT'nin prostat hücrelerine etkisi (++p<0.01; +++p<0.001; ****p<0.0001).



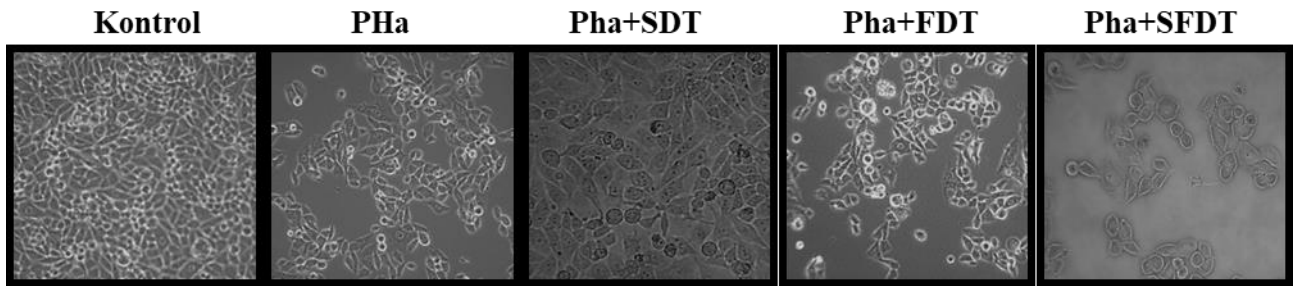
Şekil 32. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan MB-aracılı FDT'nin prostat kanseri hücrelerine etkisi (++++p<0.0001; *p<0.05; ***p<0.001).

4.5. PC3 ve LNCaP Hücrelerine Sono-fotodinamik Tedavilerin Etkisi

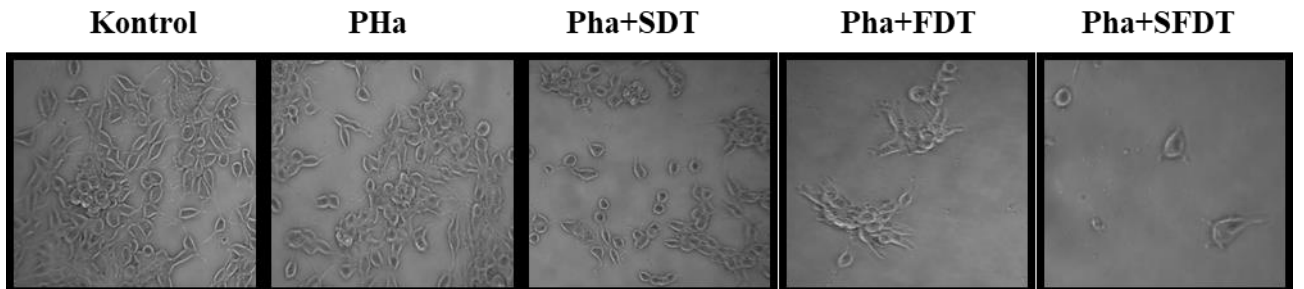
Prostat kanseri hücre dizinlerinde sonodinamik ve fotodinamik tedavilerin etkilerine ayrı ayrı bakıldığı gibi her ikisinin birlikte uygulandıktan sonra sono-fotodinamik tedavi (SFDT) etkisi de incelenmiştir. Bu uygulamada önce ultases, sonrasında ışık uygulaması yapılmıştır. Benzer şekilde önce ışık sonra ses uygulaması yapıldığında ise SFDT'nin etkisi FDT'nin etkisine benzer olduğu gözlenmiştir ancak veri eklenmemiştir. Şekil 33'de prostat kanseri hücrelerine PHa-aracılı tedaviler uygulandıktan sonraki hücre canlılığındaki azalmalar gösterilmiştir. Şekil 34 ve 35'de ise prostat kanseri hücrelerine uygulanan PHa-aracılı tedavilerden 24 saat sonraki morfolojik görüntüler yer almaktadır. Hem MTT sonuçlarından hem de morfolojik görüntüler sonrasında sadece ilaç kullanımından sonra hücre sayısında önemli bir azalma gözlenmezken, özellikle FDT ve SFDT'den sonra hücre canlılığında önemli oranda azalmalar olduğu görülmektedir. Hem morfolojik hem de MTT verileri birbirlerini destekler niteliktedir.



Şekil 33. Prostat kanseri hücre dizinlerinde kontrol grupları ile PHa-aracılı tüm tedavilerin hücre canlılığına etkisi (++++p<0.0001; **p<0.1; ****p<0.0001).

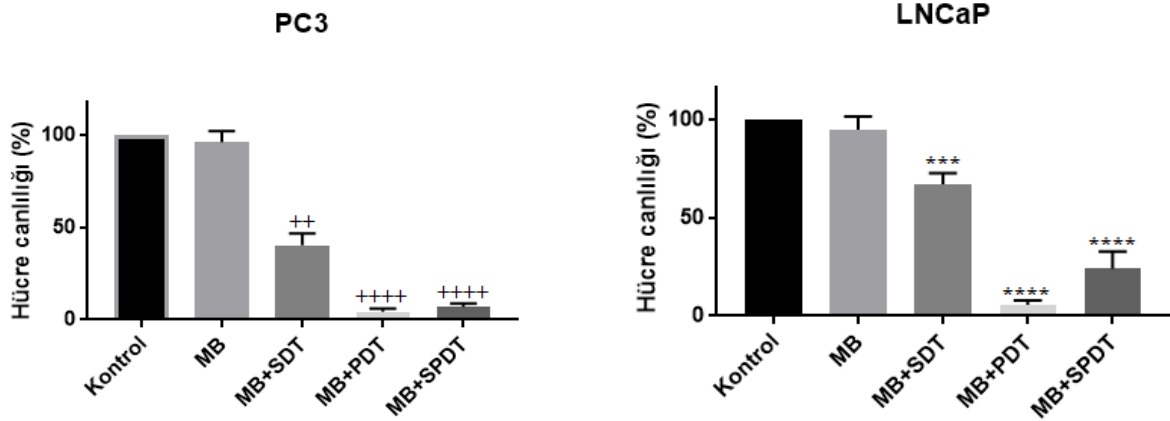


Şekil 34. PC3 prostat kanseri hücre dizininde kontrol, sadece PHa ve tedavi gruplarının morfolojik görüntüleri

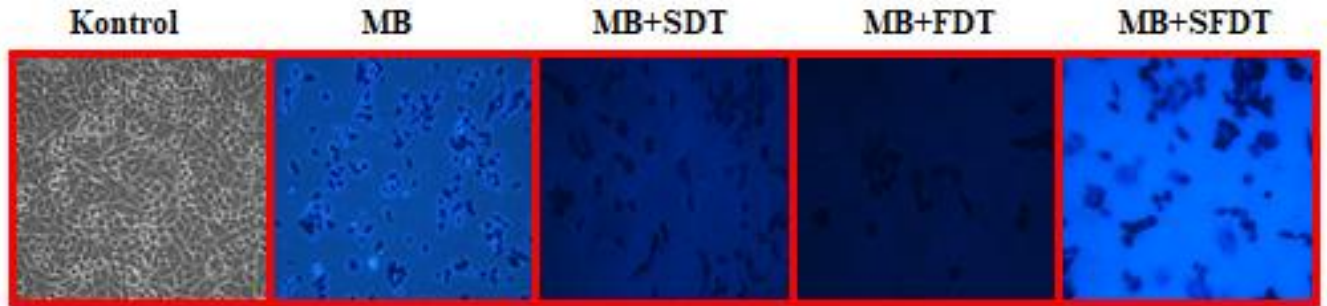


Şekil 35. LNCaP prostat kanseri hücre dizininde kontrol, sadece PHa ve tedavi gruplarının morfolojik görüntüleri

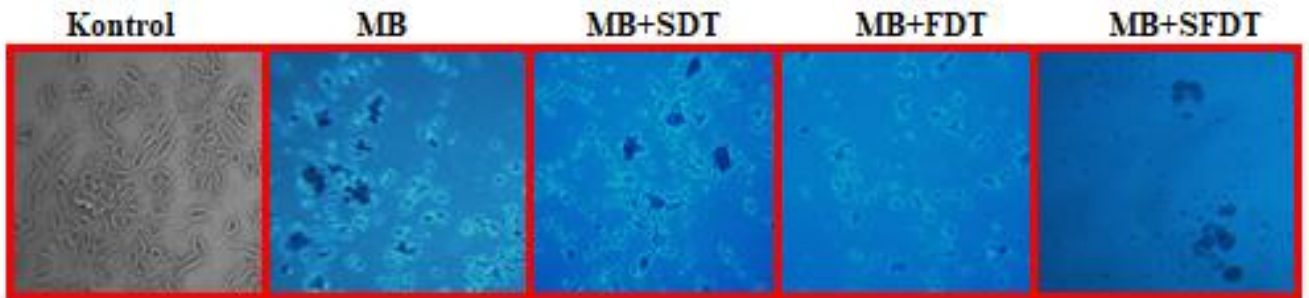
Bu sonuçlara göre, PHa-aracılı SDT tedavisinin PC3 gruplarında %61 oranında bir azalmaya neden olduğu görülürken, PHa aracılı FDT ve SFDT'nin etkisi ise sırasıyla %85, %97 olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde LNCaP hücreleri için bu oran sırasıyla %60, %88 ve %99 olarak belirlenmiştir.



Şekil 36. Prostat kanseri hücre dizinlerinde kontrol grupları ile MB-aracılı tüm tedavilerin hücre canlılığına etkisi (++p<0.01; +++p<0.0001; ***p<0.001; ****p<0.0001).



Şekil 37. PC3 prostat kanseri hücre dizininde kontrol, sadece MB ve tedavi gruplarının morfolojik görüntüleri.



Şekil 38. LNCaP prostat kanseri hücre dizininde kontrol, sadece MB ve tedavi gruplarının morfolojik görüntüleri

MB'nin kullanıldığı uygulamalarda ise benzer durumlar gözlenmiştir. Buna göre MB-aracılı SDT tedavisinin PC3 gruplarında %61 oranında bir azalmaya neden olduğu görülürken, PHa aracılı FDT ve SFDT'nin etkisi ise sırasıyla %85, %97 olduğu belirlenmiştir (Şekil 36). Benzer şekilde LNCaP hücreleri için bu oran sırasıyla %60, %88 ve %99 olarak belirlenmiştir. Bu durum şekil 37 ve 38'de gösterilen hücrelerin morfolojik görüntüleri ile uyumludur. Ancak LNCaP hücreleri için MB aracılı tedavilerde SDT, FDT ve SFDT tedavileri hücre canlılığını sırasıyla %45, %93 ve %87 oranında azalma gözlenirken, PHa aracılı tedavilerde bu oranların daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre her iki hücre hattında FDT ve SFDT sinerjik etkisinin SDT ile kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmektedir.

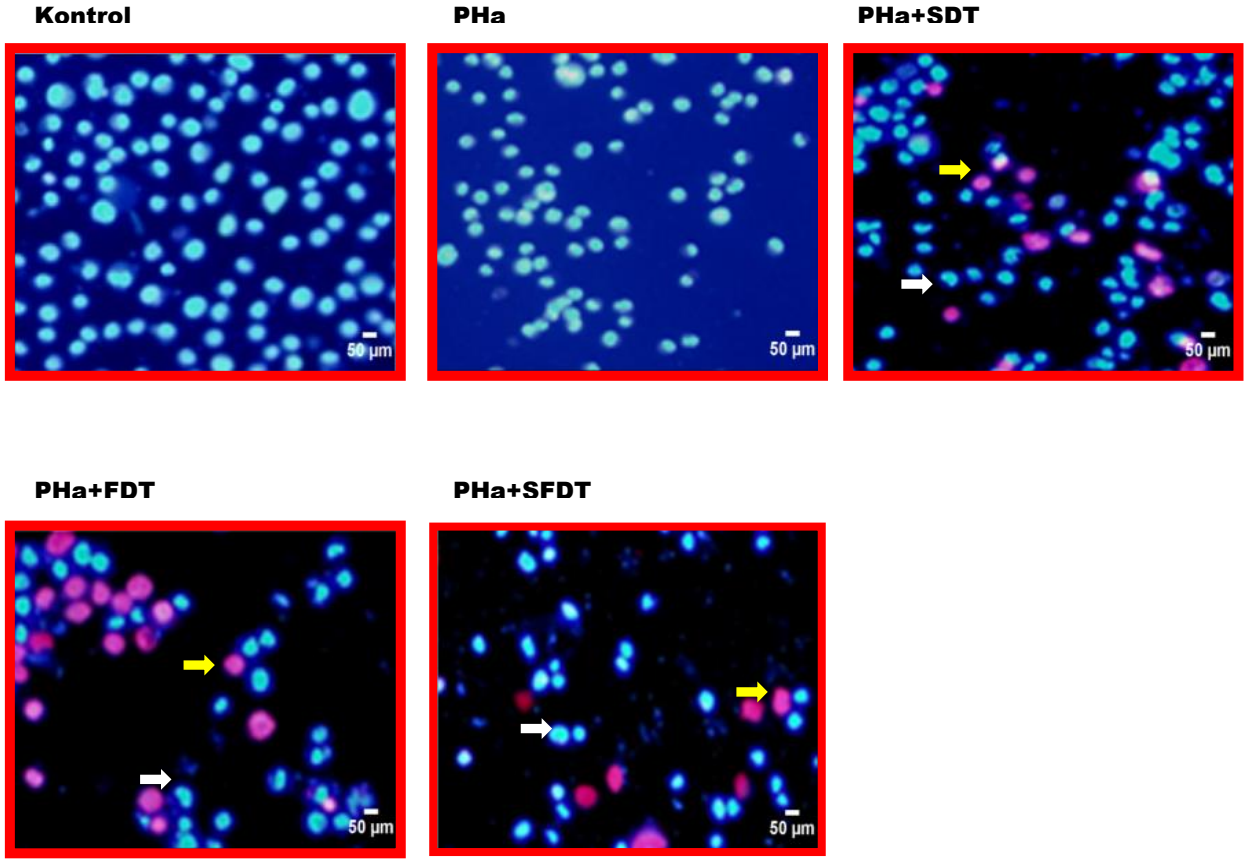
4.6. PC3 ve LNCaP Hücre Dizinlerinde Apoptoz ve Nekroz Tayini Sonuçları

PC3 ve LNCaP hücre dizinlerinde uygulanan tedavilerin dozları belirlenerek etkinliklerinin incelenmesinden ardından uygulanan tedavilerin hücreler üzerindeki etki mekanizmaları incelenmiştir. Bu bağlamda ilk olarak uygulanan tedavilerin etki mekanizmasında apoptoz veya nekroz aktivitesinin rol oynayıp oynamadığını belirlemek için hücre canlılık testlerinden sonra hoechst ve propidiyum iyodid (HOPI) boyama ile ölçümler alınmıştır. HOPI boyaması ile mavi renge boyalı hücreler canlı hücreler olarak değerlendirilirken, mavi ve parçacıklar içeren hücreler ise erken apoptotik hücreleri göstermektedir. Benzer şekilde pembe renk ile boyanan yuvarlak hücreler nekrotik hücreleri işaret ederken, yine pembe renkli ve parçacıklı hücreler ise geç apoptotik hücreleri göstermektedir.

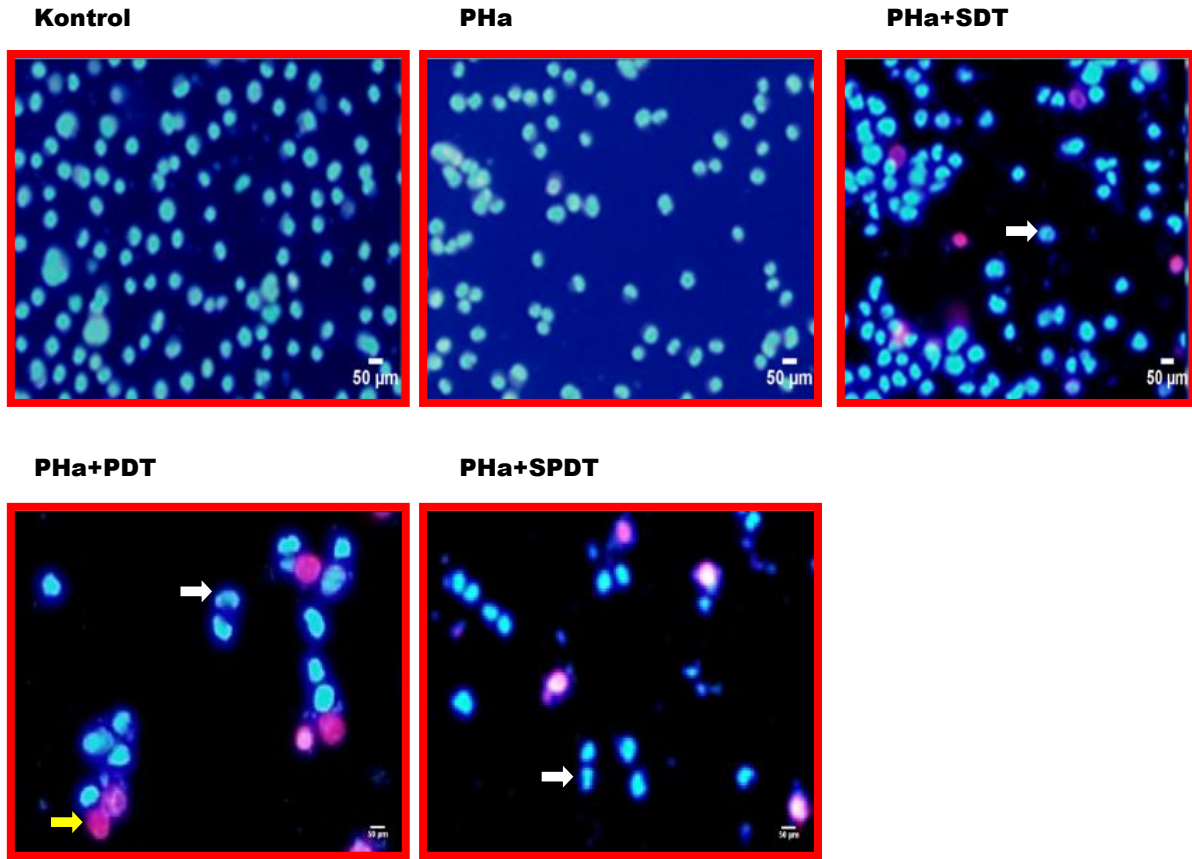
4.6.1. PHa-Aracılı Tedavilerin Prostat Kanseri Hücre Dizinlerine Apoptotik Etkileri

PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücre dizinlerine kontrol, sadece ilaç ve PHa aracılı SDT, FDT ve SFDT uygulamalarından 24 saat sonra hücreler HOPI boyama ile boyanmış ve elde edilen görüntüler Şekil 39 ve 40'ta gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, PC3 hücrelerinde tüm gruplarda uygulanan HOPI boyama sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri kullanılarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler sayılmıştır. Hücrelerin sayımında her bir grup için elde edilen görüntülerden üçünün sayımı kullanılmış ve sonuçlar Şekil 41'de

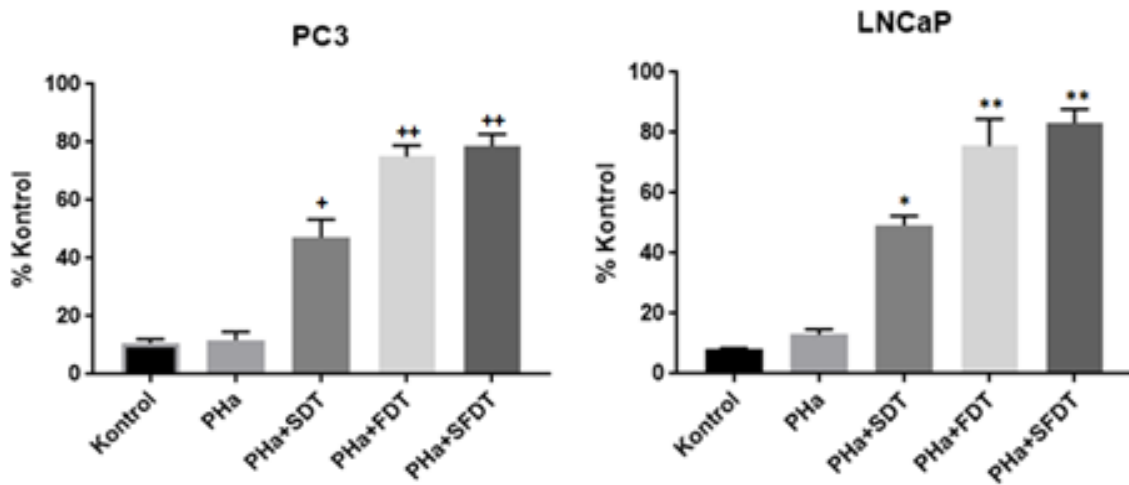
grafikleştirilmiştir. Burada beyaz ok erken apoptotik hücreleri gösterirken, sarı ok nekrotik hücreleri göstermektedir.



