

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LNCaP HÜCRELERİNDE MAKROFAJ KAYNAKLI
ENFLAMATUAR ÇEVRESEL STRESLE İNDÜKLENEN ENTEGRE
STRES YANITININ TÜMÖR PROGRESYONU VE ANTIANDROJEN
TERAPÖTİK YANITLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatih HUNÇ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Biyokimya Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2022

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LNCaP HÜCRELERİNDE MAKROFAJ KAYNAKLI
ENFLAMATUAR ÇEVRESEL STRESLE İNDÜKLENEN ENTEGRE
STRES YANITININ TÜMÖR PROGRESYONU VE ANTIANDROJEN
TERAPÖTİK YANITLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatih HUNÇ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Biyokimya Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Meltem Özlen Dillioğlugil
Dr. Öğr. Üyesi Kerem Teke

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No:
2021/2540) Tarafından Desteklenmiştir

KOCAELİ
2022

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: LNCaP Hücrelerinde Makrofaj Kaynaklı Enflamatuvar Çevresel Stresle İndüklenen Entegre Stres Yanıtının Tümör Progresyonu ve Antiandrojen Terapötik Yanıtları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Tez Yazarı: Fatih HUNÇ

Tez Savunma Tarihi: 23.06.2021

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meltem Özlen DİLLİOĞLUGİL-Dr. Öğr. Üyesi Kerem TEKE

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURUL ÜYELERİ		
ÜNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN (ÜYE)	Prof. Dr. Ümit Dilber MUTLU	
DANIŞMAN	Prof. Dr. Meltem Özlen DİLLİOĞLUGİL	
DANIŞMAN	Dr. Öğr. Üyesi Kerem TEKE	
ÜYE	Prof. Dr. Erdinç DEVRİM	
ÜYE	Doç. Dr. Gökhan DURUKSU	
ÜYE	Doç. Dr. Fatma Ceyla ERALDEMİR	
ÜYE	Doç. Dr. Önder KARA	

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20...

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

LNCaP Hücrelerinde Makrofaj Kaynaklı Enflamatuar Çevresel Stresle İndüklenen Entegre Stres Yanıtının Tümör Progresyonu ve Antiandrojen Terapötik Yanıtları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Bu tez çalışmasında, M1 polarize tümör ilişkili makrofaj (TAM) kaynaklı enflamatuar tümör mikroçevresinin (TM) LNCaP hücrelerinde tetiklediği endoplazmik retikulum (ER) stresi, katlanmamış protein yanıtı (KPY) ve selüler entegre stres yanıtının, hormon duyarlı prostat kanserinde (PK) antiandrojen (apalutamid) terapötik etkinliği, tümörögenез ve kanser progresyonu üzerine olan etkileri araştırılmaktadır.

Yöntem: Öncelikle, U937 monosit hücreleri iki aşamalı kimyasal indüksiyonla M1 polarize TAM'lara farklılaştırıldı. M1 polarize TAM'lardan kaynaklanan enflamatuar TM'nin *in vitro* modellenmesi, U937 hücrelerinin PMA uyarısıyla nonpolarize M0 makrofajlara farklılaştırılmaları ve akabinde Th1 sitokinler aracılığıyla M1 polarize TAMs farklılaşmasının uyarımı neticesinde elde edilen makrofaj hücre kültür ortamının, koşulu besiyeri (KB, kondisyonlanmış ortamın) olarak hazırlanması ve ilgili deney gruplarında kültür ortamı olarak 24 saat süresince uygulanması ile gerçekleştirildi. PK tümör biyolojisine ilişkin deneyler, hormon duyarlı metastatik prostat adenom hücresi olan LNCaP hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. KB'nin metabolik karakterizasyonu, sitokin profillerinin ELİSA yönteminde, nitrojen oksitler ve hidrojen peroksit düzeylerinin ise kolorimetrik biyokimyasal analizlerden elde edilen verilerle desteklenmesiyle gerçekleştirildi. Tümör hücresi entegre stres yanıtları, tümörögenез, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), köklülük, anjiojenez ve intraselüler redoks dengesine ilişkin gen ifadelerinin analizleri qRT-PCR ile, oksidatif hasar ve antioksidan savunma mekanizmalarına ilişkin biyokimyasal belirteçlerin tayini kolorimetrik deneylerle, oksidatif DNA hasarı ve hasar tamir yanıtı ve apoptotik aktivitedeki değişim, sırasıyla western blot, immünfloresan kaspaz-3 aktivite deneyi ve qRT-PCR'da gen ifade analizleri ile, hücre canlılık, proliferasyon ve sitotoksosite düzeyleri WST-1 ve LDH deneyleri ile belirlendi.

Bulgular: M1 polarize TAMs'dan kaynaklanan enflamatuar çevresel stresin LNCaP hücre canlılıklarında artma, selüler sitotoksitede azalma ile proliferasyonda artışa neden olduğu bulundu. Ayrıca tümör hücre sağkalımında ve karsinogenezin desteklenmesinde rol oynayan KPY, entegre stres yanıtı ile antioksidan savunma mekanizmalarının dahil

olduğu selüler sinyal yollarının enflamatuar stresin modellediği deney grubunda en yüksek düzeyde aktive olduğu, diğer taraftan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif DNA hasarı ve DNA hasar tamir yanıtlarında artış ile kaspaz-3 aracılı apoptozisin de indüklenmiş olduğu gösterildi. Moleküler analizlerden elde edilen deneysel veriler, enflamatuar çevresel stresin aracılık ettiği selüler değişimlerin, apalutamidin hormon duyarlı PK hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkinliğinin yitirilmesine neden olduğunu göstermektedir. Buna karşın, apalutamidin LNCaP tümör biyolojisinde adaptif selüler sinyal yollarında meydana gelen AR sinyalinin uyarılması, anjiyogenez, EMT, tümör köklülüğü ve karsinogenezin indüksiyonunu içeren enflamatuar stresin aracılık ettiği tümör progresyonuyla ilişkili olan değişiklikler üzerindeki baskılayıcı etkiler sergilemeye devam ettiği gösterildi.