Şekil 39. PC3 hücrelerine ait kontrol, sadece ilaç ve PHa-aracılı tedavi gruplarının HOPI görüntüleri.



Şekil 40. LNCaP hücrelerine ait PHa-aracılı tedavilerin ve kontrol gruplarının HOPI görüntüleri.

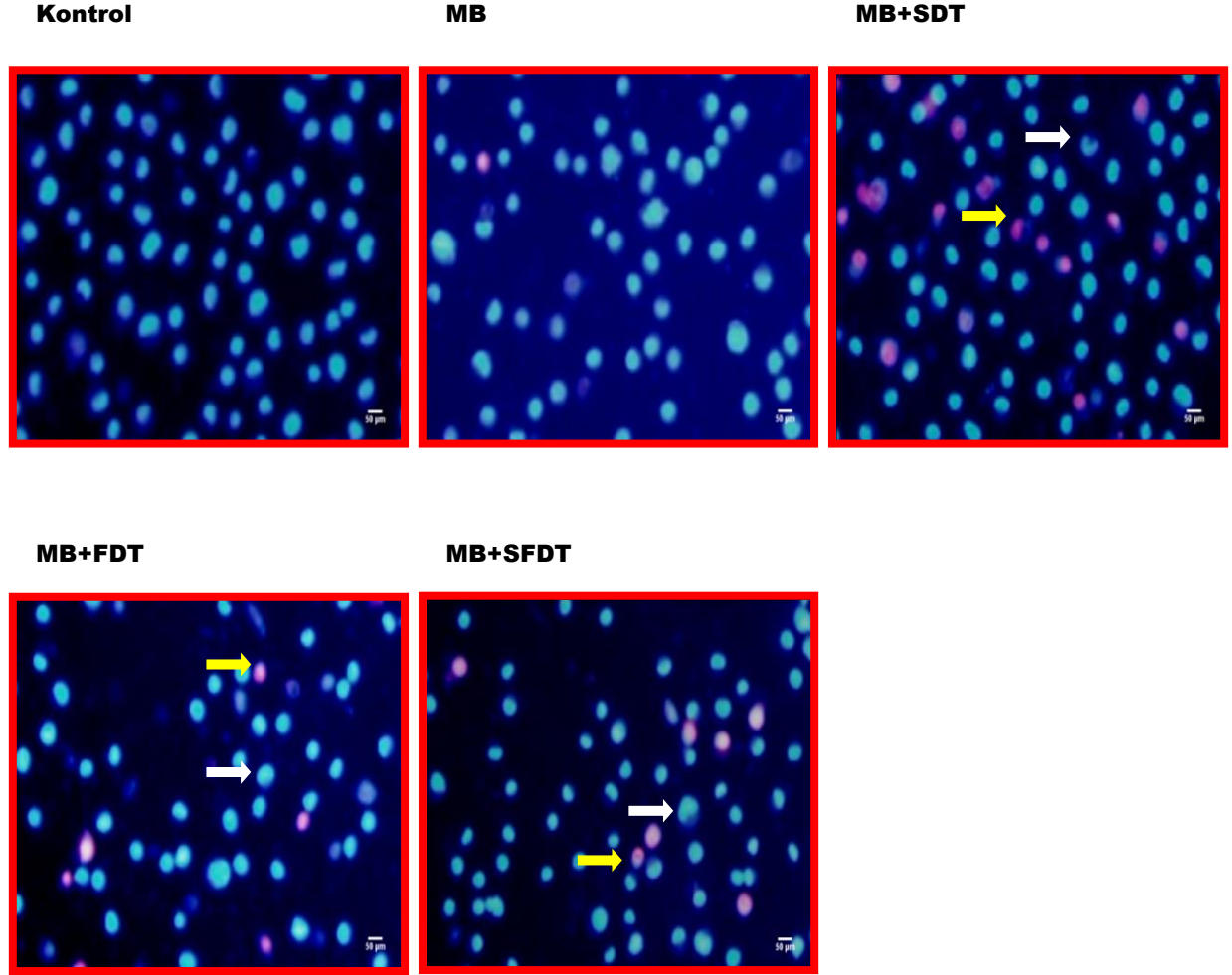


Şekil 41. PC3 ve LNCaP hücrelerine uygulanan PHa-aracılı tedaviler sonrası gözlenen apoptotik hücrelerin kontrol hücrelerine oranı (+ $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Eldeki veriler ışığında her iki hücre hattı için de hiçbir tedavi uygulanmayan; diğer bir ifadeyle sadece ilaç uygulanan gruplarda kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik hücre sayılarında istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmektedir. Buna karşın, tedavi gruplarında ise apoptotik hücre sayılarında önemli oranlarda artış olduğu gözlenmiştir. Özellikle FDT ve SFDT gruplarındaki apoptotik hücre sayısı oranının %80'lere yakın olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte kontrol grubuyla kıyaslandığında; hem negatif kontrol hem de tedavi gruplarında nekrotik hücrelerin sayısı artmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığından veriler teze eklenmemiştir. Elde edilen bu veriler, hem morfolojik hem de MTT sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

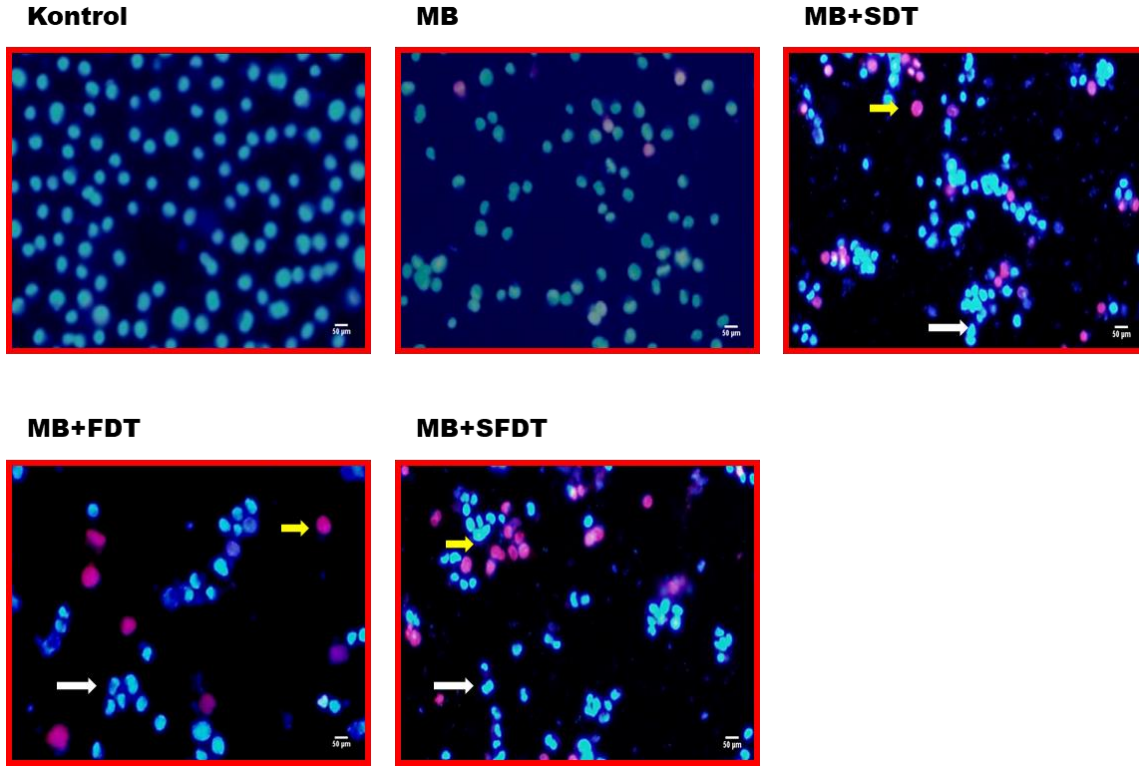
4.6.2. MB-Aracılı Tedavilerin Prostat Kanseri Hücre Dizinlerine Apoptotik Etkileri

Benzer şekilde metilen mavisinin PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücre dizinine SDT, FDT ve SFDT etkilerinin apoptotik mekanizmalarının incelenmesinde yine HOPI boyama yöntemi kullanılmıştır. Şekil 42 ve 43'de sırasıyla PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerine MB aracılı SDT, FDT ve SFDT uygulandıktan sonra elde edilen HOPI boyama görüntüleri görülmektedir. Yine benzer şekilde elde edilen verilerde, sadece ilaç uygulanan gruplarda gözlenen apoptotik ve nekrotik hücre sayısı kontrol hücrelerine kıyasla istatistiksel bir anlam taşımaktadır. Ancak tedavi gruplarındaki apoptotik hücre sayılarında önemli oranda bir artış gözlenmekte olup en yüksek artış yine SDT ve FDT'nin sinerjik etkisi olan SFDT gruplarında gözlenmektedir (Şekil 44). PHa gruplarında olduğu gibi yine tedavi gruplarındaki nekrotik hücrelerin artışı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

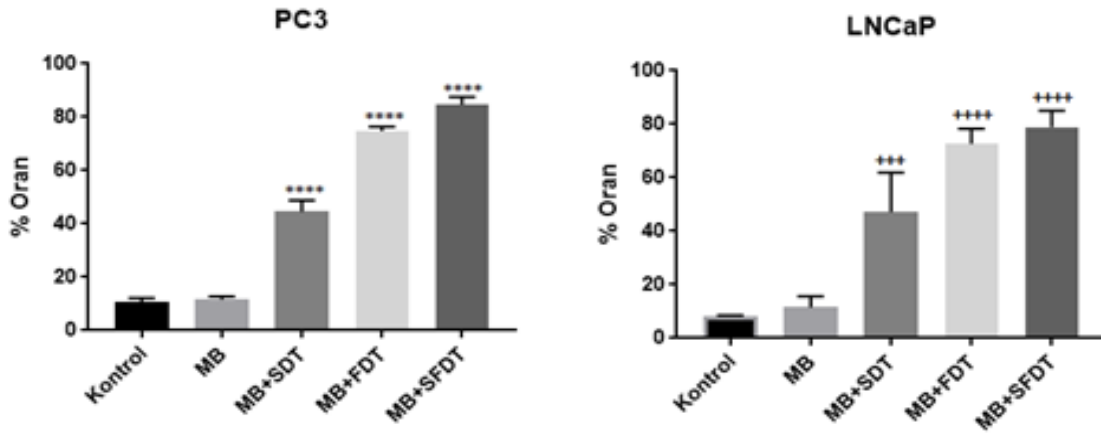


Şekil 42. PC3 hücrelerine ait MB aracılı SDT ve FDT uygulandıktan sonra elde edilen HOPI boyama görüntüleri.

Bununla birlikte MB gruplarında elde edilen HOPI verileri aynı grubun MTT verileri ile uyumluluk göstermektedir.



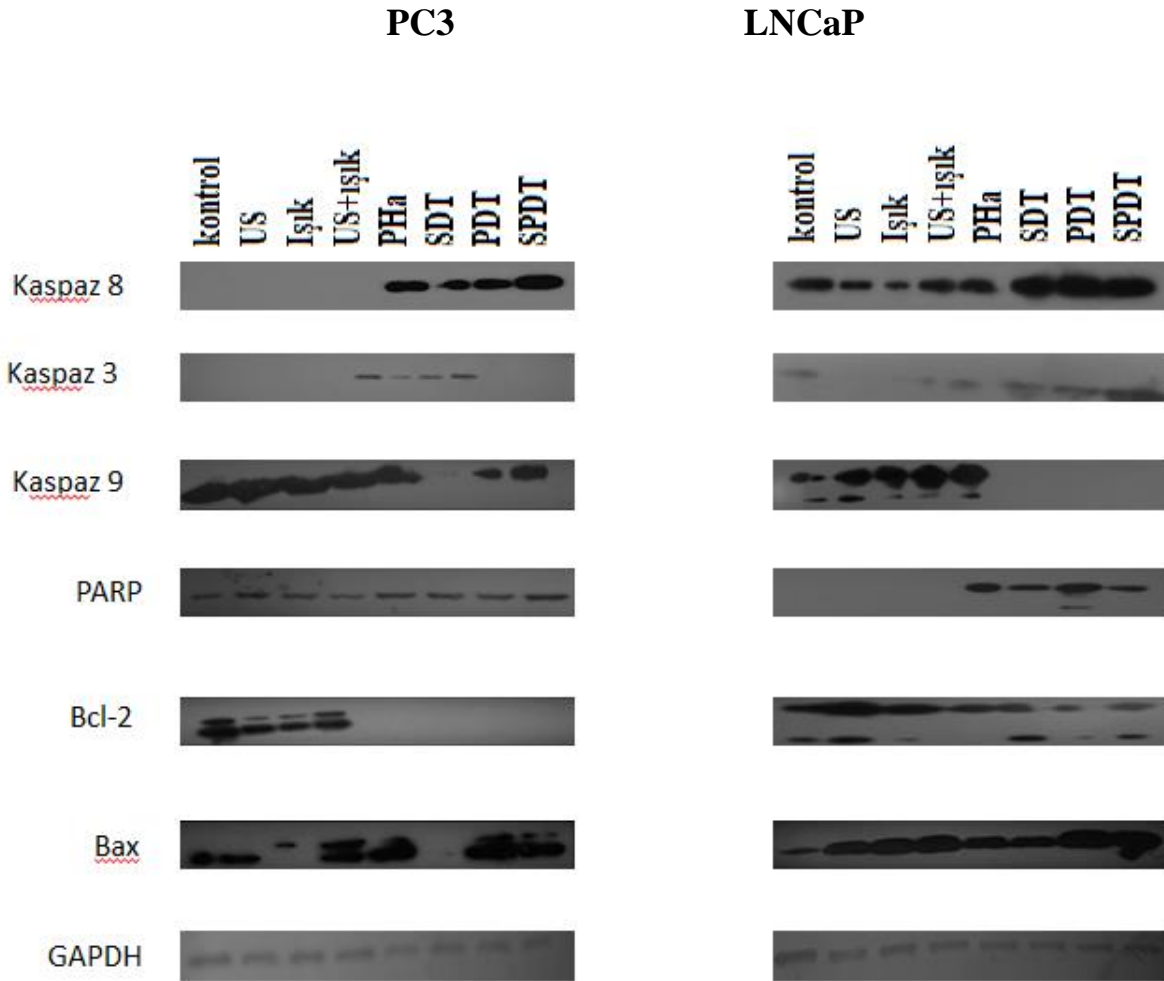
Şekil 43. LNCaP hücrelerine ait MB aracılı tedaviler uygulandıktan sonra elde edilen HOPI1 boyama görüntüleri.



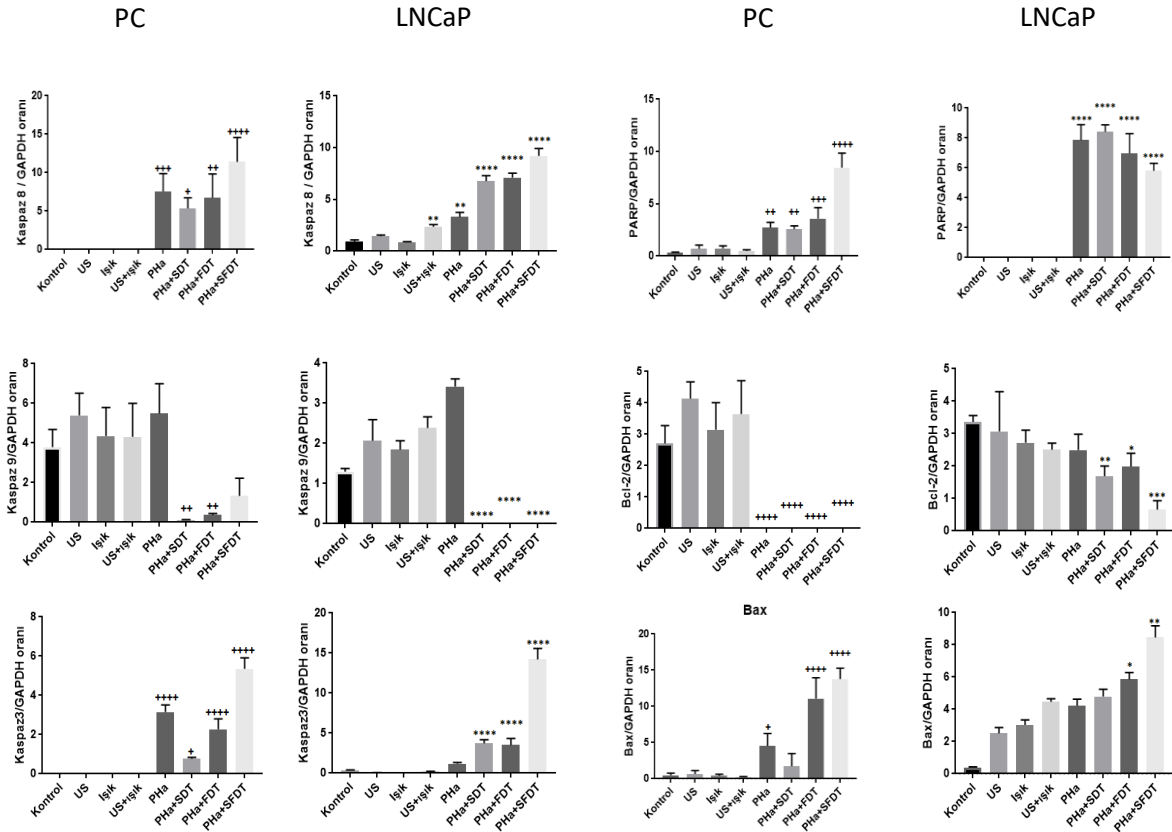
Şekil 44. PC3 ve LNCaP hücrelerine uygulanan MB-aracılı tedaviler sonrası gözlenen apoptotik hücrelerin kontrol hücrelerine oranı (****p<0.0001; +++p<0.001; ++++p<0.0001).