Sonuç: Enflamatuar çevresel stres uyarısının tümör biyolojisinde meydana getirdiği etkilerin kanser progresyonunda ve tedavi direncindeki önemine işaret eden araştırma bulguları, prelinik ve klinik araştırmalarla desteklenen mevcut literatürle uyum göstermektedir. Hormon duyarlı PK'de enflamatuar TM, tümör progresyonu ve antiandrojen ilaç direnci gelişiminde önemli rol oynamaktadır. M1 polarize TAM kaynaklı enflamatuar çevresel stresin in vitro modellendiği bu çalışmada, LNCaP hücrelerinde enflamatuar stresle indüklenen KPY ve selüler adaptif entegre stres yanıtı ile karsinojenik sinyal yollarının aktivasyonu, tümör hücre sağkalımı ve agresif tümör karakteri gelişimini desteklemektedir. Enflamatuar stres, LNCaP hücrelerinde invazyon, migrasyon ve metastatik potansiyeliyle ilişkili EMT ve tümör hücre köklülüğünü uyarmakta, anjiyogenez ile antioksidan savunma mekanizmalarını aktive ederek hücre kurtuluşunu sağlamaktadır. Nihai olarak, selüler ve nonselüler bileşenleriyle kompleks ve dinamik bir yapı olan TM'nin terapötik yaklaşımlar açısından önemine ilişkin vurgusuyla bu tez çalışmasının translasyonel tıp alanına katkı sunacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, androjen reseptör sinyalizasyonu, enflamasyon, tümör mikroçevresi, M1 polarize tümör ilişkili makrofaj, oksidan stres, endoplazmik retikulum stresi, katlanmamış protein yanıtı, entegre stres yanıtı, antiandrojen, apalutamid, ilaç direnci.

ABSTRACT

Investigation of The Effects of M1 Polarized Macrophages-Mediated Inflammatory Environmental Stress Induced Integrated Stress Response on Tumor Progression and Antiandrogen Therapeutic Efficacy in LNCaP Cells

Objective: This thesis study explores the effects of endoplasmic reticulum (ER) stress, unfolded protein response (UPR), and cellular integrated stress response in LNCaP cells, which are triggered by the inflammatory tumor microenvironment, composed of M1 polarized tumor-associated macrophage (TAM), on the antiandrogen therapeutic efficacy, tumorigenesis and cancer progression in hormone-sensitive prostate cancer.

Method: Primarily, U937 monocytic cells were differentiated into M1 polarized TAMs using with two-step chemical induction protocol, which included macrophage differentiation and polarization processes. In the first step, U937 cells were treated with PMA in order to differentiate promonocytic cells into the M0 nonpolarized mature macrophages. In the second step of the protocol, M0 macrophages were treated with Th1 cytokines to obtain M1 polarized macrophages differentiation. Afterward, M1 polarized macrophages culture media was collected and brought into cell free supernatant, that termed as conditioned medium (CM), in order to establish in vitro inflammatory tumor microenvironment model. Thereafter, metabolic characterization of CM was carried out with determination of its content, that composed of miscellaneous bioactive substances e.g. cytokines, chemokines, nitrogen oxides, hydrogen peroxide molecules. For that purpose, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were analyzed using with ELISA kits, while nitrogen oxides and hydrogen peroxide levels were determined by using colorimetric analysis. LNCaP cell line was used in carrying out the research on hormone-sensitive metastatic prostate adenocarcinoma cells. Concisely, M1 polarized TAMs mediated in vitro inflammatory TM model was conducted using with CM for 24 hour, as LNCaP cell culture medium in inflammatory stress groups. Changes in integrated stress response, carcinogenesis, epithelial mesenchymal transition (EMT), stemness, angiogenesis, and intracellular redox balance and activation of UPR due to perturbation of ER homeostasis were evaluated with qRT-PCR analysis of related genes expression levels in LNCaP cells. Moreover, biochemical markers of oxidative cell damage and antioxidant defense mechanisms were determined by colorimetric analysis. DNA damage repair response and

apoptotic activity were determined by western blot, immunofluorescent caspase-3 activity assay, and gene expression analysis with qRT-PCR; cell viability, proliferation and cytotoxicity levels were determined by WST-1 and LDH activity assays, respectively.

Results: The data obtained from this study shown that inflammatory environmental stress stimulus, which originated from M1 polarized TAMs, increased LNCaP cell viability and proliferation, besides decreased cellular cytotoxicity. Furthermore, UPR, integrated stress response and antioxidant defense mechanisms with concomitant cellular signaling pathways, which play a salient role in tumor cell survival and support carcinogenesis, were found to be activated at the highest level in experimental group modeling of inflammatory stress. On the other hand, reactive oxygen species mediated oxidative DNA damage and DNA damage repair responses were found to be increased, compatible with the data which demonstrated activation of caspase-3-mediated apoptosis. Experimental data obtained from molecular analysis shows that inflammatory environmental stress mediated cellular alterations caused loss of anti-proliferative and cytotoxic effects of apalutamide on hormone-sensitive prostate cancer cells. Notwithstanding the finding, apalutamide remained to exhibit suppressive effects on the adaptive cellular signaling pathways regarding inflammatory stress mediated changes which comprised of stimulation of AR signaling, induction of angiogenesis, EMT, stemness, and carcinogenesis in LNCaP tumor biology, which associated with tumor progression.

Conclusions: Research findings pointing to the salient role of inflammatory environmental stress stimulus in cancer progression and therapy resistance on account of its effects on tumor biology, are in line with the existing literature supported by preclinical and clinical studies. In hormone-sensitive prostate cancer, inflammatory tumor microenvironment plays a significant role in tumor progression and acquisition of antiandrogen drug resistance. In this study, in which M1 polarized TAMs mediated inflammatory environmental stress was modelled *in vitro*, activation of carcinogenic signaling pathways by inflammatory stress-induced UPR and adaptive cellular integrated stress response in LNCaP tumor cells supports tumor cell survival and formation of aggressive tumor characteristics. Inflammatory stress activates tumorigenesis, angiogenesis, and antioxidant defense mechanisms and also stimulates stemness and EMT which is associated with invasion, migration, and metastatic potential in LNCaP cells, thus increase cell survival and rescue tumor cells from apoptosis. Ultimately, it is thought that this study would contribute to the field of translational medicine with its emphasis on the importance of TM, which is a

complex and dynamic structure with its cellular and noncellular components, in terms of therapeutic approaches.

Keywords: Prostate cancer, androgen receptor signaling, inflammation, tumor microenvironment, tumor-associated macrophage, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, integrated stress response, antiandrogen, apalutamide, drug resistance.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilimsel yaklaşım ve akademik hayattaki tecrübelerinden yararlandığım ve birçok konuda kendisini örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Meltem Özlen DİLLİOĞLUGİL'e çalışmanın planlanmasından sunulmasına kadar geçen süreçteki yol göstericiliği, motive edici yaklaşımı ve sonsuz desteği için teşekkür ederim. Tez eş danışmanım olan Dr. Öğretim Üyesi Kerem TEKE ve Tez İzleme Komitesi'ndeki değerli hocalarım Doç. Dr. Gökhan DURUKSU ve Doç. Dr. Önder KARA'ya kıymetli destekleri ve paylaştıkları deneyimlerinden ötürü teşekkürü borç bilirim. Bana tüm deney aşamalarında laboratuvarının tüm olanaklarıyla kullanabilme imkanını sağlayan KÖGEM müdürü değerli hocam Prof. Dr. Yusufhan Yazır'a ayrıca teşekkür ederim. Çalışmada kullandığım hücre hatları ve ihtiyaç duyduğum kimyasal sarfların temininde gösterdikleri yardımseverlik, sonsuz hoşgörü ve destek için Prof. Dr. Suat ERDOĞAN, Prof. Dr. Devrim ARSLAN, Prof. Dr. Uğur GEZER, Prof. Esmâ TÜTEM, Dr. Öğr. Üyesi Asuman DEVECİ'ye şükranlarımı sunarım. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşım Dr. Özgür Doğa ÖZSOY'a doktora eğitimim süresince sergiledikleri destekleyici tavır ve vermiş oldukları değerli katkılar çok teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince yardım, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Doç. Dr. Gökhan DURUKSU'ya hasleten teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmalarının bir bölümünü gerçekleştirdiğim Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvar sorumlusu ve Tıbbi Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Hale MARAL KIR hocama ve Hastanemiz Merkez Laboratuvarı çalışanların tümüne gösterdikleri hoşgörülerini ve yardımseverlik için teşekkür ederim. Tıbbi Biyokimya AD'da doktora eğitimim süresince beraber çalıştığım Dr. Özgür Doğa ÖZSOY ve Dr. Esra ACAR ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmanın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destekler (Proje No: 2021/2540) için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. Son olarak tüm yaşamımda sağladıkları sevgi ortamı, karşılıksız özveri, fedakârlık ve hoşgörü ile bugünlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini hep arkamda hissettiğim tüm aileme teşekkürü borç bilirim.

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “LNCaP Hücrelerinde Makrofaj Kaynaklı Enflamatuvar Çevresel Stresle İndüklenen Entegre Stres Yanıtının Tümör Progresyonu ve Antiandrojen Terapötik Yanıtları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir / hipotezi tümüyle bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar Turnitin intihal programı kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

..... /..... /.....

Fatih HUNÇ

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	ix
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	x
İÇİNDEKİLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
ŞEKİLLER	xxi
TABLolar	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1. Prostat Kanseri	1
1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	1
1.3. Sınıflama ve Evreleme Sistemleri	4
1.4. Prostat Bezi Anatomi, Embriyoloji ve Histolojisi	8
1.5. Prostat Kanserinde Tanı	11
1.5.1. Prostat Spesifik Antijen	11
1.5.2. Yeni Biyobelirteçler	17
1.5.3. Evrelemede Kullanılan Görüntüleme Testleri	21
1.6. Prostat Kanserinin Moleküler Patogenezi	21
1.7. Androjen Reseptör Biyokimyası ve Fonksiyonu	22
1.8. Adrenal ve Testiküler Steroidojenez ve Androjen Hormonları	25
1.9. Prostat Kanseri Tedavisinde Hormonal Terapi Yaklaşımları	27
1.9.1. Testosteron Düşürücü Terapiler (Kastrasyon)	27
1.9.2. Antiandrogenler	29
1.9.3. Apalutamid (ARN-509)	29
1.9.4. Androjen Reseptör Sinyalizasyonu ve Oksidatif Stres	30
1.9.5. Anti-Hormon Terapi Direnci	31
1.9.6. Metastatik KDPK’de Birinci Basamak Kemoterapi Yaklaşımları	38
1.10. Tümör Mikroçevresi	39
1.11.1. Enflamatuar Tümör Mikroçevresi ve Prostat Kanseri	40
1.11.2. Tümör İlişkili Makrofajlar (Tumor associated macrophages, TAMs)	42
1.11.3. M1 ve M2 Polarize Tümör İlişkili Makrofajlar	43