4.7. Prostat Kanseri Hücre Dizilerinde Tedavi Sonrası Western Blot Yöntemi ile Protein Miktarı Tayin Sonuçları

Uygulanan tedavilerin apoptotik mekanizmalarının HOPI boyama ile incelenmesinin ardından, western blot yöntemi ile de tedavilerden sonra gruptaki apoptotik belirteçlerin protein ekspresyon düzeylerindeki değişim incelenmiştir. Bu yöntemde house keeping gen olarak GAPDH gen ifadesi kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler ImageJ programıyla densitometre analizi ile değerlendirilmiş ve elde edilen bant yoğunlukları GAPDH ile normalize edilerek % değerler olarak grafikleştirilmiştir (Şekil 45-46).

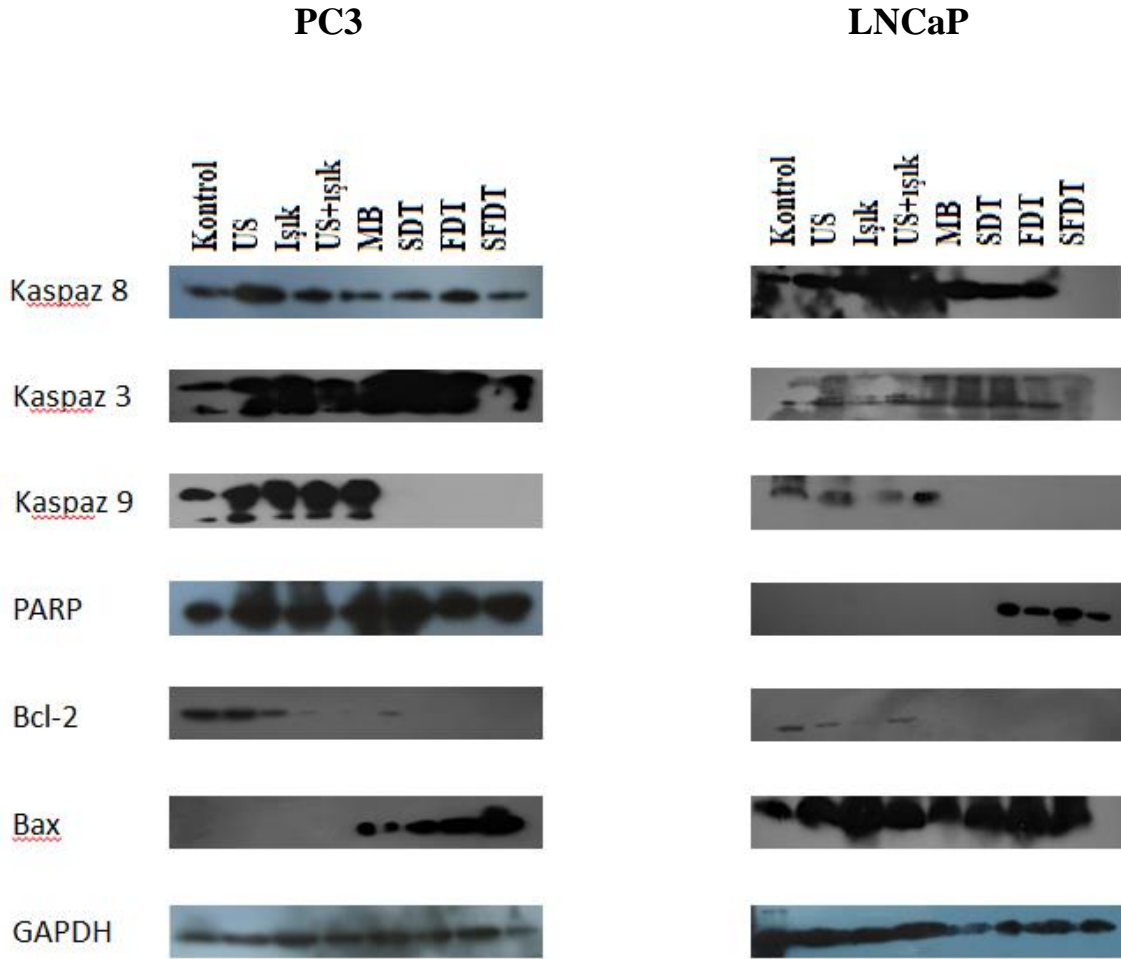


Şekil 45. PHa-aracılı tedavi gruplarının prostat kanseri hücrelerindeki apoptotik proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiminin western blot yöntemi ile gösterimi.



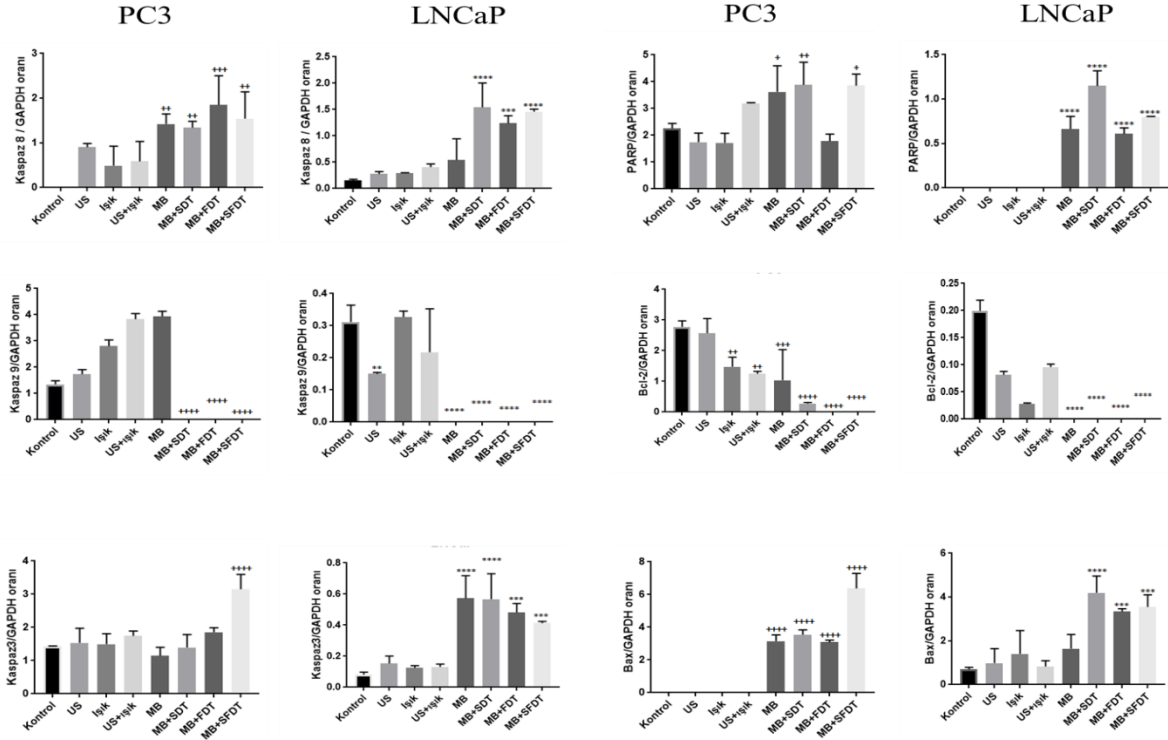
Şekil 46. Prostat kanseri hücre hatlarında PHa-aracılı tedaviler sonrası gözlenen apoptotik belirteçlerin western blot yöntemiyle elde edilen protein ekspresyon seviyelerinin grafiksel gösterimi (+p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001; ++++p<0.0001; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, her iki hücre hattı için de PHa'nın kullanıldığı tedavilerden sonra kaspaz-8, kaspaz-3, PARP ve Bax protein ekspresyon seviyelerinde artış gözlenirken, kaspaz-9 ve Bcl-2 protein ekspresyonlarında azalma olduğu gözlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, SFDT'nin ardından kaspaz-8 protein düzeyindeki artış PC3 hücrelerinde daha fazla olduğu gözlenirken, kaspaz-3 düzeyindeki artış ise LNCaP hücrelerinde daha fazla olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, LNCaP hücre hattında tüm tedavilerin ardından PARP protein ekspresyonundaki artış PC3 hücrelerine göre daha fazla iken, tüm tedavilerden sonra Bcl-2 seviyesindeki azalış ise LNCaP hücrelerinde daha az oranda gerçekleştiği görülmektedir. Protein ekspresyonları seviyelerindeki bu farklılıklar kullanılan hücrelerin androjen bağımlılığı veya bağımsızlığı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 47. MB-aracılı tedavi gruplarının prostat kanseri hücrelerindeki apoptotik proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiminin western blot yöntemi ile gösterimi.

Metilen mavisinin sono-fotosensitif ajan olarak kullanıldığı gruplarda da protein düzeyleri yine western blot yöntemiyle incelenmiştir (Şekil 47). Yine benzer şekilde house keeping gen olarak GAPDH gen ifadesi kontrol olarak kullanılmış ve elde edilen veriler ImageJ programıyla densitometre analizi ile değerlendirilmiş ve elde edilen bant yoğunlukları GAPDH ile normalize edilerek % değerler olarak grafikleştirilmiştir (Şekil 48).

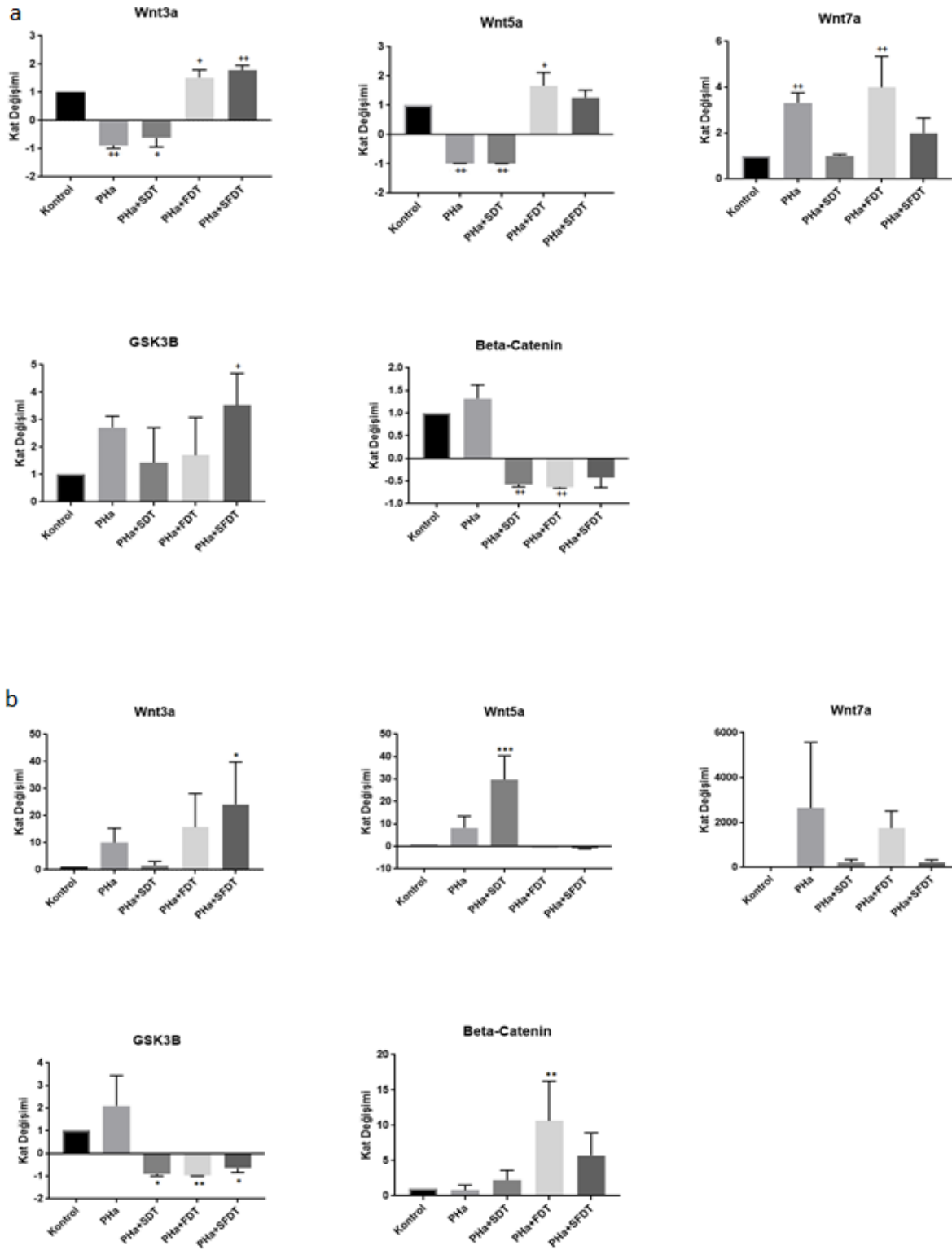


Şekil 48. MB-aracılı tedavi gruplarının prostat kanseri hücrelerindeki apoptotik proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiminin western blot yöntemi ile grafiksel gösterimi (+p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001; ++++p<0.0001; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

Elde edilen veriler ışığında, her iki hücre hattı için de MB'nin kullanıldığı tedavilerden sonra kaspaz-8, kaspaz-3, PARP ve Bax protein ekspresyon seviyelerinde artış gözlenirken, kaspaz-9 ve Bcl-2 protein ekspresyonlarında azalma olduğu gözlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, SFTD'nin ardından kaspaz-8 protein düzeyindeki artış PC3 hücrelerinde daha fazla olduğu gözlenirken, kaspaz-3 düzeyindeki artış ise LNCaP hücrelerinde daha fazla olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, LNCaP hücre hattında tüm tedavilerin ardından PARP protein ekspresyonundaki artış PC3 hücrelerine göre daha fazla iken, tüm tedavilerden sonra Bcl-2 seviyesindeki azalış ise LNCaP hücrelerinde daha az oranda gerçekleştiği görülmektedir. Protein ekspresyonları seviyelerindeki bu farklılıklar kullanılan hücrelerin androjen bağımlılığı veya bağımsızlığı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

4.8. Prostat Kanseri Hücre Dizilerinde Tedavi Sonrası Wnt Sinyal Yolağı Gen İfade Seviyeleri

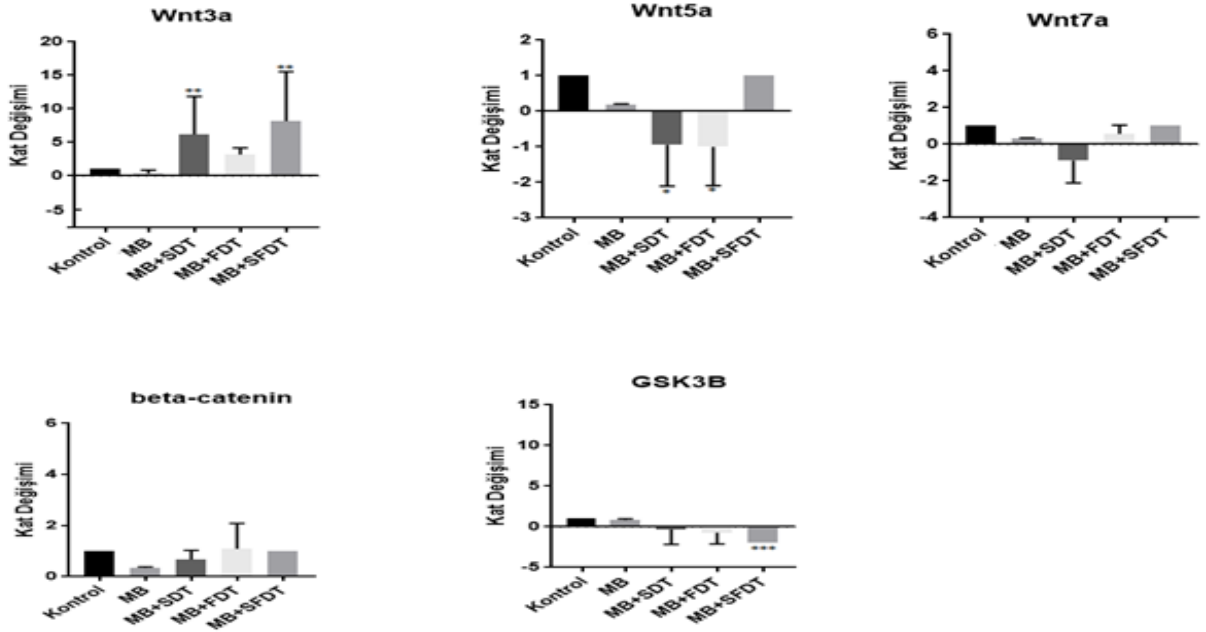
Prostat kanseri tedavisinde PHa ve MB aracılı SDT, FDT ve SFDT'nin etkilerinin *in vitro* incelendiği bu çalışmada, kullanılan tedavilerin mekanizmasının aydınlatılmasında Wnt yolağının rolü de incelenmiştir. Bu amaçla hücrelerden RNA izole edilmiş, bu RNA'lar kullanılarak cDNA elde edilmiş ve RT-PCR ile çoğaltılan gen bölgelerinin ifade miktarı ölçülmüştür. Elde edilen ölçümler sonucunda PC3 hücrelerine PHa aracılı FDT ve SFDT uygulamasından sonra Wnt3 ve Wnt5 ekspresyonunda artış gözlenirken, tüm tedavi uygulamalarından sonra Beta-catenin seviyesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte tüm gruplar için Wnt7 ve GSK3 β ekspresyon seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, LNCaP hücrelerine PHa aracılı tedaviler sonrasında Wnt yolağındaki bazı gen ifadeleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 49'da gösterilmiştir. Buna göre, tedavilerden sonra PC3 hücrelerinde beta-katenin seviyesi azalırken, GSK3 β seviyesinde ise artış gözlenmektedir. Bununla birlikte Wnt7 ekspresyon seviyesi PHa ve FDT gruplarında artarken, Wnt5 ekspresyonundaki artış ise FDT ve SFDT gruplarında gözlenmektedir. Bununla birlikte Wnt3 ekspresyonu FDT ve SFDT gruplarında artarken, PHa ve SDT gruplarında gözlenmiştir. LNCaP hücrelerine uygulanan PHa-aracılı tedaviler sonrasında Wnt3 ve Wnt5 ekspresyonlarında sırasıyla SFDT ve SDT gruplarında anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, LNCaP hücrelerine uygulanan PHa-aracılı tedavilerden sonra GSK3 β ekspresyonunda azalmalar olduğu belirlenirken, Beta-katenin seviyelerinde artış gözlenmiş ancak bu artış sadece FDT gruplarında anlamlı olduğu gözlenmiştir.