1.11.	Prostat Kanseri ve Oksidatif Stres.....	44
1.11.1.	Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller.....	48
1.11.2.	Oksidatif Hücre Hasarı	50
1.12.	Endoplazmik Retikulum.....	50
1.12.1.	Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Yanıtı	52
1.12.2.	Isı Şok Proteinleri, Proteotoksisite ve Proteostazis	54
1.12.3.	Endoplazmik Retikulum Stresi ve Oksidatif Stres	57
1.13.	Entegre Stres Yanıtı	60
1.14.	Prostat Kanserinde Agresif Tümör Karakter Özellikleri.....	62
1.15.	Apoptozis ve Hücre Ölümü	62
2.	AMAÇ.....	65
3.	YÖNTEM.....	67
3.1.	Hücre Kültürü.....	67
3.1.1.	Hücrelerin Çözdürülmesi.....	71
3.1.2.	Hücre Pasajı	72
3.1.3.	Hücrelerin Dondurulması	73
3.1.4.	İlaçların Hazırlanması.....	73
3.1.5.	Makrofaj Hücre Farklılaşması	74
3.1.6.	Koşullu Besiyerinin Eldesi	81
3.1.7.	Koşullu Besiyerinin Aktif Substans İçeriğinin Belirlenmesi.....	81
3.1.8.	FBS'nin Steroidden Arındırılması.....	82
3.1.9.	LNCaP Hücrelerinin Hormondan Arındırılması	82
3.1.10.	LNCaP Hücrelerinde AR Sinyalizasyonun DHT ile Uyarılması	83
3.1.11.	Koşullu Besiyerinin LNCaP Hücre Kültür Ortamı Olarak Kullanılması: Prostat Kanseri İn vitro Enflamatuvar Tümör Mikroçevresi Modelinin Oluşturulması	83
3.1.12.	LNCaP Hücrelerine Antiandrojen Apalutamid İlacının Uygulanması.....	83
3.2.	Hücre Lizatının Hazırlanması ve Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizler	83
3.2.1.	Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçüm Yöntemi	84
3.2.2.	Hidrojen Peroksit Konsantrasyonun Ölçümü	87
3.2.3.	Nitrik Oksit (NO) Ölçüm Yöntemi.....	89
3.2.4.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	93
3.2.5.	Katalaz (KAT) Aktivitesi Tayini	95
3.2.6.	Redükte Glutatyon (GSH) Tayini	96
3.2.7.	Antioksidan Kapasite (Ferrik Demir İndirgenme Deneyi, FRAP) Tayini.....	99

3.2.8. İleri Protein Oksidasyon Ürünlerinin Tayini (Advanced Oxidation Protein Products; AOPP).....	101
3.2.9. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi tayini	102
3.2.10. Protein Konsantrasyonu Ölçüm Yöntemi (Bikinkonik Asit Yöntemi).....	105
3.2.11. Sitokin düzeylerinin ELİSA ile belirlenmesi.....	106
3.2.12. Prostat Spesifik Antijen (PSA) Protein Düzeylerinin Elektrokemilüminesans İmmün Ölçüm ile Belirlenmesi.....	106
3.2.13. LNCaP Hücrelerinde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Düzeylerinin Akım Sitometride DCFDA Deneyiyle Belirlenmesi.....	107
3.3. qRT-PCR ile Gen İfade Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi	108
3.3.1. Gen Primerlerinin Tasarımı	108
3.3.2. RNA İzolasyonu	109
3.4. İmmünfloresans Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini	111
3.5. Western Blot Deneyi	111
3.6. Hücre Canlılık, Proliferasyon ve Sitotoksite Analizleri	114
3.6.1. WST-1 (Water-soluble tetrazolium) Analizi	114
3.6.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	115
3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi	116
4. BULGULAR.....	117
4.1. Koşullu Besiyeri İçeriğindeki Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi.....	117
4.2. Dekstran 70 ile Kaplanmış Aktif Kömürle Muamele Edilen Fetal Sığır Serumunun Steroid Hormon, Lipid ve Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	118
4.3. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Oksidatif Hücre Hasarı ve Antioksidan Savunma Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	119
4.4. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Androjen Reseptör Sinyal Yolağı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	121
4.5. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi ve GSH-px1 Gen İfade Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	122
4.6. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin LNCaP Hücrelerinde Protein Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	123
4.7. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin İntraselüler Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	124
4.8. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Kaspaz-3 Aktivitesi ve Kaspaz Bağımlı İntrensek Apoptozisin Aktivasyonu Üzerine Olan Etkilerin Belirlenmesi.....	125

4.9.	Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Oksidatif DNA Hasarı ve Tamir Yanıtı Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	127
4.10.	Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	128
4.11.	Enflamatuar Stres ve Apalutamidin ER Stresi ile Selüler Entegre Stres Yanıtları Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	130
4.12.	Enflamatuar Stres ve Apalutamidin EMT'ye Olan Etkilerinin Belirlenmesi .	132
4.13.	Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Tümör Köklülük Karakteri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi.....	132
4.14.	Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Karsinogenez ve Anjiojenez Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	134
4.15.	Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Karsinogenez ve Anjiojenez Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	135
5.	TARTIŞMA	137
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	163
7.	KAYNAKLAR	165
8.	ÖZGEÇMİŞ	200

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrad derece
ADMA	Asimetrik dimetil arginin
ADT	Androgen deprivation therapy, androjen deprivasyon terapisi
AKT	Protein kinase B
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
AVPCs	Aggressive variant prostate cancers
BiP	Binding immunoglobulin protein
BPH	Benign prostat hiperplazisi
BRCA2	Breast cancer gene 2
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
Cd	Kadmiyum
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CHOP	C/EBP-homologous protein
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
CM	Conditioned medium,
cm	Santimetre
c-MYC	Cellular myelocytomatosis oncogene product
CS-FBS	Charcoal-stripped fetal bovine serum
Cu	Bakır
CuSO ₄	Bakır (II) sülfat
CuZn-SOD	Bakır çinko süperoksit dismutaz
d	Dansite, yoğunluk
DBD	DNA binding domain; hormon (steroid) reseptörü DNA bağlanma bölgesi

DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate
Δ	Delta
ΔOD	Delta optical density; Absorbans farkı
DHT	Dihydrotestosterone; dihidrotestosteron
dk	Dakika
dL	Desilitre
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EC50	Half maximal effective concentration
EC-SOD	Ekstraselüler süperoksit dismutaz
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
eIF2 α	Eukaryotic initiation factor 2-alpha
EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
EIF2AK2	Eukaryotic initiation factor 2-alpha kinase 2 “gene
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
ER	Endoplasmic reticulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum, fetal sığır serumu
FDA	U.S Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
Fe ²⁺	Ferröz demir
Fe ³⁺	Ferrik demir
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPO	Glutasyon peroksidaz
GPX1	Glutathione peroxidase 1