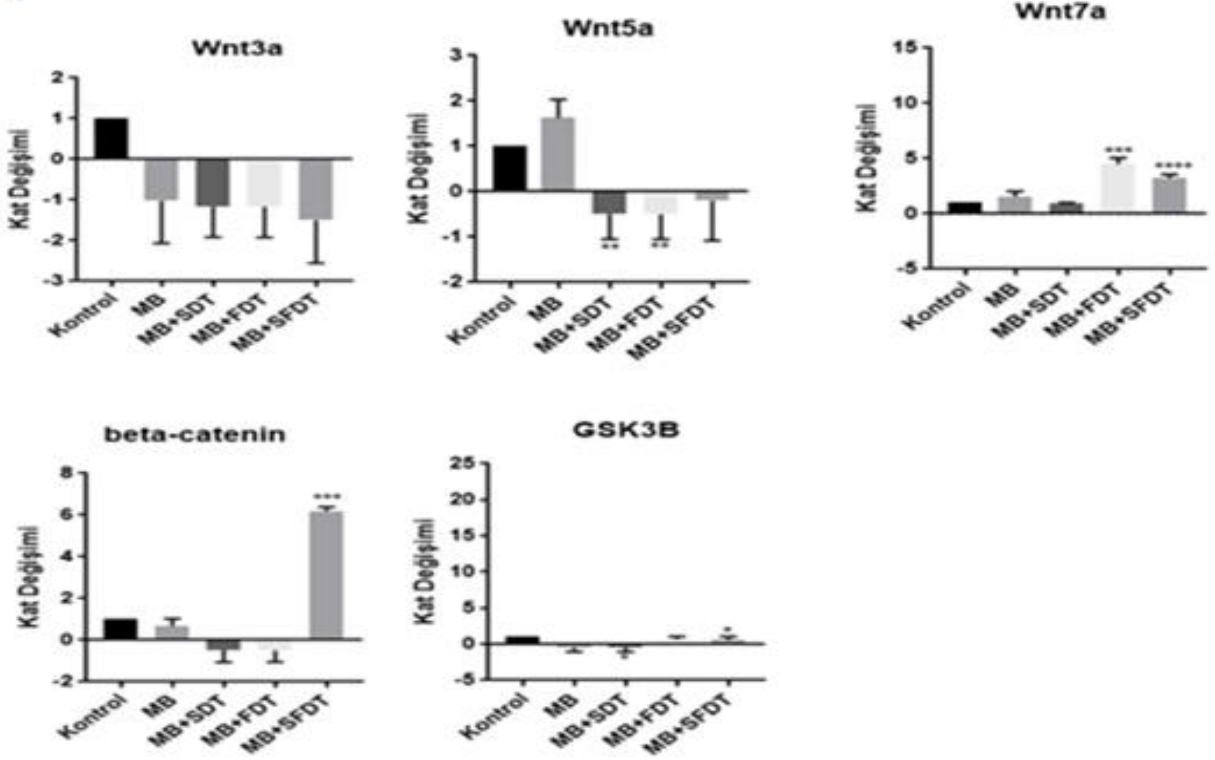
Şekil 49. (a) PC3 ve (b) LNCaP hücrelerine PHa aracılı tedaviler sonrasında Wnt yolağında görev alan proteinlerin gen ekspresyon seviyelerindeki değişim (+p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001; ++++p<0.0001; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

MB'nin kullanıldığı Wnt yolağındaki bazı işaretçi proteinlerin gen ifadelerine ait elde edilen görüntü ise Şekil 50'de gösterilmiştir. Buna göre, PC3 hücrelerinde Wnt3 ve Beta-katenin ekspresyonlarında MB aracılı tedavilerden sonra arttığı gözlenmiştir ancak bu artış Beta-katenin seviyelerinde anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte Wnt5 ekspresyon seviyeleri SDT ve FDT gruplarında, Wnt7 seviyelerinde SDT uygulamasından sonra ve GSK3 β seviyelerinde ise tüm tedavi uygulamalarından sonra azaldığı belirlenmiştir. Ancak bu azalma Wnt5 gruplarında ve GSK3 β 'nın SFDT gruplarında anlamlı olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, LNCaP hücrelerine MB aracılı tedaviler sonrasında tüm gruplar için Wnt3 ve Wnt5 ekspresyonlarında azalma gözlemlenirken, Wnt7 ekspresyonunun ise arttığı gözlenmiştir. Ancak bu azalmalar Wnt3 grupları için anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Ek olarak, beta-katenin seviyesinde sadece SFDT gruplarında artış gözlenirken, GSK3 β seviyesi için SDT uygulamasından sonra gen ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

a



b



Şekil 50. (a) PC3 ve (b) LNCaP hücrelerine MB aracılı tedaviler sonrasında Wnt yolağında görev alan proteinlerin gen ekspresyon seviyelerindeki değişim (+p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001; ++++p<0.0001; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

4.9. Prostat Kanseri Hücre Dizilerinde Tedavi Sonrası Biyokimyasal Analizler

PHa ve MB aracılı tedavilerin prostat kanseri hücrelerindeki etki mekanizmaları için bazı biyokimyasal analizler yapılmıştır. İncelenen analizler arasında reaktif oksijen türleri (ROS), MDA, SOD, CAT ve GSH düzeyleri yer almaktadır. Elde edilen veriler sonucunda kontrol gruplarıyla kıyaslandığında hem PC3 hem de LNCaP hücreleri için PHa kullanılarak yapılan tedaviler sonrasında tedavi gruplarında ROS ve MDA seviyelerinin önemli miktarda arttığı gözlenmiştir (Tablo-14). PHa-aracılı tedaviler sonrası gözlenen ROS artışının LNCaP hücrelerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ancak LNCaP hücrelerinde SFDT uygulamasından sonra gözlenen MDA seviyesindeki artış PC3 grubuna oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. MDA miktarı artan peroksidasyonun bir ürünü olarak hücrelerde yükselmekte ve artmış oksidatif strese işaret etmektedir. Bu sonuç, tedavi uygulanan gruplardaki hücrelerde oksidatif stresin arttığını göstermektedir. MDA miktarında en fazla artım özellikle sono-fotodinamik tedavi gruplarında gözlenmiştir.

Tablo 14. PHa aracılı tedaviler sonrası prostat hücrelerinde meydana gelen biyokimyasal değişimler.

HücreTipleri	Gruplar	ROS (%seviye)	MDA(nmol/mg)	GSH(nmol/ml)	SOD(% inhibisyon)	CAT(pg/ml)
PC3	Kontrol	2.78±0.32	2.04±0.06	0.94±0.09	76.90±7.66	0.16±0.09
	PHa	11.1±1.88	2.10±1.31	0.83±0.09	50.63±3.92	0.15±0.01
	PHa+SDT	38.29±8.67***	5.12±1.02**	0.72±0.11	40.49±2.13*	0.07±0.02****
	PHa+FDT	96.26±2.10****	8.17±1.90***	0.55±0.16*	24.08±7.49**	0.06±0.04****
	PHa+SFDT	97.57±2.54****	8.55±2.03***	0.19±0.15****	5.14±4.04****	0.03±0.02***
LNCaP	Kontrol	8.13±0.73	2.92±0.54	0.51±0.08	78.71±10.41	0.17±0.3
	PHa	17.86±3.51	2.52±2.29	0.34±0.11	68.92±22.29	0.14±0.3**
	PHa+SDT	56.41±0.96***	4.85±1.45*	0.26±0.22	47.87±9.29**	0.11±0.16****
	PHa+FDT	97.94±0.63****	6.88±0.52**	0.22±0.10**	33.15±6.35****	0.08±0.010****
	PHa+SFDT	99.68±0.08****	11.74±0.94****	0.09±0.19**	11.79±5.22****	0.04±0.18****

(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

ROS ve MDA ölçümlerinin yanı sıra, hem PC3 hem de LNCaP hücrelerinde PHa-aracılı tedaviler sonrasında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı ve katalaz seviyeleri de ölçülmüştür. Süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidanlar, H₂O₂, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi toksik ürünlerin zararlı

etkilerinden canlının korunmasını sağlayan yapılardır. Bir diğer antioksidan olan GSH'da oksidan strese karşı dokuların savunmasında yer almaktadır. Buna göre; kontrol gruplarıyla kıyaslandığında tedavi gruplarında SOD, GSH ve CAT seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Tablo 15. MB aracılı tedaviler sonrası prostat hücrelerinde meydana gelen biyokimyasal değişimler.

HücreTipleri	Gruplar	ROS (%seviye)	MDA(nmol/mg)	GSH(nmol/ml)	SOD(% inhibisyon)	CAT(pg/ml)
PC3	Kontrol	2.78±0.32	2.04±0.06	0.94±0.09	76.90±7.66	0.16±0.09
	MB	4.69±0.46	2.47±0.18	0.83±0.1	52.72±1.9**	0.15±0.4
	MB+SDT	39.65±3.10****	3.98±0.22**	0.92±0.2	36.46±10.19****	0.11±0.16***
	MB+FDT	81.4±3.63****	8.37±1.01****	0.46±0.12**	29.67±2.02****	0.08±0.03****
	MB+SFDT	96.53±4.59****	8.76±0.69****	0.26±0.02***	2.90±4.14****	0.05±0.9****
LNCaP	Kontrol	8.13±0.73	2.92±0.54	0.51±0.08	78.71±10.41	0.17±0.3
	MB	16.02±1.8	4.48±0.17	0.42±0.2	68.15±3.37	0.14±0.2*
	MB+SDT	55.31±6.46****	5.37±1.14	0.35±0.07*	48.65±7.48**	0.13±0.07***
	MB+FDT	81.64±4.2****	7.85±1.95**	0.29±0.03**	31.91±9.81****	0.09±0.09****
	MB+SFDT	96.21±4.16****	11.74±0.94****	0.05±0.03****	22.82±5.18****	0.07±0.03****

(*p<0.05;**p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001).

Benzer uygulamalar MB-aracılı tedaviler sonrasında da uygulanmış ve sonuçlar Tablo-15'de özetlenmiştir. Yine benzer şekilde uygulanan tedavilerin ardından MDA ve ROS seviyelerinde bir artış gözlenmiş, SOD, CAT ve GSH seviyelerinde ise bir azalma olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak gösterilen kanser, hücrelerde DNA hasarı, sinyal yollarının bozulması vb nedenlerle hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması olarak tanımlanmaktadır. Kanser türlerinden biri olan prostat kanseri erkeklerde görülen en sık kanser türlerinden birisi olup, tüm kanserlerin %32'sini oluşturmaktadır. Prostat kanseri tedavisinde yaygın olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve hormonal tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu tedavilerden radikal prostatektomi ile onkolojik olarak iyi sonuçlara ulaşılmasına rağmen, hem intaroperatif hem de postoperatif dönemde inkontinans ve erektil disfonksiyon gibi hayat kalitesini bozan sekellere rastlanabilmektedir. Laparoskopik radikal prostatektomide karşılaşılan güçlükler arasında bağırsak yaralanmaları, bazı organların hasar görmesi ve uzun süreli tıkanmalar da sayılabilir. Kanser tedavisinin en az bir döneminde ilaç tedavisi (kemoterapi) kullanılmaktadır. Hormonal tedavi, immunmodülatörler ve son yıllarda ilaç portföyüne giren tirozin kinaz inhibitörleri, antikorlar ve antianjiyogenik ajanlar gibi hedefe yönelik tedaviler kemoterapi ile birlikte veya ayrı olarak kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Anderson, 2003; Wang ve ark, 2018). Prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemotöropatik bazı ilaçların (estramustine, mitoxantrone, vb) plazma membranından geçememesinden dolayı hücrede birikerek sitotoksisiteye neden olduğu bildirilmektedir. Başka bir ifadeyle, prostat kanserinin tedavisinde son yıllarda oldukça etkili çalışmalar yapılmış olsa da tekrarlanan terapiler ve uygulanan yöntemler hastalarda yan etkilerin ortaya çıkmasına ve oluşan toksik etkilerin hastaya zarar vermesine neden olmaktadır (Qin ve ark, 2016). Ortaya çıkan bu durumlar hastanın yaşam kalitesinin düşmesine, hatta sekonder nedenle ölümüne neden olabilmektedir. Ayrıca tekrarlanan tedaviler sonrasında, prostat kanseri hastalarında hastalığa direnç mekanizmaları gelişebilmektedir (Szasz, 2007). Bu nedenle hastalığın tedavisinde kullanılacak alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alternatif yöntemler arasında sayılabilecek olan sonodinamik ve fotodinamik tedaviler diğer yöntemlerle kıyaslandığında hem non-invaziv hem de yan etkileri daha minimize olduğu düşünülmektedir.

Fotodinamik terapi (FDT); ışığa duyarlı bir ajanın vücuda verildikten sonra uygun dalga boylarında uyarılmasını takiben bir dizi fotokimyasal ve fotofiziksel reaksiyonların başlamasına dayanan bir tedavi türüdür. FDT hedef dokulara özgül kullanılabilir, iyi tolere edilebilir, kümülatif toksisitesi bulunmamaktadır, birden fazla lezyon içeren tedaviler için kullanılabilir. FDT, seçici olarak lokalize hedef doku tarafından alınan ışığa duyarlı ajanın ortamda bulunan moleküler oksijen varlığında, uygun dalga boyunda görünür ışığa maruz bırakılması sonucu hücrelerde apoptoz, nekroz veya otofajiye neden olan ve başlıca singlet oksijen oluşumu prensibine dayanan bir fotokemoterapi yöntemidir (Bilgin, 1999). Fotodinamik tedavi (FDT) ilk kez 1993 yılında Kanada da resmi olarak uygulanmaya başlanmış, sonrasında sırasıyla ABD, Avrupa, Japonya ve Avustralya da uygulanmıştır. Fotodinamik tedavide kullanılan ve hematoporfirin türevi olan Photofrin® [Axcan Pharma, Kanada] adlı ilacın klinikte ilk kullanımı Kanada'da 1993'te onaylanmış, ardından FDA tarafından özafagus kanserinde ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kullanılması onaylamıştır (Baskaran ve ark, 2018). Ayrıca 2003 yılında FDA kansere neden olabilecek lezyon olan Barrett özafaguslu hastalarda Photofrin® kullanımına izin vermiştir. 1993 yılından bu yana protoporphyrin IX (PpIX) türevi olan Levulan® [ABD], benzoporfirin türevi olan Vertofrin® [Kanada], mTHPC türevi olan Foscan® [Almanya], lutetium texafirin türevi olan Lutrin® [ABD], Chlorin-e6 türevi olan NPe6® [Japonya] isimli fotosensitif ajanlar klinikte uygulanmaya başlanmıştır. Son yıllarda FDT'nin prostat kanseri tedavisi için uygun bir tedavi yöntemi olduğu ve prostat kanser tedavisinde kullanılmakta olan diğer yöntemlerle birlikte kullanabileceği bildirilmektedir. Birçok fotosensitif ajanın FDT ile sinerjik etkisinin prostat kanseri tedavisindeki etkinliği araştırılmasına rağmen literatürde PHa veya MB ile FDT'nin birlikte kullanıldığı çalışmalar henüz sınırlıdır. SDT ise son 10 yılda FDT ile ilgili araştırmalar sonucunda geliştirilmiş bir yöntem olup FDT'ye benzer özelliklere sahip bir tedavi yöntemidir. Sonodinamik tedavinin fotodinamik tedaviden üstünlüğü ışık yerine deriye daha fazla nüfuz edebilme özelliği bulunan düşük şiddetli ultrasesin kullanılıyor olmasıdır. SDT'nin birincil mekanizması ultrasonik kavitasyon etkisi oluşturmasıdır. Kavitasyon olgusu, ultrases ile ışınlanmış bir ortamda baloncukların üretilmesi, genişletilmesi ve çökmesi ile karakterize edilir. SDT ile hücrelerin membranlarında hasar oluşturmak mümkündür. Ultrases uygulamasıyla dokularda oluşan kavitasyon baloncuklarının patlaması sonucu hücre membranlarında mekanik hasar oluşabilmektedir. Bunun yanı sıra yine kavitasyonun patlamasıyla oluşacak olan radikaller de hücre membranında hasara neden olabilmektedir. Lipit peroksidasyonu ise SDT uygulamasından sonra oluşan radikallerin membran lipitleriyle etkileşime girmesiyle meydana gelmektedir. Bununla birlikte bazı ajanların hücrelerin

mitokondrisinde ya da lizozomunda bulunan reseptörlere bağlanma özelliğine ve bu ajanların ultrases ile uyarılmasına bağlı olarak mitokondri ve lizozomlarda da hasara neden olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark, 2015). Sonofotodinamik tedavi ise hem sonodinamik hem de fotodinamik tedavinin birlikte kullanıldığı yeni ve gelişmekte olan bir tedavi türüdür. Sonofotodinamik tedavinin en önemli özelliği SDT ve FDT'nin sinerjik etkisinden dolayı, anti kanser tedavisinde hem sonodinamik hem de fotodinamikten daha etkili olmasıdır (Jin ve ark, 2000). Dolayısıyla sonofotodinamik tedavinin etki mekanizmasında sinerjik etkiden dolayı daha düşük dozlarda kullanılabilen ajanın hem ışık hem de ultrases ile uyarılması sonucu ortaya çıkan mekanik, sonokimyasal ve fotokimyasal olaylar yer almaktadır (Sadanala ve ark, 2014). SFDT'nin yeni bir yaklaşım olması bu tedaviyle ilgili kaynakların da sınırlı olmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte literatürde SDT ve SFDT'nin prostat kanserinde etkinliği ile ilgili çalışmalar da oldukça sınırlıdır.

FDT ve SDT'de en önemli etkenlerden birisi kullanılan ajanın toksisitesinin düşük olması, singlet oksijen üretme seviyesinin yüksek olması ve ajanın deride meydana getirdiği duyarlılığın düşük seviyede olması istenen durumlardır. Kullanılan ajanlardan biri olan metilen mavisinin hidrofobik yapısı, hızlı absorbe edilmesi, hedef dokudan hızlı bir şekilde uzaklaşması (Tardivo ve ark, 2005) bu çalışmada kullanılma sebeplerinden biridir. Metilen mavisinin bir diğer özelliği de FDT için önemli olan daha derin dokulara nüfuz edebilen geniş bir spektrumda yer almasıdır (600-800 nm). Çalışmada kullanılan diğer bir ajan olan PHa'da düşük toksisiteye, yüksek singlet oksijen üretme potansiyeline ve geniş bir uyarılma spektrumuna sahiptir (Xodo ve ark, 2012; Cho ve ark, 2014). Ayrıca yapılan bir çalışmada PHa'nın; 5-ALA gibi metabolik olarak aktive edilmesine gerek olmadığı, dolayısıyla kullanım dozunun kolaylıkla ayarlanabileceği belirtilmiş olup prostat kanseri tedavisinde faz III'de kullanılan bakteriyopaladyum fiyorbid'e benzer özellikte olduğu vurgulanmıştır (Azzouzi ve ark, 2013). Bu bağlamda, çalışmamızda ilk olarak PHa veya MB aracılı SDT, FDT ve SFDT'nin prostat kanseri hücre dizinleri olan PC3 ve LNCaP hücrelerinin canlılıklarına olan etkileri incelenmiştir. MTT testi ile yapılan bu ölçümlerde SDT, özellikle de FDT ve SFDT'nin kontrol gruplarına kıyasla hücre canlılığında belirgin ölçüde azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Metilen mavisini aracılı SDT uygulaması PC3 hücre hattında canlılık değerlerinde yaklaşık %50 azalmaya yol açarken FDT ve SFDT ise yaklaşık %90 azalmaya neden olmuştur. Diğer taraftan, PHa aracılı SDT uygulamasından sonra hücre canlılığında %60 oranında bir azalma gözlenirken, bu durum FDT ve SFDT'de SDT'ye göre daha yüksek oranlarda olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde, (Lim ve ark, 2013) metilen mavisini aracılığıyla yapılan FDT'nin insan akciğer adenokanser

hücrelerinde apoptozu arttırarak etkili olduğunu bildirmiştir. Komori vd.(Komori ve ark, 2009) sarkoma 180 hücre hattına metilen mavisi uyguladıktan sonra 0.24 W/cm² dozunda 30 sn ultrases uyguladığında kontrole göre hücre canlılığının yaklaşık %70 azaldığını bildirmişlerdir. Kaynakçaya bakıldığında benzer durumun PHa için de geçerli olduğu görülmektedir. Cho ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 50 µg/ml kullanılan PHa'nın HUVEC hücrelerine bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (Cho ve ark, 2014). Diğer bir çalışmada ise 4.8 µM konsantrasyonun üstünde kullanılan PHa'nın tek başına LNCaP hücrelerinde toksik etkiye neden olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte PHa-aracılı FDT'nin prostat kanseri hücrelerinde ROS oluşumunu arttırarak hücrelerin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Xu ve ark, 2013). Bir diğer çalışmada ise 0.5-2 µM konsantrasyon aralığında uygulanan PHa'nın kanserli hücrelerin büyümesini tamamen inhibe ettiğini göstermiştir (Chen ve ark, 2018). Yine PC3 hücrelerinde 0- 4µM aralığında uygulanan PHa-aracılı FDT'nin prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunda önemli derecede etki ettiği Liu ve ark. tarafından gösterilmiştir (Liu ve ark, 2017). Hem bu bilgilerden yola çıkılarak hem de yapılan deneysel çalışmaların ardından bu çalışmada uygulanan PHa konsantrasyon değeri 0.25 µM olarak belirlenmiştir ve elde edilen bulgular literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu çalışmada hücre canlılığında gözlenen azalma, MB veya PHa aracılı FDT ve SFDT gruplarında SDT gruplarına göre daha belirgin olarak gerçekleşmiştir. Benzer şekilde MB aracılı FDT ve SFDT gruplarında hem PC3 hem de LNCaP hücre hatlarında kademeli olarak hücrelerin büyük bir çoğunluğu canlılıklarını yitirmiştir. Çalışmamızda prostat kanserinde etkisi olduğu gözlenen söz konusu tedavilerin etkisi, McEwan vd. (McEwan ve ark, 2016)'nin çalışmalarında ALA aracılı uygulandıklarında FDT ve SDT'nin melanom dışı deri kanserlerinde etkinlikleri açısından istatistiksel bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Bu durum, FDT ve SFDT uygulamalarının farklı kanser türlerinde değişik etkinlik gösterebileceğini işaret etmektedir. Ayrıca Umemura ve arkadaşlarının sarkoma hücrelerinde PHa-aracılı SDT'nin diğer bir ajan olan hematoporfirin-aracılı SDT'den daha iyi olduğunu ifade etmişlerdir (Umemura ve ark, 1996). Bu sonuçlara göre, ve literatür ile bağlantılı olarak ajan aracılı FDT ve SFDT uygulamalarının prostat kanseri tedavisinde umut vaat eden alternatif tedaviler olabileceği sonucuna varılmıştır.

SDT ve FDT'nin çeşitli kanserlerde birlikte kullanılmasına yönelik SFDT çalışmaları son yıllarda arttığı gözlenmektedir (Liu ve ark, 2016; Miyoshi ve ark, 2016). Liu ve arkadaşları. (Liu ve ark, 2016) meme kanserinde sinoporphyrin sodyum aracılı SFDT'in SDT veya FDT'nin tek başına uygulamasına göre kanser hücrelerine karşı daha sitotoksik olduğunu ve SFDT'nin ksenograft fare modelinde tümör büyümesini baskıladığını

bildirmişlerdir. Ayrıca sinoporphyrin sodyum aracılı SFDT'in tümör üzerinde tedavi edici etkiyi arttırırken normal dokularda toksisiteyi de azalttığı gözlenmiştir. Miyoshi ise (Miyoshi ve ark, 2016) TiO₂ (%2lik) nanopartikülleri ve 1 mM 5-ALA uygulamasını takiben uygulanan ultrasonik ve lazer maruziyetinin çok kuvvetli anti-tümör etki oluşturduğunu bildirmişlerdir ve sonuçta SDT'yi takip eden FDT uygulamasının tümör üzerine sinerjik etki oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde önce fotosensitif ajan uygulanmış takiben sırasıyla ultrases ve ışık uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PHa-aracılı sonofotodinamik ve fotodinamik tedavilerin etkisi prostat kanseri hücre hatlarında SDT'ye nazaran daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak metilen mavisi aracılı tedaviler sonrasında FDT'nin etkinliği SFDT'nin etkinliğine kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu durumun başlıca sebebi sonuçlardan kaynaklanan sapmalar olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ile ilk kez prostat kanseri tedavisinde hem fotosensitif hem de sonosensitif özellikte olan metilen mavisi ve fiyorbid a ultrases ve ışıkla birlikte uyarılması ile ortaya çıkan etkiler araştırılmıştır. Ayrıca literatürde prostat kanseri tedavisinde ne metilen mavisi ne de fiyorbid a'nın sonofotodinamik tedavide kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmada uygulanan tedavilerin apoptoz/nekroz yollarına olan etkilerinin ne ölçüde gerçekleştiği Hoechst ve propidiyum iyodid (HOPI) boyama ile incelenmiştir. Sonuçlara göre kontrol grubu hücrelerinin HOPI boyama sonucu apoptotik özellik göstermedikleri, tek başına ilaç, ışık ve ultrasesin uygulandığı gruplara ait hücrelerde ise apoptotik özellik gösteren hücrelerin çok az sayıda olduğu gözlenmiştir. Ancak MB ve PHa aracılı SDT, FDT ve SFDT'nin uygulandığı gruplarda apoptotik hücrelerde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu artış, SDT gruplarında diğer tedavi gruplarına nazaran daha az görülmüş, özellikle FDT ve SFDT uygulamaları sonucu apoptotik hücrelerin anlamlı bir şekilde arttığı ve nekrotik hücrelerde de artım gözlemlendiği ancak anlamlı olmadığı görülmüştür. Sonuçlara bakılarak özellikle FDT ve SFDT uygulamalarının apoptotik yollarını aktive ederek hücre ölümüne neden olduğu söylenebilir. Bu bulgunun yanı sıra özellikle FDT ve SFDT tedavileri sonrası HOPI görüntülerinde kanser hücrelerinin sayısında da azalmalar olduğu gözlenmiş, bu durumun MTT canlılık testleri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Örneğin, PC3 hücrelerinde hem MB hem PHa aracılı SFDT uygulamalarında hücrelerin %90'nına yakını ölmüştür. HOPI boyaması sonucu bunların yaklaşık %70-80'inin apoptotik mekanizma ile öldükleri görülmektedir (Şekil 25 ve 29). Kanser tedavisinde apoptotik yolların aktive edilmesi önemli bir tedavi yaklaşımı olup ajan aracılı SFDT uygulamasının bu tip kanser tedavilerinde kullanılabilecek potansiyel etkin bir yaklaşım olduğu bu sonuçlara göre ortaya çıkmıştır. Bu projede 2D hücre kültüründe yapılan tedavilerin etkinliği incelenmiştir, fakat 3D hücre

kültüründe MB aracılı FDT uygulamasının meme kanser hücrelerinde daha etkili olduğu, FDT uygulamasının meme kanser hücre ölümünü uyarırken malign olmayan hücreleri etkilemediği gösterilmiştir (Dos Santos ve ark, 2017).

Uygulanan tedavilerin apoptotik yollarda nasıl bir etki oluşturduğunu daha iyi gözlemek için western blot ile apoptotik protein seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Bir hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğinin belirlenmesinde proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin seviyesi önemlidir. Eğer proapoptotik hücreler daha fazla ise hücrenin apoptoza gitme eğilimi daha fazla olmaktadır. Proapoptotikler, Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa olarak bilinirler. Antiapoptotikler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 olarak isimlendirilmişlerdir. Proapoptotikler sitozolde yer alırlar ve sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörleri etkileyerek apoptozu indüklerler. Antiapoptotikler ise mitokondriyon dış membranında, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yer alırlar ve yine sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörleri tersine etkiliyerek apoptozu inhibe ederler (Shamas-Din ve ark, 2013). Apoptozun görülmesinde rol oynayan bir diğer faktör ise sistein proteazlar olan kaspazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağının kırılmasında görev alırlar. Kaspazlar geniş bir sınırlandırmaya tabidir ve apoptoz, şnflamasyon gibi olaylarda rol oynarlar. Apoptotik olaylarda rol oynayan kaspazlar arasında kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 yer almaktadır (David R. McIlwain, Thorsten Berger, Tak W. Mak, Caspase Functions in Cell Death and Disease, Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5(4):1-28). Hücrede apoptozun başlaması için gerekli en kritik aşama apoptotik proteinlerin aktive olmasıdır (Zheng ve ark, 2014). Kaspaz-3'ün aktive olması apoptozun tetiklenmesine neden olmaktadır (Sheridan ve Martin, 2010). Apoptozun tetiklenmesi daha az yan etkiye neden olması ve immün sistem açısından daha tercih edilen bir hücre ölümü şeklindedir (Albert, 2004). Bazı çalışmalar SDT'nin mitokondri bağımlı bir yolağın da dahil olduğu çeşitli etkilerle apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (Song ve ark, 2011). Dai ve ark. (Dai ve ark, 2009) HMME aracılı SDT uygulamasının ardından C6 glioma hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Wang ve ark. (Wang ve ark, 2008) S180 hücre süspansiyonuna (2×10^6 hücre/ml) Hp aracılı SDT uygulanmasının ardından diğer pro-apoptotik proteinlerle birlikte kaspaz-3'ün ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca Liu ve ark. (Liu ve ark, 2010) prostat kanseri tedavisinde pheophorbide a aracılı FDT'nin hücre canlılığında azalmasında kaspaz 3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'u etkilerinden dolayı apoptotik yolların etkili olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde bu çalışmamızda da uygulanan tedaviler sonrasında hem PHa hem de MB aracılı tedavilerden sonra kaspaz-8 ve kaspaz-3 protein seviyelerinin kontrol gruplarına göre arttığı kaspaz-9 aktivitesinin ise azaldığı

gözlenmiştir. Diğer bir deyişle uygulanan tedavilerden sonra prostat kanseri hücrelerinde kaspaz 8, kaspaz 3, Parp ve Bax protein seviyelerinin arttığı, bcl-2 ve kaspaz 9 seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol gruplarına göre tedavi gruplarında anlamlı farklar olduğu ortaya konulmuştur. Dolayısıyla elde edilen verilerden uygulanan tedavilerin etki mekanizmalarında apoptotik yolların önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Uygulanan tedavilerin hücrelerde meydana gelen gen ekspresyon düzeylerine olan etkilerinin belirlenmesi ve tedavilerin etki mekanizmasında Wnt yolağının rolünün incelenmesi RT-PCR çalışmaları ile belirlenmeye çalışılmıştır. Son yıllarda FDT'nin mekanizmasına yönelik çalışmalarda nitrik oksit ve NF- κ B, mTOR ve fosfatidil inozitol 3 kinaz gibi bazı sinyal yolları üzerinden etkili olduğu bildirilmiştir (Pietra ve ark, 2015; Piette, 2015; Ayuk ve Abrahamse, 2019; Kraus ve ark, 2017). Bununla birlikte literatürde yapılan çalışmalar Wnt yolağının prostat kanserinde oldukça önemli bir rolü olduğuna dikkat çekmektedir. Chen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada Wnt-1 proteinin up regülasyonunun primer prostat tümörlerinin % 52'si ile metastaz yapan tümörlerin %80'ni ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark, 2004). Yamamoto vd. (Yamamoto ve ark, 2010) Wnt-5a gen ifadesinin prostat kanserinin sardırganlığını uyardığını bildirmiştir. Ayrıca, artmış Wnt3a ekspresyonunun LNCaP prostat kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını uyardığı da bilinmektedir (Li ve ark, 2008). Bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda PC3 hücrelerinde PHa aracılı FDT ve SFDT tedaviler sonrasında Wnt3 ve Wnt5 ekspresyonunda artış gözlenirken, tüm tedavi uygulamalarından sonra Beta-catenin seviyesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte tüm gruplar için Wnt7 ve GSK3 β ekspresyon seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. LNCaP hücrelerinde ise PHa aracılı tedaviler sonrasında tüm gruplarda beta-katenin seviyesi artarken, GSK3 β seviyesinde ise azalma gözlenmektedir. Bununla birlikte Wnt7 ekspresyon seviyesi sadece FDT gruplarında artarken, Wnt5 ekspresyonundaki artış ise sadece SDT gruplarında gözlenmektedir. Wnt3 ekspresyonu FDT ve SFDT gruplarında artığı gözlenmiştir. MB-aracılı uygulamalardan sonra ise, PC3 hücrelerinde Wnt3 ekspresyonu artarken, GSK3 β seviyesinin ise tüm tedavi uygulamalarından sonra azaldığı belirlenmiştir. Wnt5 ekspresyon seviyesinde artış sadece SFDT grubunda gözlenirken, Wnt7 ekspresyonundaki azalma da sadece MB-aracılı SDT grubunda gözlenmiştir ancak istatistiksel olarak anlamsızdır. LNCaP hücrelerinde ise MB aracılı tedaviler sonrasında tüm gruplar için Wnt3 ve Wnt5 ekspresyonlarında azalma gözlenirken, Wnt7 ekspresyonunun ise arttığı gözlenmiştir. Ek olarak, beta-katenin seviyesinde sadece SFDT gruplarında artış gözlenirken, GSK3 β seviyesi için SDT

uygulamasından sonra gen ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında örneğin PC3 hücrelerinde FDT ve SFDT'den sonra wnt5 ekspresyonunda artış gözlenirken, LNCaP hücrelerinde ise bu artış gözlenmemektedir. Bu durumun kullanılan hücre hatlarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. (Zhu ve ark, 2004; Thiele ve ark, 2011; Schweizer ve ark, 2008). Sonuç olarak tedavilerden sonra wnt ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında değişimler gözlenmiş ancak, eldeki verilerin sadece RT-PCR ile belirlenmesi, uygulanan tedavilerin wnt yolağı ile ilişkisinin gösterilmesi açısından yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, wnt yolağında rol oynayan proteinlerin seviyelerinin tedaviler sonrasında nasıl değiştiği western blot yöntemi ile gösterilmesi gereklidir.

Son olarak ROS MDA, CAT, GSH ve SOD seviyelerine bakılarak bu parametrelerin tedavilerin etki mekanizmasında yer alıp almadığı biyokimyasal ölçümlerle irdelenmiştir. Kontrol grupları ile kıyaslandığında tedavi gruplarında hücre içi ROS oranlarında artışlar olduğu gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, elde edilen veriler sonucunda, uygulanan tedavilerin etki mekanizmasında oksijen radikallerinin de rol oynadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, literatürde over kanseri tedavisinde metilen mavisinin kullanıldığı bir çalışmada SDT'nin intraselüler ROS seviyesini önemli derecede arttırdığı gösterilmiştir (Xiang ve ark, 2011). Li vd. (Li ve ark, 2014) ROS oluşumunun hem FDT hem de SDT için önemli olduğunu belirtmişlerdir ve 4T1 hücrelerinde ROS oluşumunun SDT için Clorin e6 konsantrasyonuna ve FDT için ışın dozuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. A549 akciğer kanser dizinlerinin kullanıldığı bir başka çalışmada ise hidrojen peroksit ile singlet oksijenin yanı sıra mitokondriyal ROS oluşumunun hücrelerde metabolik stresi indükleyerek nekroz oluşumunda anahtar bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark, 2007). Bir diğer çalışmada melanoma tedavisinde metilen mavisinin ajan olarak kullanıldığı fotodinamik tedavi sonrası ortaya çıkan radikallerin kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ederek hücrelerde apoptoz oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir (Chen ve ark, 2008). Bu sonuçlara göre, prostat kanseri hücre dizinlerinde ROS oluşumunun MB veya PHa aracılı tedavilerin ardından anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde MB aracılı sonodinamik ve fotodinamik tedavinin yüksek ROS oluşumuna ve düşük singlet oxygen oluşumuna neden olduğu gösterilen çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Komori ve ark, 2009; Komine ve Tsujimoto, 2013). ROS oluşumunun yanı sıra, her iki hücre hattında da uygulanan tedavilerin, özellikle SFDT'nin, MDA düzeyinde anlamlı bir artıma, SOD aktivitesinde, indirgenmiş glutatyon seviyesinde ve CAT ekspresyon düzeyinde ise anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu sonuç, SDT, FDT ve SFDT mekanizmalarının prostat hücre hatlarında artmış

hücre içi ROS seviyesi ile birlikte azalan antioksidan enzim sistemi etkinliğine bağlı olarak oksidatif bir etki oluşturduklarını göstermektedir.

Bu çalışmada androjen bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki farklı prostat kanser hücre hattı ile çalışılmış ve bu hücrelerin uygulanan tedavilerden bazı durumlarda farklılık göstermiştir. Özellikle hücre canlılığı testlerinde PHa kullanılan tedaviler sonrasında LNCaP hücrelerinin canlılığındaki azalma PC3 hücrelerine oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak MB-aracılı tedavilerden sonra PC3 hücrelerinin canlılığındaki azalma LNCaP hücrelerine oranla daha fazladır. Bu durum, sono, fotodinamik tedavilerde kullanılacak ilacın belirlenmesinde ne derece önemli olduğunu göstermektedir (Alimirah ve ark, 2006).

Sonuç olarak PC3 ve LNCaP prostat kanser hücre hatlarında kapsamlı olarak ilk defa bu çalışmada metilen mavisi veya fiyorbid a aracılı FDT, SDT ve SFDT'nin hücre canlılığında azalmaya neden olduğu ve bu azalan canlılığın oksijen radikallerinin etkisiyle apoptozun indüklenebileceği gösterilmiştir. SFDT'in SDT veya FDT'ye göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, androjenden bağımsız PC3 ve androjene bağımlı LNCaP prostat kanser hücrelerinde, prostat kanseri tedavisine alternatif olabilecek sonodinamik, fotodinamik ve sono-fotodinamik tedavilerin MB veya PHa'nın olası sinerjik etkileri araştırılmıştır. MTT hücre canlılığı testleri ile etkin doz ve süreler belirlendikten sonra tedavilerin sinerjik etkilerinin etkisinde programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) rolü HOPI boyama ile, Wnt yolağındaki gen ekspresyonlarının analizi RT-PCR metodu ile, her iki yolağın etkisinin protein düzeyinde incelemesi ise Western blot yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca tedaviler sonrasında meydana gelen biyokimyasal değişimler de uygun kitler kullanılarak incelenmiştir. Projeden elde edilen sonuçlara göre, hücre canlılığı ölçümleri sonucunda sadece ışık ya da ultrases uygulamasında hücre canlılıklarında anlamlı azalmalar gözlenmemiştir. Mevcut veriler göz önüne alındığında bu çalışmada kullanılan ilaçların etkin dozu MB için 10 μ M, PHa için 0.25 μ M, ultrasesin etkin dozu 0,5 W/cm², kullanılan ışık kaynağı için etkin doz 10mJ/cm² olarak belirlenmiştir. Hücre proliferasyonu ölçümleri sonucunda uygulanan tedavilerin özellikle PHa-aracılı FDT ve SFDT uygulanmasının kanser hücrelerinin canlılığında %90-95'lere kadar azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu veriler ışığında çalışmamızda prostat kanseri tedavisinde SDT, özellikle de FDT ve SFDT'nin etkili olduğu gözlenmiştir.