GRP78	Glucose-regulated protein 78kDalton
GS	Gleason skoru
GSH	Redükte glutatyon
GSSH	Okside glutatyon
H2O2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HMOX 1	Heme oxygenase 1
HRR	Homolog recombinant repair; homolog rekombinant tamir
HRPC	Hormone-refractory/resistant prostate cancer
HSPA5	Heat shock protein family a (hsp70) member 5
IARC	Uluslararası kanser araştırma ajansı
IC50	Half maximal inhibitory concentration
IMPACT	Identification of Men with a Genetic Predisposition to ProstAte Cancer, Erkeklerde prostat kanserine genetik olarak yatkınlığı belirleme çalışması
ISUP	International Society of Urological Pathology; Uluslararası Üropatoloji Cemiyeti
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
JAK	Janus kinase
JNK	Jun amino-terminal kinase
KB	Koşullu besiyeri
KLK3	Kallikrein-Related Peptidase 3
L	Litre
LBD	Ligand binding domain; reseptör ligand bağlama bölgesi
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKs	Mitojeni aktive eden protein kinazları

mCRPC	Metastatic castration-resistant prostate cancer
MDA	Malondialdehit
MMR	Mismatch repair; DNA yanlış eşleşme tamirinden sorumlu genler
mHNPC	Metastatic hormone naïve prostate cancer
mHSPC	Metastatic hormone sensitive prostate cancer
mg	Miligram
mIU	Mili-internasyonal ünite
ml	Mililitre
mM	Mmolar
mmol	Mmol
Mn-SOD	Mangan süperoksit dismutaz
MPO	Myeloperoksidaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
mTOR	Mechanistic (mammalian) target of rapamycin
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
MPO	Myeloperoksidaz
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
Na ₂ MoO ₄	Sodyum molibdat
Na ₂ WO ₄	Sodyum tungstat
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NaOH	Sodyum hidroksit
NBT	Nitroblue tetrazolium
NF-κB	Nuclear factor kappa β (nuclear factor kappa light chain enhancer of

	activated B cells)
NICE	National Institute of Health and Clinical Excellence; İngiltere Sağlık ve Klinik Mükemmellik Enstitüsü
NO	Nitrik oksit
NO ₂	Nitrojen dioksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
nmCRPC	Non-metastatic castrate-resistant prostate cancer
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NEPCs	Neuroendocrine prostate cancers
NTD	Steroid hormon reseptörü N terminal domain
O ₂ -	Süperoksit
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PCa	Prostate cancer
PERK	Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
pGL3-Basic	Vector lacks eukaryotic promoter and enhancer sequences
PKG	Protein kinase G
PKR	Protein kinase RNA-activated
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP1	Protein phosphatase 1
PSA	Prostat spesifik antijen
fPSA	Serum serbest PSA
tPSA	Serum total PSA
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Protein disulfide isomerase
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
R.	Karbon merkezli radikal

RO ⁻	Alkoksil radikali
ROO ⁻	Peroksil radikali
R1881	Methyltrienolone, metribolone
RCF	Relative centrifugal force
RNS	Reactive nitrogen species
RNT	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reactive oxygen species
ROT	Reaktif oksijen türleri
RPM	Revolutions per minute
RPMI 1640	Roswell Park memorial institute 1640 medium
sGC	soluble Guanylate cyclase
SIRT6	Sirtuin 6
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAEC	Troloks eşdeğer antioksidan kapasite
TAM	Tumor associated macrophage; tümör ilişkili makrofaj hücresi
TBARS	Tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren maddeler
TM	Tumor microenvironment, tümör mikroçevresi
TCA	Triklor asetik asit
TRUS	Transrektal Ultrasonografi
U	Ünite
UPR	Unfolded protein response
USPSTF	The United States Preventive Services Task Force; ABD Önleyici Hizmetler Görev Gücü
v/v	Volume/volume; Hacim/hacim
w/v	Weight/volume; Ağırlık/hacim
WB	Western blotting
X.	Radikal

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. ABD’de erkek cinsiyette insidansı ve mortalite hızı en yüksek 10 kanser türünün 2020 yılı için tahmini istatistikleri.	1
Şekil 1.2. ABD’de 1975-2016 yılları arasında erkek cinsiyette en sık görülen 10 kanser türünün yıllık insidans hızındaki değişim trendlerinin gösterimi.	2
Şekil 1.3. Gleason skorlama sisteminde sitolojik değerlendirme ve puanlamanın şematik diyagramı.	7
Şekil 1.4. İnsan prostat dokusunun zonal anatomisinin şematik gösterimi.	10
Şekil 1.5. İnsan prostat bezi asinus ve duktus yapılarının şematik gösterimi.	11
Şekil 1.6. Prostat kanser olgularında tanı anındaki hastalık evresi ve PK tanısı alan olgunun siyah veya beyaz ırktan olmasına göre 5 yıllık relatif sağkalım hızları.	19
Şekil 1.7. Prostat kanser olgularında tanı anındaki hastalık evresi yüzde dağılımı.	20
Şekil 1.8. ABD’de erkek cinsiyette önde gelen kanser türlerinden 7’sinin 9 dekadlık dönemi kapsayan mortalite hızlarındaki değişim trendi.	20
Şekil 1.9. Kanonik ve nongenomik (ankonvansiyonel) androjen reseptör sinyalizasyonun entegrasyonu.	25
Şekil 1.10. Adrenal korteks hormonları ve sentezlerinin şematik gösterimi.	26
Şekil 1.11. Hormon terapide kullanılan ajanların etki mekanizmalarının şematik gösterimi.	29
Şekil 1.12. Androjen reseptörü ligand bağlayıcı bölgesini (LBD) hedefleyerek AR sinyal yolağının inhibe eden farklı antiandrojen ajanlarının etki mekanizmalarının şematik gösterimi.	33
Şekil 1.13. Kanonik androjen reseptör sinyal yolağı ve N-terminal bölgesinin terapötik hedef bölgeleri.	36
Şekil 1.14. Androjen reseptörü N-terminal bölgesini (n-terminal domain (NTD)) hedefleyerek AR sinyal yolağının interfere eden ajanlarının etki mekanizmalarının şematik gösterimi.	37
Şekil 1.15. Enflamasyonla uyarılan NF- κ B ve STAT-3 sinyal yolaklarının şematik gösterimi.	42
Şekil 1.16. Tümör ilişkili makrofajların tümör biyolojisine etkilerinin şematik gösterimi.	44