Uygulanan tedavilerin hücre ölümünde apoptotik rolü HOPI boyama ve western blot yöntemleriyle ortaya konmuştur. HOPI boyama sonucu elde edilen veriler ışığında kontrol grubuna nazaran tedavi gruplarında apoptotik hücrelerin arttığı, tedavilerin hücrelerde apoptotik yolakların aktivasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca MTT boyaması ile elde edilen hücre canlılığı verileriyle uyumlu olarak, canlı hücre miktarının uygulanan tedaviler sonrasında kontrol gruplarına nazaran belirgin oranlarda azaldığı gözlenmiştir.

Tedaviler sonrasında Wnt yolağının gen ekspresyonunun tayin edildiği RT-PCR inceleme sonuçlarına göre tedavilerden sonra Wnt yolağının da etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, prostat kanseri hücrelerinde PHa aracılı uygulanan tedavilerin hücre proliferasyonunu daha etkin şekilde azalttığı gözlenmiştir.

Western blot sonuçları göz önüne alındığında hücre ölümünde apoptozun önemli oranda etkisi olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçların hem HOPI boyama hem de RT-PCR

sonuçlarıyla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Uygulanan tedavilerin hücrelerdeki serbest radikal oluşumuna etkisinin incelendiği biyokimyasal sonuçlara göre tedaviler sonrasında hücrelerde kontrol gruplarına oranla ROS oranlarında artım, MDA miktarında artım, buna karşın GSH miktarında, SOD aktivitesinde ve CAT ekspresyon seviyesinde azalma görülmüştür. Bütün bu veriler ışığında uygulanan tedavilerin etki mekanizmasında oksijen radikallerinin rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak gerçekleştirilen bu çalışma ile prostat kanseri tedavisinde SDT, FDT ve SFDT'nin etkili olduğu belirlenmiş olup söz konusu etkilerin meydana gelmesinde ROS radikallerinin oluşmasının apoptozu indüklediği düşünülmektedir. Ayrıca bulgularımıza göre prostat kanseri tedavisinde kullanılabilecek olan söz konusu tedavilerin ileride klinikte uygulama aşamasında hastanın sahip olduğu kanser hücre tipine göre daha iyi cevap alınabileceği, bu durumun görülmesinde kullanılacak ajanın özelliklerinin de tedaviyi etkileyebileceği söylenebilir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında yapılabilecek yeni araştırmalar planlanırken, SDT, FDT ve SFDT'in hayvanların (sıçan veya fare) derileri üzerinde ksenograft yöntemi ile oluşturulan prostat kanser modelleri üzerinde yapılması, SDT, FDT ve SFDT uygulamalarını endoskop ve görüntüleme yöntemi altında hayvan prostatı üzerinde uygulanması, FDT ve SDT etkisi sonucu oluşması muhtemel singlet oxygen değerinin indirect olarak ölçülmesi, insan prostat tümörleri (ex vivo) üzerine SDT, FDT ve SFDT etkinliğinin gözlenmesi, insanlarda prostata endoskopta girip lazer ışını ile FDT ve görüntüleme yöntemiyle deri üstünde prostata SDT uygulanması gibi farklı araştırma önerileri göz önünde bulundurulabilir. Ayrıca Wnt yolağına ilişkin daha fazla verilerin eldesi ile bu yolağın etkisinin tam olarak çözülebilmesinin yanı sıra başka yolakların da tedavilerle olan ilişkisinin araştırılması ve gösterilmesi söz konusu tedavilerin geliştirilmesi açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Albert ML. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation, *Nat Rev Immunol* 2004, 4(3), 223–231.

Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: Properties, functions, and regulation. *Chem Rev* 2001, 101, 2527-2540.

Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (FDT): FDT mechanism, *Clin Endosc* 2013, 46, 24-29.

Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation, *FEBS Lett* 2006, 580, 2294–2300.

Alves AC, Ribeiro D, Nunes C, Reis S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies, *Biochim Biophys Acta* 2016, 1858, 2231–2244.

Anderson, J. Treatment of prostate cancer-the role of primary hormonal therapy, *EAU Update series* 2003, 1, 32-39.

Arıncı K, Elhan A. Anatomi (5. Baskı), Güneş Tıp Kitapevleri, 2014: 334s.

Ayuk SM, Abrahamse H. mTOR Signaling Pathway in Cancer Targets Photodynamic Therapy In Vitro, *Cell*. 2019, 8(5), 1-15.

Ayyıldız SA, Ayyıldız A. PSA, PSA derivatives, proPSA and prostate health index in the diagnosis of prostate cancer, *Turk J Urol* 2014, 40(2), 82–88.

Azzouzi AR, Barret E, Moore CM, Villers A, Allen C, Scherz A, Muir G, de Wildt M, Barber NJ, Lebdaı S, Emberton M. TOOKAD(®) Soluble vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy: determination of optimal treatment conditions and assessment of effects in patients with localised prostate cancer, *BJU Int* 2013, 112(6), 766-74.

Badiglian Filho L, Oshima CT, De Oliveira Lima F, De Oliveira Costa H, De Sousa Damião R, Gomes TS, Gonçalves WJ. Canonical and noncanonical Wnt pathway: A comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer, *Oncol Rep* 2009, 21, 313-320.

Baek KH, Hong ME, Jung YY, Lee CH, Lee TJ, Park ES, Kim MK, Yoo JH, Lee SW. Correlation of AR, EGFR, and HER2 Expression Levels in Prostate Cancer: Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization. *Cancer Res Treat* 2012, 44(1), 50–56.

Baker KG, Robertson VJ, Duck FA. A review of therapeutic ultrasound:biophysical effects. *Phys Ther* 2011, 81, 1351–1358.

Baskaran R, Lee J, Yang S. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications, *Biomater Res* 2018, 22(25), 1-8.

Baust JG, Gage AA. The molecular basis of cryosurgery, *BJU Int* 2005, 95, 1187-1191.

Bellnier DA, Greco WR, Loewen GM, Nava H, Oseroff AR, Pandey RK, Tsuchida T, Dougherty TJ. Population pharmacokinetics of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients, *Cancer Res* 2003, 15, 63(8), 1806-1813.

Bentley DP, Pepper CJ. The apoptotic pathway: a target for therapy in chronic lymphocytic leukemia, *Hematol Oncol* 2000, 18(3), 87-98.

Benedettini E, Nguyen P, Loda M. The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations, *Diagn Histopathol (Oxf)* 2008, 14(5), 195–201.

Betz C, Rauschnig W, Stranadko E, Riabov M, Albrecht V, Nifantiev N, Hopper C. Optimization of treatment parameters for Foscan-PDT of basal cell carcinomas. *Lasers Surg Med* 2008, 40, 300-311.

Bhowmick R, Girotti AW. Pro-Survival and Pro-Growth Effects of Stress-Induced Nitric Oxide in a Prostate Cancer Photodynamic Therapy Model, *Cancer Lett* 2014, 343(1), 1-19.

Biel MA. Photodynamic therapy of head and neck cancers, *Methods Mol Biol* 2010, 635, 281-293.

Bilgin MD, Biomedical application of photosensitization, Doktora Tezi, Illinois Institute of Technology, Chicago, IL, USA 1999.

Bilgin MD, Al-Akhras MA, Khalili M, Hemmati H, Grossweiner LI. Photosensitization of Red Blood Cell Hemolysis by Lutetium Texaphyrin, *Photochem. Photobiol* 2000, 72, 121-127.

Bilgin MD, Elçin AE, Elçin YM. Topical Use of Liposomal Copper Palmitate Formulation Blocks Porphyrin-Induced Photosensitivity in Rats, *J. Photochem. Photobiol.B Biol* 2005, 80, 107-114.

Bilgin MD, Aksel M, Degirmenci EH, Girit OB, Ozmen A. Efficacy of Methylene Blue and Aluminium Phthalocyanine Mediated Sonophotodynamic Therapy on Prostate Cancer Cell Lines, *Biophysical Journal*, 2017, 112 (3) Supp 1, 282A-283A, Meeting Abstract: 1385.

Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B. Human Prostate Cancer Risk Factors, *Cancer* 2004, 101(10), 2371–2490.

Bournat JC, Brown AMC, Soler AP. Wnt-1 dependent activation of the survival factor NF-kappa B in PC12 cells. *J Neurosci Res* 2000, 61, 21-32.

Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy, *Lasers Med Sci* 2002, 17(3), 173-186.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin* 2018, 68(6), 394-424.

Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002, 168(3), 906-913.

Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *Lancet Oncol*, 2004, 5, 497–500.

Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochim Biophys Acta* 2007, 1776, 86-107.

Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, Arora VK, Le C, Koutcher J, Scher H, Scardino PT, Rosen N, Sawyers CL. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN deficient prostate cancer. *Cancer Cell* 2011, 19, 575–586.

Chakrabarti P, Orihuela E, Egger N, Neal DE, Gangula R, Adesokun A, Motamedi M. Delta-Aminolevulinic Acid-Mediated Photosensitization of Prostate Cell Lines: Implication for Photodynamic Therapy of Prostate Cancer, *Prostate* 1998, 36, 211-218.

Chen B, Zheng R, Liu D, Li B, Lin J, Zhang W. The tumor affinity of chlorin e6 and its sonodynamic effects on non-small cell lung cancer, *Ultrason Sonochem* 2013, 20(2), 667-673.

Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, Rabbani SA. Up-regulation of Wnt-1 and β -catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications, *Cancer* 2004, 101(6), 1345–1356.

Chen H, Zhou X, Wang A, Zheng B, Yeh C, Huang J. Synthesis and biological characterization of novel rose Bengal derivatives with improved amphiphilicity for sonophotodynamic therapy, *Eur J Med Chem* 2018, 145, 86-95.

Chen SQ, Guttridge DC, You Z, Zhang Z, Fribley A, Mayo MW, Kitajewski J, Wang CY. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription, *J Cell Biol* 2001, 152(1):87-96.

Chen T, Yang I, Irby R, Shain KH, Wang HG, Quackenbush J, Coppola D, Cheng JQ, Yeatman TJ. Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli, *Cancer Res* 2003, 63(15),4368-4374.

Chen W, Xie D, Hou J, Long H, Li G, Pu J, Ouyang J, Wu Y. Inhibition of EGFR signaling in prostate cancer treated with EGFR siRNA and Gefitinib. *Life Sci J* 2012, 9 (2), 544-552.

Chen Y, Zheng W, Li Y, Zhong J, Ji J, Shen P. Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics, *Cancer Sci* 2008, 99(10), 2019–2027.

Chien AJ, Conrad WH, Moon RT. A Wnt Survival Guide: From Flies to Human Disease. *J Invest Dermatol* 2009, 129, 1614-1627.

Chiu SM, Xue LY, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy, *Br J Cancer* 2003, 89, 1590–1597.

Cho H, Li L, Bae YH, Huh KM, Kang HC. Bioreducible branched polyethyleneimine derivatives physically loaded with hydrophobic pheophorbide A: preparation, characterization, and light-induced cytotoxicity, *Macromol Biosci* 2014, 14(10), 1483–1494.

Cho M, Park GM, Kim SN, Amna T, Lee S, Shin WS. Glioblastoma-specific anticancer activity of pheophorbide a from the edible red seaweed *Grateloupia elliptica*, *J. Microbiol. Biotechnol* 2014, 24, 346–353.

Choi BH, Ryou IG, Kang HC, Kwak MK. The Sensitivity of Cancer Cells to Pheophorbide a-Based Photodynamic Therapy Is Enhanced by NRF2 Silencing, *PLoS One* 2014, 9(9): e107158. doi: 10.1371/journal.pone.0107158. eCollection 2014.

Cook MJ. Properties of Some Alkyl Substituted Phthalocyanines and Related Macrocycles, *Chem Rec* 2002, 2(4), 225-236.

Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010,28(7),1117-1123.

Cooperberg MR, Carroll PR, Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: progress and promise. *J Clin Oncol* 2011, 29 (27), 3669-3676.

Crowder RJ, Freeman RS. Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem* 2000, 275, 34266-34271.

Crouzet S, Rouviere O, Martin X, Gelet A. High-intensity focused ultrasound as focal therapy of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2014, 24(3), 225-230.

Çalışkan ÖS, Bilgin MD. The most recent studies in science and art, Gece Publishing, 2018, 1190-1206.

Caliskan SO, Ertabaklar H, Bilgin MD, Ertug S. In Vitro Evaluation of Photodynamic Therapy using Different Photosensitizers on *Leishmania Tropica* Promastigotes, *Biophysical Journal* 2017, 112 (3) Supp 1, 283A-283A, Meeting Abstract: 1387.

Dai S, Hu S, Wu C. Apoptotic effect of sonodynamic therapy mediated by hematoporphyrin monomethyl ether on C6 glioma cells in vitro, *Acta Neurochir* 2009, 151, 1655–1661.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points, *Cell* 2004, 116, 205-219.

De Haas ER, Kruijt B, Sterenborg HJ, Martino Neumann HA, Robinson DJ. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy, *J Invest Dermatol* 2006, 126(12), 2679-2686.

Delaey E, VanLaar F, DeVos D, Kamuhabwa A, Jacobs P, DeWitte PA. comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *J PhotochemPhotobiolBBiol* 2000, 55, 27–36.

Didenko YT, Suslick KS. The energy efficiency of formation of photons,radicals and ions during single-bubble cavitation. *Nature* 2002, 418, 394–397.

Didenko YT, McNamara WB, Suslick KS. Molecular emission from single-bubble sonoluminescence, *Nature* 2000, 407, 877-879.

Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer, *Nature* 2003, 3, 380-387.

Dos Santos AF, Terra LF, Wailemann RA, Oliveira TC, Gomes VM, Mineiro MF, Meotti FC, Bruni-Cardoso A, Baptista MS, Labriola L. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells, *BMC Cancer* 2017, 17(1), 194-209.

Duffy MJ. Prostate-specific antigen: does the current evidence support its use in prostate cancer screening, *Ann Clin Biochem* 2011,48(4),310-316.

Eder IE, Culig Z, Putz T, Nessler-Menardi C, Bartsch G, Klocker H. Molecular biology of the androgen receptor: From molecular understanding to the clinic. *Eur Urol* 2001, 40, 241–251.

Ellies DL, Church V, Francis-West P, Lumsden A. The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain, *Development* 2000,127, 5285-5295.

Fateye B, Li W, Wang C, Chen B. Combination of Phosphatidylinositol 3-Kinases Pathway Inhibitor and Photodynamic Therapy in Endothelial and Tumor Cells, *Photochem Photobiol.* 2012, 88, 1265–1272.

Fayter D, Corbett M, Heirs M, Fox D, Eastwood A. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett’s oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin, *Health Technol Assess* 2010, 14(37),1–288.

Fei B, Nieh PT, Master VA, Zhang Y, Osunkoya AO, Schuster DM. Molecular imaging and fusion targeted biopsy of the prostate, *Clin Transl Imaging* 2017, 5(1), 29-43.

Fernandez JM, Bilgin MD, Grossweiner LI. Singlet Oxygen Generation by Photodynamic Agents, *J. Photochem. Photobiol B: Biol* 1997, 37, 131-140.

Gann PH. Risk Factors for Prostate Cancer, *Rev Urol* 2002, 4(Suppl 5), 3-10.

Gao T, Furnari F, Newton A.C, Phlpp. A phosphatase that directly dephosphorylates AKT, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cells* 2005, 18, 13–24.

Garg AD, Nowis D, Golab J, Agostinis P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity, *Apoptosis* 2010, 15(9),1050-1071.

Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostatecarcinoma cells. *J Cell Sci* 2002,115(Pt 1),141-151.

Gervasi MG, Visconti PE. Molecular changes and signaling events occurring in sperm during epididymal maturation, *Andrology* 2017, 5(2), 204-218.

Gheewala T, Skwor T, Munirathinam G. Photodynamic therapy using pheophorbide and 670 nm LEDs exhibits anticancer effects in-vitro in androgen dependent prostate cancer, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018, 21, 130–137.

Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction, *Nature* 1998, 391(6665), 357-362.

Gorman A, Killoran J, O’Shea C, Kenna T, Gallagher WM, O’Shea DF. In Vitro Demonstration of the Heavy-Atom Effect for Photodynamic Therapy, *J Am Chem Soc.* 2004, 126(34), 10619-10631.

Graciano TB, Coutinho TS, Cressoni CB, dePaula Freitas C, Pierre MBR, DeLima Pereira SA. Using chitosan gels as a toluidine blue O delivery system for photodynamic therapy of buccal cancer: in vitro and in vivo studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2015, 12, 98–107.

Grossweiner LI, Bilgin MD, Berdusis P, Mody TM. Singlet Oxygen Generation by Metallotexaphyrins, *Photochem Photobiol* 1999, 70: 138-145.

Grossweiner LI, Jones LR, Grossweiner JB, Rogers BHG. The science of phototherapy: An Introduction, Springer, 2005.

Grimes CA, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium, *J Neurochem* 2001, 78, 1219-1232.

Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The Worldwide Epidemiology of Prostate Cancer: Perspectives from Autopsy Studies, *Can J Urol* 2008, 15(1), 3866–3871.

Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 2000, 405, 76-81.

Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology* 2002, 60(2), 40-49.

Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-Part B: prostate and bladder tumours, *Eur Urol* 2016, 70(1), 106-119.

Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2010, 11, 539-551.

Ismail HA, Lessard L, Mes-Masson AM, Saad F. Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *The Prostate* 2004,58,308–313.

Ito K. Prostate cancer in Asian men, *Nat Rev Urol.* 2014, 11, 197–212.

Jin ZH, Miyoshi N, Ishiguro K, Umemura S, Kawabata K, Yumita N, Sakata I, Takaoka K, Udagawa T, Nakajima S, Tajiri H, Ueda K, Fukuda M, Kumakiri M. Combination effect of photodynamic and sonodynamic therapy on experimental skin squamous cell carcinoma in C3H/HeN mice, *J. Dermatol* 2000, 27(5), 294–306.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003, 284 (1), 31–53.

Junghans D, Hack I, Frotscher M, Taylor V, Kemler R. Beta-catenin-mediated cell-adhesion is vital for embryonic forebrain development, *Dev Dyn* 2005, 233(2), 528-539.

Karin M, Greten FR. NFκB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005, 5 (10), 749-759.

Katoh M. Regulation of WNT signaling molecules by retinoic acid during neuronal differentiation in NT2 cells: Threshold model of WNT action. *Int J Mol Med* 2002, 10, 683-687.

Kenyon JN, Fuller RJ. Outcome Measures Following Sonodynamic Photodynamic Therapy- A Case Series, *Current Drug Therapy*, 2011, 6, 12-16.

Kessel D, Poretz RD. Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME), *Photochem. Photobiol* 2000, 71, 94-96.

Kim HJ, Lee WJ. Ligand-independent activation of the androgen receptor by insulin-like growth factor-I and the role of the MAPK pathway in skeletal muscle cells. *Mol. Cells* 2009, 28, 589–593.

Kim KY, Ahn JH, Cheon HG. Apoptotic action of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in human non small-cell lung cancer is mediated via proline oxidase-induced reactive oxygen species formation, *Mol Pharmacol* 2007, 72(3), 674-85.

Kitsis RN, Molkentin JD. Apoptotic cell death "Nixed" by an ER-mitochondrial necrotic pathway, *Proc Natl Acad. Sci* 2010, 107, 9031-9032.

Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*, *J Endod* 2013, 39(3), 411-414.

Komori C, Okada K, Kawamura K, Chida S, Suzuki T. The sonodynamic antitumor effect of methylene blue on sarcoma180 cells in vitro, *Anticancer Res* 2009, 29(6), 2411-2415.

Kraus D, Palasuberniam P, Chen B. Targeting Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway for Therapeutic Enhancement of Vascular-Targeted Photodynamic Therapy, *Mol Cancer Ther* 2017, 16(11), 2422-2431.

Kujundzić M, Vogl TJ, Stimac D, Rustemović N, Hsi RA, Roh M, Katicić M, Cuenca R, Lustig RA, Wang S. A Phase II safety and effect on time to tumor progression study of intratumoral light infusion technology using talaporfin sodium in patients with metastatic colorectal cancer, *J Surg Oncol.* 2007, 96(6), 518-524.

Kuroki M, Hachimine K, Abe H, Shibaguchi H, Kuroki M, Maekawa S, Yanagisawa J, Kinugasa T, Tanaka T, Yamashita Y. Sonodynamic Therapy of Cancer Using Novel Sonosensitizers, *Anticancer Res* 2007, 27, 3673-3678.

Kvale R, Auvinen A, Adami HO. Interpreting trends in prostate cancer incidence and mortality in the five Nordic countries, *J Natl Cancer Inst* 2007, 99, 1881-1887.

Lakshmanan S, Gupta GK, Avci P, Chandran R, Sadasivam M, Jorge AES, Hamblin MR. Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation, *Adv Drug Deliv Rev* 2014, 71, 98-114.

Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology, *Endocrinol Metab Clin N Am* 2011, 40, 565–575.

Lee DJ, Mallin K, Graves AJ, Chang SS, Penson DF, Resnick MJ, Barocas DA. Recent changes in prostate cancer screening practices and prostate cancer epidemiology, *J Urol* 2017 198(6), 1230-1240.

Lee TK, Baron ED, Foster TH. Monitoring Pc 4 photodynamic therapy in clinical trials of cutaneous T-cell lymphoma using noninvasive spectroscopy, *J Biomed Opt* 2008, 13(3), 1-8.

Lessard L, Begin LR, Gleave ME, Mes-Masson AM, Saad F. Nuclear localisation of nuclear factor-kappaB transcription factors in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Br J Cancer* 2005, 93, 1019–1023.

Li F, Chong ZZ, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise, *Histol Histopathol* 2006, 21, 103-124.

Li Q, Wang X, Wang P, Zhang K, Wang H, Feng X, Liu Q. Efficacy of Chlorin e6-Mediated Sono-Photodynamic Therapy on 4T1 Cells, *Cancer Biother Radiopharm* 2014, 29(1), 42–52.

Li X, Placencio V, Iturregui JM, Uwamariya C, Sharif-Afshar AR, Koyama T, Hayward SW, Bhowmick NA. Prostate tumor progression is mediated by a paracrine TGF-beta/Wnt3a signaling axis, *Oncogene* 2008, 27(56), 7118–7130.

Lim EJ, Oak CH, Heo J, Kim YH. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells, *Oncol Rep* 2013, 30(2), 856-862.

Liu HL, Fan CH, Ting CY, Yeh CK. Combining Microbubbles and Ultrasound for Drug Delivery to Brain Tumors: Current Progress and Overview, *Theranostics* 2014, 4(4), 432-44.

Liu LY, Man XX, Yao XX, TAN YY. Effects of pheophorbide a-mediated photodynamic therapy on proliferation and metastasis of human prostate cancer cells, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017, 21(24), 5571-5579.

Liu QH, Wang XB, Wang K, Liao X. Sonodynamic Antitumor Effect of Protoporphyrin IX Disodium Salt on S180 Solid Tumor, *Chemotherapy* 2007, 53, 429-436.

Liu T, Wu LY, Choi JK, Berkman CE. Targeted photodynamic therapy for prostate cancer: Inducing apoptosis via activation of the caspase-8/-3 cascade pathway, *Int J Oncol* 2010, 36, 777-784.

Liu Y, Wang P, Liu Q, Wang X. Sinoporphyrin sodium triggered sono-photodynamic effects on breast cancer both in vitro and in vivo, *Ultrason Sonochem* 2016, 31, 437-448.

Lin SL, Li B, Rao S, Yeo EJ, Hudson TE, Nowlin BT, Pei H, Chen L, Zheng JJ, Carroll TJ, Pollard JW, McMahon AP, Lang RA, Duffield JS. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(9), 4194-4199.

Loewen GM, Pandey R, Bellnier D, Henderson B, Dougherty T. Endobronchial photodynamic therapy for lung cancer, *Lasers Surg Med* 2006, 38(5), 364-370.

Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog* 2011, 10(20), 1-40.

Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy, *Chem Rev* 2015, 115(4), 1990-2042.

Lukyanets EA. Phthalocyanines as Photosensitizers in the Photodynamic Therapy of Cancer, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 1999, 3, 424–432.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases, *Dev. Cell* 2009, 17, 9-26.

Magda D, Miller RA. Motexafin gadolinium: a novel redoxactive drug for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2006, 16, 466–476.

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway, *Mol Cell* 2001 7(4), 801-809.

Maree S, Phillips D, Nyokong T. Synthesis, Photophysical and Photochemical Studies of Germanium and Tin Phthalocyanine Complexes, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2002, 6(1),17-25.

McEwan C, Nesbitt H, Nicholas D, Kavanagh ON, McKenna K, Loan P, Jack IG, McHale AP, Callan JF. Comparing the efficacy of photodynamic and sonodynamic therapy in non-melanoma and melanoma skin cancer, *Bioorg Med Chem* 2016, 24, 3023-3028.

Mirkovic I, Charish K, Gorski SM, McKnight K, Verheyen EM. *Drosophila nemo* is an essential gene involved in the regulation of programmed cell death, *Mech Dev* 2002, 119(1), 9-20.

Misik V, Riez P. Free Radical Intermediates in Sonodynamic Therapy, *Ann NY Acad. Sci* 2000, 899, 335-348.

Miyoshi N, Misik V, Riesz P. Sonodynamic toxicity of gallium–porphyrin analogue ATX-70 in human leukemia cells, *Radiation Research* 1997, 148(1), 43–47.

Miyoshi N, Kundu SK, Tuziuti T, Yasui K, Shimada I, Ito Y. Combination of sonodynamic and photodynamic therapy against cancer would be effective through using a regulated size of nanoparticles, *Nanosci Nanoeng* 2016, 4, 1-11.

Moon S, Bae JY, Son HK, Lee DY, Kim LJ. RUNX3 confers sensitivity to pheophorbide a-photodynamic therapy in human oral squamous cell carcinoma cell lines, *Lasers Med Sci* 2015, 30(2), 499-507.

Muehlmann LA, Rodrigues MC, Longo JPF, Garcia MP, Py-Daniel KR, Veloso AB. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7cells. *J Nanobiotechnol* 2015, 13, 36 doi: 10.1186/s12951-015-0095-3.

Nagata S, Obana A, Gohto Y, Nakajima S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na), *Lasers Surg.Med* 2003, 33, 64-70.

Ng TK, Vasilareas D, Mitterdorfer AJ, Maher PO, Lalak A. Prostate cancer detection with digital rectal examination, prostate-specific antigen, transrectal ultrasonography and biopsy in clinical urological practice, *BJU Int* 2005, 95(4), 545-548.

Niemann C, Owens DM, Hülsken J, Birchmeier W, Watt FM. Expression of DeltaN Δ Lef1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours, *Development* 2002, 129(1), 95-109.

Nogueira L, Corradi R, Eastham JA. Prostatic Specific Antigen for Prostate Cancer Detection, *International Braz J Urol* 2009, 35(5), 521-531.

Nomura H, Koda S, Yasuda K, Kojima Y. Quantification of ultrasonic intensity based on the decomposition reaction of porphyrin, *Ultrason. Sonochem* 1996, 3, 153-156.

Nusse R. WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet* 1999, 15, 1-3.

- Nusse R.** Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005, 15, 28-32.
- Nyman ES, Hynninen PH.** Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004 73(1-2),1-28
- O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT.** Porphrine and Nonporphyrine photosensitizers in Oncology. *Photochem Photobiol* 2009, 85, 1053-1074.
- Ormond AB, Freeman AB.** Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* 2013, 6, 817–840.
- Panjehpour M, Overholt BF.** Porfimer sodium photodynamic therapy for management of Barrett's esophagus with high-grade dysplasia, *Lasers Surg Med* 2006, 38(5), 390-395.
- Pan X, Wang H, Wang S, Sun X, Wang L, Wang W, Shen H, Liu H.** Sonodynamic therapy (SDT): a novel strategy for cancer nanotheranostics, *Sci China Life Sci* 2018, 61(4), 415-426.
- Pang X, Xu C, Jiang Y, Xiao Q, Leung AW.** Natural products in the discovery of novel sonosensitizers, *Pharmacol Ther* 2016, 162, 144–151.
- Panhuisen M, Vogt Weisenhorn DM, Blanquet V, Brodski C, Heinzmann U, Beisker W, Wurst W.** Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Mol Cell Neurosci* 2004, 26(1), 101-111.
- Panzarini E, Inguscio V, Dini L.** Overview of Cell Death Mechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy, *Int J Photoenergy*, 2011, doi.10.1155/2011/713726.
- Park SY, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN.** Fat and meat intake and prostate cancer risk: the multiethnic cohort study, *Int J Cancer* 2007, 121(6), 1339-1345.
- Patel H, Mick R, Finlay J, Zhu TC, Rickter E, Cengel KA, Malkowicz SB, Hahn SM, Busch TM.** Motexafin lutetium-photodynamic therapy of prostate cancer: short- and long-term effects on prostate-specific antigen, *Clin Cancer Res* 2008, 14(15), 4869-4876.
- Pecina-Slaus N.** Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell Int* 2010, 10, 1-5.
- Peifer M, Polakis P.** Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - a look outside the nucleus, *Science* 2000, 287, 1606-1609.
- Pienta KJ, Bradley D.** Mechanisms underlying the development of androgen independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6): 1665-1671.
- Piette J.** Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF- κ B at the crossroad between oncology and immunology, *Photochem Photobiol Sci* 2015,14(8),1510-1517.
- Pietra ED, Simonella F, Bonavida B, Xodo LE, Rapozzi V.** Repeated sub-optimal photodynamic treatments with pheophorbide a induce an epithelial mesenchymal transition in prostate cancer cells via nitric oxide, *Nitric Oxide* 2015, 45, 43–53.

Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice, *Nature* 2000, 407(6803), 535-538.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000, 14, 1837-1851.

Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality, Part I: International comparisons, *BJU Int* 2002, 90, 162-173.

Qin Z, Li X, Zhang J, Tang J, Han P, Xu Z, Yu Y, Yang C, Wang C, Xu T, Xu Z, Zou Q. Chemotherapy with or without estramustine for treatment of castration-resistant prostate cancer: A systematic review and meta-analysis, *Medicine* 2016, 95(39):e4801. doi: 10.1097/MD.0000000000004801.

Ranjan P, Saurabh G, Bansal R, Gupta A. High intensity focused ultrasound vs. cryotherapy as primary treatment for prostate cancer, *Indian J Urol* 2008, 24(1), 16–21.

Rassweiler J, Sentker L, Seemann O, Hatzinger M, Rumpelt HJ. Laparoscopic radical prostatectomy with the Heilbronn technique: an analysis of the first 180 cases. *J Urol* 2001, 166(6), 2101-2108.

Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans JA. Family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94, 2859-2863.

Rees J, Patel B, Macdonagh R, Persad R. Cryosurgery for prostate cancer. *BJU Int* 2004, 93, 710-714.

Rentsch CA, Cecchini MG, Thalmann GN. Loss of inhibition over master pathways of bone mass regulation results in osteosclerotic bone metastases in prostate cancer. *Swiss Medical Weekly* 2009, 139(15-16), 220-225.

Rianna C, Kumar P, Radmacher M. The Role of the Microenvironment in the Biophysics of Cancer, *Semin Cell Dev Biol* 2017, 73, 107-114.

Rios R, De Crevoisier R, Ospina JD, Commandeur F, Lafond C, Simon A, Haigron P, Espinosa J, Acosta O. Population model of bladder motion and deformation based on dominant eigenmodes and mixed-effects models in prostate cancer radiotherapy, *Med Image Anal* 2017, 38, 133-149.

Roemeling S, Roobol MJ, de Vries SH, Gosselaar C, van der Kwast TH, Schröder FH. Prevalence, treatment modalities and prognosis of familial prostate cancer in a screened population. *J Urol* 2006, 175(4), 1332-1336.

Rosenthal I, Sostaric JZ, Riesz P. Sonodynamic therapy– a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound, *Ultrason Sonochem* 2004, 11, 349-363.

Rubin, MA, De Marzo AM. Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol* 2004, 17(3), 380–388.

Sadanala KC, Chaturvedi PK, Seo YM, Kim JM, Jo YS, Lee YK, Ahn WS. Sono-photodynamic combination therapy: a review on sensitizers, *Anticancer Res* 2014, 34, 4657–4664.

Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. “2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri”<https://www.saglik.gov.tr/Eklenti/8635,kanser-istatistikleridocx.docx?0-erişim tarihi:06.06.2019>.

Sato T, Kishi S, Matsumoto H, Mukai R. Combined photodynamic therapy with verteporfin and intravitreal bevacizumab for polypoidal choroidal vasculopathy, *Am J Ophthalmol* 2010, 149(6), 947-954.

Schweizer L, Rizzo CA, Spires TE, Platero JS, Wu Q, Lin T, Gottardis MM, Attar RM. The androgen receptor can signal through Wnt/ β -Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens, *BMC Cell Biol* 2008, 9(4), 1-15.

Sebastiano KM, Mourtzakis M. The Role of Dietary Fat throughout the Prostate Cancer Trajectory, *Nutrients* 2014, 6(12), 6095–6109.

Segelman AB, Hagen IK, Chernomorsky SA, Lee SY, Gadi IK, Weadock K, Sigel GH. Intracellular distribution of porphyrin-based photosensitizers in vitro cultured human bladder tumor cells, *Proc SPIE int Soc Opt Eng*, 1987, 1065, 197-204.

Senthilmurugan R, Ramamurthy VP, Njar VCO. Dissecting Major Signaling Pathways in Prostate Cancer Development and Progression: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets, *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017, 166, 16-27.

Shah RB, Ghosh D, Elder JT. Epidermal growth factor receptor (ErbB1) expression in prostate cancer progression: correlation with androgen independence. *The Prostate* 2006, 66(13), 1437–1444.

Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, 5(4): a008656 1-21.

Sheridan C, Martin JS. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis, *Mitochondrion* 2010, 10(6), 640–648.

Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer. *Anticancer Res* 2011, 31, 2425–2429.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2018, *Ca Cancer J Clin* 2018, 68(1), 7-30.

Story MT, Hopp KA, Meier DA, Begun FP, Lawson RK. Influence of transforming growth factor beta 1 and other growth factors on basic fibroblast growth factor level and proliferation of cultured human prostate-derived fibroblasts. *Prostate* 1993, 22, 183-197.

Siu T, Jackson J, Burt H, Chiao M. Drug Uptake Enhancement Using Sonodynamic Effects at 4 MHz—A Potential Application for Micro-Ultrasonic-Transducers, *IEEE Trans Biomed Eng* 2007, 54, 1153-1156.

Siu T, Rohling RN, Chiao M. Power density requirement of a 4 MHz micro-ultrasonic transducer for sonodynamic therapy, *Biomed Microdevices* 2008, 10, 89–97.

Song W, Cui H, Zhang R, Zheng J, Cao W. Apoptosis of SAS cells induced by sonodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid sonosensitizer, *Anticancer Res* 2011, 31(1), 39–46.

Srinualnad S, Udompunturak S. Extraperitoneal Laparoscopic Radical Prostatectomy: Early Experience in Thailand, *Asian J Surg* 2007, 30(2), 272-277.

Stolzenburg JU, Kallidonis P, Minh D, Dietel A, Häfner T, Dimitriou D, Al-Aown A, Kyriazis I, Liatsikos EN. Endoscopic extraperitoneal radical prostatectomy: evolution of the technique and experience with 2400 cases. *J Endourol* 2009, 23(9),1467-1472.

Sugimura R, Li LH. Noncanonical Wnt Signaling in Vertebrate Development, Stem Cells, and Diseases, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90, 243-256.

Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gélinas C, Rabson AB. Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate* 2002, 52, 183-200.

Suzuki N, Okada K, Chida S, Komori C, Shimada Y, Suzuki T. Antitumor Effect of Acridine Orange Under Ultrasonic Irradiation In Vitro, *Anticancer Res* 2007, 27, 4179-4184.

Szasz, A. Hyperthermia, a modality in the wings, *J Cancer Res Ther.* 2007, 3, 56-66.

Tachibana K, Feril LB, Ikeda-Dantsuji Y. Sonodynamic therapy, *Ultrasonics* 2008, 48, 253–259.

Tachibana K, Kimura N, Okamura M, Eguchi H, Tachibana S. Enhancement of cell killing of HL-60 cells by ultrasound in the presence of the photosensitizing drug Photofrin II, *Cancer Lett* 1993, 72, 195–199.

Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction, *Nature* 2000, 407, 530-535.

Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. A mechanism for Wnt coreceptor activation, *Mol Cell* 2004, 13(1),149-156.

Taneja SS, Bennett J, Coleman J, Grubb R, Andriole G, Reiter RE, Marks L, Azzouzi AR, Emberton M. Final Results of a Phase I/II Multicenter Trial of WST11 Vascular Targeted Photodynamic Therapy for Hemi-Ablation of the Prostate in Men with Unilateral Low Risk Prostate Cancer Performed in the United States, *J Urol* 2016, 196(4),1096-1104.

Tanielian C, Kobayashi M, Wolff C. Mechanism of photodynamic activity of pheophorbides, *J Biomed Opt* 2001, 6(2), 252-256.

Tardivo JP, Del Giglio A, De Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, Severino D, Turchiello RF, Baptista MS. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications, *Photodiagn Photodyn* 2005, 2, 175-191.

Tata DB, Biglow J, Wu J, Triton TR, Dunn F. Ultrasound-enhanced hydroxyl radical production from two clinically employed anti-cancer drugs, adriamycin and mitomycin C, *Ultrason Sonochem* 1996, 3, 39–45.

Tedesco AC, Rotta JC, Lunardi CN. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy, *Current Organic Chemistry*, 2003, 7, 187-196.