Şekil 1.17. Hücre hasarı, adaptasyon, hücre sağkalımı ve apoptozis süreçlerinin şematik gösterimi.	47
Şekil 1.18. A) Prostat kanserinde oksidatif stres ile aktive olan sinyal yollarının şematik gösterimi. B) Androjen deprivasyon tedavisi, oksidatif stres, AR sinyalizasyonu ve KDPK gelişimi arasındaki ilişkinin şematik gösterimi.	47
Şekil 1.19. Reaktif oksijen türleri (ROT/RNT) ve sserbest radikaller.....	49
Şekil 1.20. ER stresin uyarılması ve katlanmamış protein yanıtının aktivasyonunun şematik gösterimi.....	51
Şekil 1.21. Endoplazmik retikulum (ER) stresi ve katlanmamış protein yanıtı (KPY) sinyal yolağının şematik gösterimi.	54
Şekil 1.22. Enflamasyon ve oksidatif stresle indüklenen ER stres ve apoptotik hücre yanıtı	58
Şekil 1.23. Enflamasyon ve oksidatif stresle indüklenen ER stres ve apoptotik hücre yanıtı	59
Şekil 1.24. Kaspaz aracılı apoptozisin şematik gösterimi.	64
Şekil 3.1. Çalışma deney grupları ve araştırmanın şematik gösterimi.	68
Şekil 3.2. İn vitro enflamatuvar tümör mikroçevresi modelinin oluşturulmasının şematik gösterimi.....	68
Şekil 3.3. İlaçların uygulama dozlarının hesaplanması.	74
Şekil 3.4. Normal hücre kültür ortamında 24 saat boyunca yetiştirilen pasaj 8 U937 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.	75
Şekil 3.5. Normal hücre kültür ortamında 24 saat boyunca yetiştirilen pasaj 9 U937 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.	76
Şekil 3.6. M0 nonpolarize matür makrofaj hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri. ...	77
Şekil 3.7. LPS ve IFN- γ uygulaması ile M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyonun hemen sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri.....	78
Şekil 3.8. M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyon sonrası FBS içermeyen taze kültür ortamında 24 saat kültürü sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri	79
Şekil 3.9. M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyon sonrası FBS içermeyen taze kültür ortamında 48 saat kültürü sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri	80

Şekil 3.10. M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyon sonrası FBS içermeyen taze kültür ortamında 48 saat kültürü ve ikinci defa tazelenen kültür ortamında 48 saatlik kültürü sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri.....	81
Şekil 3.11. Malondialdehit ve 4-hidroksinonenal (HNE) poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır.....	85
Şekil 3.12. Malondialdehit kalibrasyon eğrisi ve denklemi.....	87
Şekil 3.13. Hidrojen peroksit kalibrasyon eğrisi ve denklemi.	89
Şekil 3.14. Nitrojen oksit (NOx) kalibrasyon eğrisi ve denklemi.....	92
Şekil 3.15. Glutasyon kalibrasyon eğrisi ve denklemi.	98
Şekil 3.16. FRAP deneyi kalibrasyon eğrisi ve denklemi	100
Şekil 3.17. İleri protein oksidasyon ürünleri (AOPPs) kalibrasyon eğrisi ve denklemi. .	102
Şekil 3.18. BCA yöntemiyle total protein tayini kalibrasyon eğrisi ve denklemi.	106
Şekil 3.19. Elektrokemilüminesans yöntemle PSA ölçümünün şematik gösterimi.....	107
Şekil 3.20. WST-1'in mitokondriyal dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyonla formazan bileşiğine indirgenmesi: WST-1 deney prensibinin şematik gösterimi.....	115
Şekil 4.1. CS-FBS, CT-FBS ve FBS'nin içerik analizi.	119
Şekil 4.2. Enflamatuvar stres ve apalutamidin oksidatif hücre hasarı ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisi.....	121
Şekil 4.3. Enflamatuvar stres ve apalutamidin androjen reseptör sinyalizasyonu üzerine etkisi.	122
Şekil 4.4. Enflamatuvar stres ve apalutamidin GSH-Px enzim aktivitesi ve Gpx1 gen ifade düzeyleri üzerine olan etkisi.....	123
Şekil 4.5. Enflamatuvar stres ve apalutamidin intraselüler protein düzeyleri üzerine olan etkisi.	124
Şekil 4.6. Enflamatuvar stres ve apalutamidin intraselüler ROT düzeyleri üzerine olan etkisi	125
Şekil 4.7. Aktif kaspaz-3 aktivitesi ve Bax1 gen ifade düzeyleri.	126
Şekil 4.8. Enflamatuvar stres ve apalutamidin oksidatif DNA hasarı ve tamir yanıtı düzeyleri üzerine olan etkisi.....	127
Şekil 4.9. Enflamatuvar stres ve apalutamidin hücre canlılık ve sitotoksosite düzeyleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi.	129
Şekil 4.10. Apalutamid uygulaması ile M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuvar stresin LNCaP hücrelerinde ER stresi ve katlanmamış protein yanıtları ile selüler entegre stres yanıtlarına etkisi.	131

Şekil 4.11. Apalutamid uygulaması ile M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuar stresin LNCaP hücrelerinde ER stresi ve katlanmamış protein yanıtları ile selüler entegre stres yanıtlarına etkisi.	132
Şekil 4.12. Enflamatuar stres ve apalutamidin tümör köklük karakteri üzerine etkilerinin belirlenmesi	134
Şekil 4.13. Enflamatuar stres ve apalutamidin c-myc ve VEGF-A gen ifade düzeyleri üzerine etkisinin belirlenmesi.....	134
Şekil 4.14. Enflamatuar stres ve apalutamidin tümör hücresi üzerine olan etkilerine yönelik gerçekleştirilen analizlerin bütününün ısı haritası gösterimi.	135



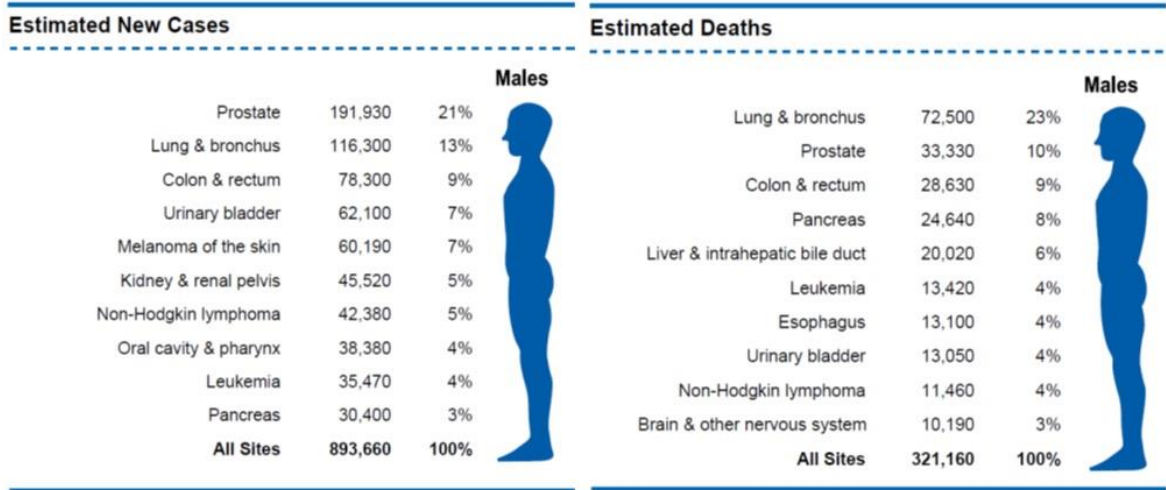
TABLÖLAR

Tablo 1.1. Prostat kanseri Tümör, Nod, Metastasis (TNM) evreleme sistemi 2017 kılavuzu.	5
Tablo 1.2. Lokalize ve lokal ileri prostat kanserinde biyokimyasal nüks için Avrupa Üroloji Birliği'nin tanımladığı risk grupları	7
Tablo 1.3. Uluslararası Üropatoloji Cemiyeti (International Society of Urological Pathology) 2014 derecelendirme sistemi.....	8
Tablo 1.4. Serum prostat spesifik antijen (PSA) konsantrasyonlarına göre PK riski.	8
Tablo 1.5. Serum total PSA düzeyleri için belirlenen yaşa bağlı referans aralıkları (Partin ve ark., 1996).....	15
Tablo 3.1. Çalışma deney grupları.	68
Tablo 3.2. Çalışmanın hücre kültürü deneyleri aşamasında kullanılan kimyasal maddeler, sarf malzemeler ve kitler.	69
Tablo 3.3. MDA ölçüm yöntemi protokolü.	86
Tablo 3.4. H ₂ O ₂ ölçüm yöntemi protokolü.	88
Tablo 3.5. Nitrojen oksit düzeylerinin analiz yöntemi protokolü.	92
Tablo 3.6. SOD enzim aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü.	94
Tablo 3.7. Katalaz enzim aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü.	95
Tablo 3.8. Redükte glutatyon düzeylerinin belirlenmesi deneyi 1. aşama protokolü.	97
Tablo 3.9. Redükte glutatyon düzeylerinin belirlenmesi deneyi 2. aşama protokolü.	98
Tablo 3.10. Total antioksidan durum (TAS) ölçüm yöntemi protokolü.	100
Tablo 3.11. İleri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPPs) ölçüm yöntemi protokolü.	102
Tablo 3.12. GSH-Px deneyi reaktif çözeltisi havuzunun oluşturulması.	104
Tablo 3.13. GSH-Px enzim aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü.....	104
Tablo 3.14. qPCR reaksiyonunda kullanılan karışım içeriği.	109
Tablo 3.15. qPCR analizinde sıcaklık, inkübasyon süre ve döngü sayıları.	109
Tablo 3.16. qRT-PCR ile ifade düzeyleri belirlenen genlerin analizde kullanılan forward ve reverse primer dizileri.....	110
Tablo 3.17. Western blot deneyinde kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları.	112
Tablo 3.18. SDS-Page yükleme ve ayırma jelinin hazırlanışı.	113
Tablo 4.1. Koşullu besiyeri içeriğindeki sitokin, NOx ve H ₂ O ₂ düzeyleri.	117
Tablo 4.2. CS-FBS, CT-FBS ve FBS bileşenleri.	118

1. GİRİŞ

1.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PK), dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen, erkek cinsiyette akciğer kanserinden sonra ikinci en sık kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin önemli sebeplerinden kompleks bir hastalıktır (Şekil 1.1 ve Şekil 1.2) (Kristal ve ark., 2014; Rebello ve ark., 2021). Eğer hastalık erken evrede (lokalize hastalık aşamasında) tanı alır ve tedavi edilirse 10 yıllık sağkalım %99 gibi yüz güldürücü bir oranda ve genel olarak düşük-orta rekürrens riski taşımaktadır.