Thiele S, Rauner M, Goettsch C, Rachner TD, Benad P, Fuessel S, Erdmann K, Hamann C, Baretton GB, Wirth MP, Jakob F, Hofbauer LC. Expression profile of WNT molecules in prostate cancer and its regulation by aminobisphosphonates, *J Cell Biochem* 2011, 112(6), 1593-1600.

Thong PS, Olivo M, Kho KW, Bhuvanewari R, Chin WW, Ong KW, Soo KC. Immune response against angiosarcoma following lower fluence rate clinical photodynamic therapy, *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2008, 27(1), 35-42.

Tian Y, Leung W, Yue K, Mak N. Cell death induced by MPPa–PDT in prostate carcinoma in vitro and in vivo, *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 348, 413–420.

Toren P, Zoubeydi A. Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: Challenges and opportunities, *Int J Oncol* 2014, 45(5), 1793-1801.

Trendowski, M. The promise of sonodynamic therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2014, 33,143–160.

Umemura K, Yumita N, Nishigaki R, Umemura S. Sonodynamically induced antitumor effect of pheophorbide a, *Cancer Lett* 1996, 102, 151-157.

Umemura S, Yumita N, Nishigaki R, Umemura K. Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with Hematoporphyrin, *Jpn. J. Cancer Res* 1990, 81, 962-966.

Umemura S, Yumita N, Okano Y, Kaneuchi M, Magario N, Ishizaki M, Shimizu K, Sano Y, Umemura K, Nishigaki R. Sonodynamically-induced in vitro cell damage enhanced by adriamycin, *Cancer Lett* 1997, 121, 195–201.

Umemura S, Yumita N, Umemura K, Nishigaki R. Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells, *Cancer Chemother. Pharmacol* 1999, 43, 389-393.

Urbanska K, Romanowska-Dixon B, Matuszak Z, Oszejca J, Nowak-Sliwinska P, Stochel G. Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas, *Acta Biochim Pol* 2002, 49(2), 387-391.

Wada A. Lithium and Neuropsychiatric Therapeutics: Neuroplasticity via Glycogen Synthase Kinase-3 beta, beta-Catenin, and Neurotrophin Cascades. *J Pharmacol Sci* 2009, 110, 14-28.

Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 2005, 132, 4421-4436.

Wang L, Yang H, Li B. Photodynamic therapy for prostate cancer: a systematic review and meta-analysis, *Prostate Int* 2019, 7(3), 83-90.

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, CHU TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979, 17(2), 159-163.

Wang X, Goode EL, Fredericksen ZS, Vierkant RA, Pankratz VS, Liu-Mares W, Rider DN, Vachon CM, Cerhan JR, Olson JE, Couch FJ. Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, 17(8), 2101-2108.

Wang X, Luo J, Leung AW, Li Y, Zhang H, Xu C. Hypocrellin B in hepatocellular carcinoma cells: Subcellular localization and sonodynamic damage. *Int J Radiat Biol* 2015, 91(5), 399-406.

Wang X, Wang Y, Wang P, Cheng X, Liu Q. Sonodynamically induced anti-tumor effect with protoporphyrin IX on hepatoma-22 solid tumor, *Ultrasonics* 2010, 51(5), 539-546.

Wang XB, Liu QH, Wang P, Zhang K, Tang W, Wang BL. Enhancement of Apoptosis by Sonodynamic Therapy with Protoporphyrin IX in Isolate Sarcoma 180 Cells, *Cancer Biother Radiopharm* 2008, 23(2), 238-246.

Wang S, Avery JE, Hannafon BN, Lind SE, Ding WQ. Zinc protoporphyrin suppresses cancer cell viability through a heme oxygenase-1-independent mechanism: the involvement of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Biochem Pharmacol* 2013, 85(11), 1611-1618.

Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem* 1996, 271(8), 4468-4476.

Woodhams JH, MacRobert AJ, Novelli M, Bown SG. Photodynamic therapy with WST09 (Tookad): quantitative studies in normal colon and transplanted tumours, *Int J Cancer* 2006, 118(2), 477-82.

Wu Y, Liu X, Qin Z, Hu L, Wang X. Low-frequency ultrasound enhances chemotherapy sensitivity and induces autophagy in PTX-resistant PC-3 cells via the endoplasmic reticulum stress-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Onco Targets Ther* 2018, 11, 5621-5630.

Xiang J, Xia X, Jiang Y, Leung AW, Wang X, Xu J, Wang P, Yu H, Bai D, Xu C. Apoptosis of ovarian cancer cells induced by methylene blue-mediated sonodynamic action, *Ultrasonics*, 2011, 51(3), 390-395.

Xodo LE, Rapozzi V, Zacchigna M, Drioli S, Zorzet S. The Chlorophyll Catabolite Pheophorbide a as a Photosensitizer for the Photodynamic Therapy, *Curr Med Chem* 2012, 19, 799-807.

Xu DD, Lam HM, Hoeven R, Xu CB, Leung AW, Cho WC. Photodynamic therapy induced cell death of hormone insensitive prostate cancer PC-3 cells with autophagic characteristics, *Photodiagn Photodyn Ther* 2013, 10, 278–287.

Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: A role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event, *Exp Cell Res* 2001, 263, 145-155.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009, 27, 693-733.

Verma M, Patel P, Verma M. Biomarkers in prostate cancer epidemiology. *Cancers* 2011, 3(4), 3773-3798.

Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W, Kikuchi A. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase, *Oncogene* 2010, 29(14), 2036-2046.

Yıldırım M. İnsan anatomisi kitabı, 2005, 185-186.

Yılmaz B, Sarıkaya D. Prostat Kanseri İnsidansı ve Risk Faktörleri, *Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics* 2017, 10(4), 337-342.

Yochum GS, Cleland R, Goodman RH. A Genome-Wide Screen for beta-Catenin Binding Sites Identifies a Downstream Enhancer Element That Controls c-Myc Gene Expression. *Mol Cell Biol.* 2008, 28(24), 7368-7379.

You Z, Saims D, Chen S, Zhang Z, Guttridge DC, Guan KL, MacDougald OA, Brown AM, Evan G, Kitajewski J, Wang CY. Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis, *J Cell Biol* 2002, 157(3), 429-440.

Yu T, Wang Z, Mason TJ. A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy, *Ultrason Sonochem* 2004, 11, 95–103.

Yumita N, Nishigaki R, Umemura K. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound, *Jpn J Cancer Res* 1989, 80, 219–222.

Yumita N, Nishigaki R, Umemura K, Umemura S. Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180, *J. Jpn Cancer Res* 1990, 81, 30-38.

Yumita N, Sasaki K, Umemura S, Nishigaki R. Sonodynamically induced antitumor effect of a gallium-porphyrin complex, ATX-70, *Jpn J Cancer Res* 1996, 87, 310-316.

Zarif JC, Miranti CK. The importance of non-nuclear AR signaling in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *Cell Signal* 2016, 28, 348–356.

Zechner D, Fujita Y, Hülsken J, Müller T, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB, Birchmeier W, Birchmeier C. beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system, *Dev Biol* 2003, 258(2), 406-418.

Zhang L, Altuwaijri S, Deng F, Chen L, Lal P, Bhanot UK, Korets R, Wenske S, Lilja HG, Chang C, Scher HI, Gerald WL. NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth, *Am J Pathol* 2009, 175(2), 489-499.

Zhao H, Zhang Y, Zhao B, Chang Y, Li Z. Electrochemical reduction of carbon dioxide in an MFC-MEC system with a layer-by-layer self-assembly carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode, *Environ Sci Technol* 2011, 46(9), 5198-5204.

Zheng L, Sun X, Zhu X, Lv F, Zhong Z, Zhang F, Tian Y. Apoptosis of THP-1 derived macrophages induced by sonodynamic therapy using a new sonosensitizer hydroxyl acetylated curcumin, *PloS one*, 2014, 9(3),1-10.

Zhu H, Mazor M, Kawano Y, Walker MM, Leung HY, Armstrong K, Waxman J, Kypta RM. Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor, *Cancer Res* 2004, 64(21), 7918-7926.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Mehran AKSEL
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Yenipazar/Aydın 15.07.1981
Telefon : +90 555 3978286
E-mail : mehran.aksel@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	ADU Biyofizik	2019
Y. Lisans	ESOGU Fizik	2011
Lisans	ESOGU Fizik	2007

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

- 1.Sözlü Bildiri 2. lik ödülü , 1st International Urban, Environment and Health Congress, 2016.
- 2.Poster 3. Ödülü, 26. Biyofizik Kongresi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, 2014.

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013-devam ediyor	ADU Biyofizik AD	Araş. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

1. **Erdoğan Ö, Abbak M, Demirbolat GM, Birtekocak F, Aksel M, Pasa S, Cevik Ö.** Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: The characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells, *PLOS ONE* 2019| <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216496>.
2. **Bilgin MD, Aksel M, Değirmenci EH, Bozkurt Girit Ö, Özmen A.** Efficacy of Methylene Blue and Aliminium Phthalocyanine MediatedSonophotodynamic Therapy on Prostate Cancer Cell Lines, *Biophysical journal* 2017, 112(3) 282a-283a.
3. **Kızılay Z, Çetin Kahraman N, Aksel M, Abas Bİ, Aktaş S, Erken HA, Topçu A, Yılmaz A, Yenisey Ç** Ozone Partially Decreases Axonal and Myelin Damage in an Experimental Sciatic Nerve Injury Model. *Journal of Investigative Surgery* 2017, 32(1)8-17.

4. **Sebetci Ö, Aksel M.** An Overview of the Studies of Health Information Systems in Turkey. *International Journal of Computer Science and Engineering* 2016, 4(08), 100-106.
5. **Erduran M, Hapa O, Şen B, Kocabey Y, Erdemli D, Aksel M, Havıtcıoğlu H.** The effect of inclination angle on the strength of vertical mattress configuration for meniscus repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 2015, 23(1), 41-44.
6. **Kürkçüoğlu GS, Yeşilel OZ, Aksel M, Büyükgüngör O.** Hetero octanuclear cubane like and one dimensional cyano complexes with the N N dimethylethylenediamine ligand. *Polyhedron* 2015, 85, 720-726.
7. **Aksel M, Kürkçüoğlu GS, Yeşilel OZ, Büyükgüngör O.** One Dimensional Heteropolynuclear Tetracyanopalladate II Complexes Syntheses Crystal Structures Thermal Analyses and Spectroscopic Investigations. *Journal of Molecular Structure* 2014, 1059(1), 101-107.
8. **Kürkçüoğlu GS, Hökelek T, Aksel M, Yeşilel OZ, Dal H.** Cyano Bridged Heteropolynuclear Ni II Cu II and Cd II Complexes M deten 2Ni CN 2 CN 2 n. *Journal Of Inorganic And Organometallic Polymers And Materials* 2011, 21(3), 602-610.
9. **Aksel M, Kavlak İ, Kürkçüoğlu GS.** A theoretical and experimental investigation of vibrational spectra and electronic transitions on 3 methylphenylamine molecule as organic semiconductor. *International Journal of Hydrogen Energy* 2009, 34(12), 5234-5241.

2. PROJELER

1. Pc 3 ve Lncap prostat kanseri hücre dizilerinde fotosensitif ve sonosensitif ajanlar Fitalosiyanın ve metilen mavisi ile fotodinamik ve sonodinamik tedavilerin etkilerinin In vitro incelenmesi, Tubitak SBAG 114S491Nolu Proje, Bursiyer, 15/10/2014 - 15/04/2017.
2. Prostat Kanseri Hücre Dizininde Fotodinamik ve Sonodinamik Tedavilerin Etkisi, Adnan Menderes Üniversitesi TPF-15068 Nolu BAP Projesi, Araştırmacı, 14/09/2015-14/11/2019.
3. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Marl 18001, Gümüş nanopartiküllerinin yeşil kimya yöntemi ile sentezlenmesi ve fotodinamik terapi ile kombinasyonuyla gliablastoma hücrelerinde antikanser potansiyelinin araştırılması, Yardımcı Araştırmacı (2019).
4. Osmangazi Üniversitesi 201019024 numaralı BAP projesi, Araştırmacı (2009-2011).

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Aksel M, Kesmez Ö, Yavaş A, Bilgin MD.** Effects of combined sonodynamic and photodynamic therapies with titanium dioxide on cancer cell lines. 22nd International Biomedical Science Technology Symposium BIOMED 2017 (Poster).
2. **Bilgin MD, Bozkurt Girit Ö, Çalışkan SÖ, Aksel M, Ertuğ S, Özmen A, Telli M, Değirmenci EH, Ertabaklar H.** Applications of photodynamic therapy: Prostate cancer and cutaneous Leishmaniasis. 22. International Biomedical Science and Technology Symposium BIOMED2017 (Davetli Konuşmacı).

3. **Aksel M, Bilgin MD, Bozkurt Girit Ö, Telli M, Değirmenci EH, Özmen A.** The efficiency of methylene blue-mediated sonophotodynamic therapy on prostate cancer cell lines. 22. International Biomedical Science and Technology Symposium BIOMED2017 (Poster).
4. **Bilgin MD, Aksel M, Değirmenci EH, Bozkurt Girit Ö, Özmen A.** Efficacy of Methylene Blue and Aliminium Phytalocyanine Mediated Sonophotodynamic Therapy on Prostate Cancer. Biophysical Society 61. Annual Meeting, 3(112), 282-283. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.1530> (Poster).
5. **Aksel M, Bozkurt Ö, Değirmenci EH, Özmen A, Bilgin MD.** Effects of sonodynamic therapy on prostate cancer cell line. 6. oksidatif stres, Kalsiyumsinyali ve TRP Kanalları Dünya kongresi 2016 (Poster).
6. **Demirtaş S, Şirinyıldız F, Orak C, Yeşilçayır Taşlı G, Ek RO, Cesur G, Bozkurt Ö, Aksel M, Yıldız Y.** Protective effects of dexpanthenol on trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis in rats. 6. Oksidatif stres, Kalsiyum sinyali ve TRP kanalları Dünya kongresi 2016 (Poster).
7. **Bilgin MD, Evcı Kiraz ED, Bozkurt Ö, Kılıç MA, Bakay D, Köken EC, Aksel M.** Cep Telefonları ve Sağlık Üzerine Zararlı Etkileri Hakkında Üniversite Öğrencilerinin Bilgi Düzeylerinin Değerlendirilmesi. 1st International Urban, Environment and Health Congress 2016 (Sözlü Sunum).
8. **Bilgin MD, Evcı Kiraz ED, Bozkurt Ö, Kılıç MA, Bakay D, Aksel M, Köken EC.** Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Kampüsünde elf emf Ölçümleri ve Öğrencilerin elf emf Maruziyeti Hakkındaki Bilgi Düzeyleri. 1st International Urban, Environment and health Congress 2016 (Sözlü Sunum).
9. **Kürkçüoğlu GS, Kavlak İ, Aksel M.** The Theoretical Studies on Vibrational and Electronic Spectra on Triphenylamine. 9th International Balkan Workshop on Applied Physics, 2008 Romanya (Poster).
10. **Kürkçüoğlu GS, Aksel M, Kavlak İ.** Theoretical Investigations of Molecular Structure Electronic and Vibrational Spectra on 3 Pyrroline. 9th International Balkan Workshop on Applied Physics, 2008 Romanya (Poster).
11. **Kürkçüoğlu GS, Kavlak İ, Aksel M.** An Experimental and Theoretical Investigation of Vibrational Spectra And Electronic Transitions of Triphenylamine As Hole Transporting Materials in Organic Semiconductors. Nanomat, (International workshop on advanced materials and devices for photovoltaic applications) 2008 Ankara, (Poster).

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Aksel M, Bozkurt Girit Ö, Değirmenci EH, Özmen A, Telli M, Bilgin MD.** Prostat Kanseri Hücre Dizinlerinde Metilen Mavisi ve Alüminyum Fitalosiyanın Tetrasülfonat Aracılı Fotodinamik Tedavinin Etkinliğinin İncelenmesi. 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi 2017, İstanbul (Poster).
2. **Bakay İlhan D, Girit Bozkurt Ö, Kılıç MA, Köken EC, Aksel M, Bilgin MD.** Elektromanyetik Alanın Sağlık Üzerine Etkileri Hakkında Adnan Menderes Üniversitesi Öğrencilerinin Farkındalıkları. 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi 2017, İstanbul (Poster).

3. **Büyükgüngör O, Aksel M, Kürkçüoğlu GS, Yeşilel OZ.** Bir boyutlu heteropolinükleer tetraşyanopaladat II komplekslerinin sentezi ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi. Adım Fizik Günleri V 2016, Eskişehir (Poster).
4. **Aksel M, Köken EC, Bozkurt Ö, Bilgin MD.** İnsan Kolon Kanseri Hücre Dizinlerinde Metilen Mavisi Aracılı Sonodinamik Terapinin Etkinliği. 27. Ulusal Biyofizik Kongresi 2015, Malatya (Poster).
5. **Oktay S, Bozkurt Ö, Aksel M, Bilgin MD.** Deneysel Diyabetik Nöropatide 20 s Ginsenozit RG3 Tedavisinin Olası Nöroprotektif Etkileri. 27. Ulusal Biyofizik Kongresi 2015, Malatya (Poster).
6. **Oktay S, Bozkurt Ö, Aksel M, Bilgin MD.** Diyabetik Nöropatide 20S Ginsenozid RG3 ün Nöroprotektif Etkileri. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi 2015, Konya (Poster).
7. **Aksel M, Köken EC, Bozkurt Ö, Bilgin MD.** Borik Asidin Biyolojik Ortamlarla Etkileşimi ve HL-60 İnsan Promiyelositik Lösemi Hücrelerindeki Apoptotik ve Antikanserijen Etkisi. 26. Ulusal Biyofizik Kongresi 2014, Tokat (Poster).
8. **Aksel M, Köken EC, Başoğlu H, Bozkurt Ö, Bilgin MD.** ADÜ Merkez Kampüsünde İyonize Olmayan Radyasyon Ölçüm Değerleri ve İyonize Olmayan Radyasyon Maruziyetine İlişkin Öğrencilerin Bilgi Düzeylerinin Ölçülmesi. 25. Ulusal Biyofizik Kongresi 2013, Trabzon (Poster).
9. **Aksel M, Kürkçüoğlu GS.** Siyano Köprülü Komplekslerin Sentezi Titreşim Spektroskopik ve Termal Özelliklerinin İncelenmesi $M_4MePy_2NiCN_4$ M Ni veya Zn VE $M_4MePy_3NH_3NiCN_4$ M Cu veya Cd . Uluslararası Katılımlı XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi 2011, Antalya (Poster).
10. **Aksel M, Kürkçüoğlu GS.** Bazı Hofmann Tipi Tetraşyanonikelat Komplekslerinin Sentezi Titreşim Spektroskopik ve Termal Özelliklerinin İncelenmesi $M_4Etpy_2NiCN_4$ M Ni Cu Zn veya Cd $4Etpy_4Etilpiridin$. Uluslararası Katılımlı XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi 2011, Antalya (Poster).
11. **Aksel M, Kavlak İ, Kürkçüoğlu GS.** A theoretical and experimental investigation of vibrational spectra and electronic transitions on 3 methyl diphenylamine molecule as organic semiconductor. 2. Ulusal Güneş ve Hidrojen Enerjisi Kongresi, 2008, Eskişehir (Sözlü Sunum).