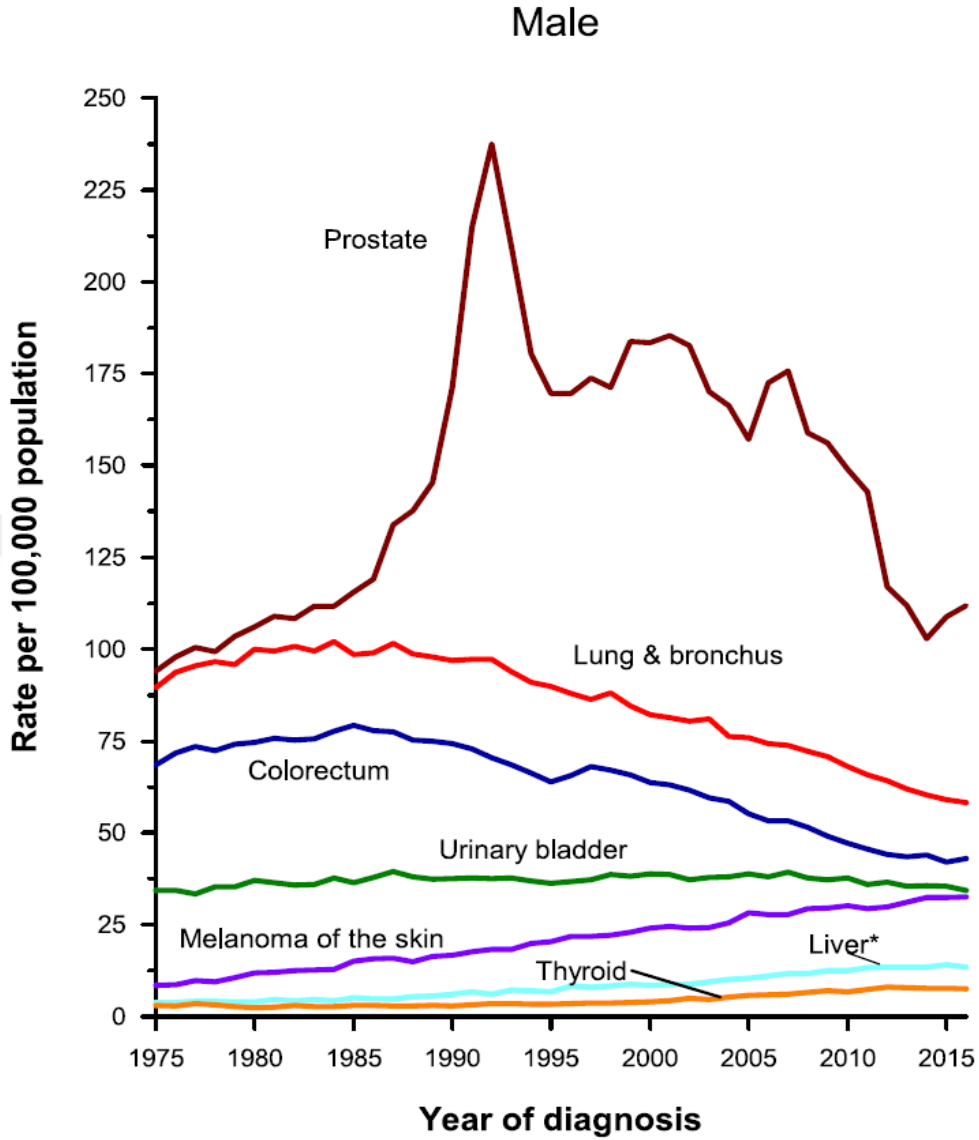
Prostat kanseri, ABD’de erkek cinsiyette insidansı en yüksek kanser türü olup, kanser ilişkili mortalite sebepleri içerisinde ise akciğer-bronş kanserinden sonra en sık ikinci kanser türüdür (Siegel ve ark., 2020).
Not: Veri tablosu in situ mesane kanseri, bazal ve skuamöz cilt kanserleri dışarda tutularak hazırlanmıştır.

Şekil 1.1. ABD’de erkek cinsiyette insidansı ve mortalite hızı en yüksek 10 kanser türünün 2020 yılı için tahmini istatistikleri.

1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

“Global Kanser İstatistikleri 2020” raporuna göre, 1 yıl içerisinde dünya genelinde ~1,5 milyon erkek PK tanısı almakta, ~400,000 kişi ise PK’ye bağlı nedenlerle yaşamını yitirmektedir (Siegel ve ark., 2020; Sung ve ark., 2021). Prostat kanseri, 50 yaşın üzerindeki erkeklerde yaygın olarak görülmekte, 65-75 yaş arasında zirve insidansa ulaşmaktadır. Otopsi serilerinde dünya genelinde benzer sıklıkta PK tespit edildiği bildirilmektedir. Otopsi serilerini içeren bir sistematik derlemede PK prevalansı <30 yaş

için %5 iken >79 yaş %59 olarak bildirilmektedir (Bell ve ark., 2015).



Prostat kanseri insidansındaki eksponansiyel artış ve azalış PSA tarama testinin 1986 yılında FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onayı sonrası klinik kullanıma girmesi ile tanı konan olgu sayısındaki artışla ilişkili iken, 1990'lı yılların hemen başlarında tepe insidans hızına ulaşan prostat kanseri sıklığındaki dramatik düşüş tarama testinin klinik pratikte rutin kullanımı öncesi dönemden semptomatik olmayan erken evredeki büyük nüfusun tanı alması sonrası yeni tanıların bazal seviyelere inmesi ile açıklanabilir. FDA 1994 yılında 50 yaş üstü erkeklerde serum PSA düzeyinin dijital rektal muayene (DRM) ile kombine edilerek PK tanı algoritmasında kullanımı onaylanmıştır (Siegel ve ark., 2020).

Şekil 1.2. ABD’de 1975-2016 yılları arasında erkek cinsiyette en sık görülen 10 kanser türünün yıllık insidans hızındaki değişim trendlerinin gösterimi.

Coğrafik olarak PK insidans hızları farklılık göstermektedir: Yeni Zelanda ve Avustralya en yüksek insidans hızına sahip iken, Kuzey Amerika, Batı ve Kuzey Avrupa şeklinde sıralanmaktadır. Ülkeler arasındaki farklılıkların bir bölümü PSA tarama testinin yaygın kullanılıp kullanılmamasına ve hastalığın tanı anındaki evresinin dağılım

paternlerine bağlanmaktadır. Doğu ve Güney Asya ülkeleri PK için en düşük insidans hızlarına sahip iken, Afrika kökenlilerde çok daha sık olarak gözlenmektedir. Etnisite özelinde siyah ırkta daha sık olan hastalık, Uzak Asya ırklarında (sarı ırk) ve Hispaniklerde daha seyrektr. Birinci dereceden aile bireylerinde prostat kanserinin bulunması önemli bir risk faktörleri olup, bir takım DNA tamir genleri için tanımlanmış germline (herediter) mutasyonların PK etiyolojisinde önemli olduğu bildirilmektedir (Giri ve ark., 2019). Agresif prostat kanseriyle ilişkili DNA tamir genlerini içeren germline mutasyonların başlıcaları: BRCA2 (breast cancer gene 2); ATM (ataxia telangiectasia mutated); CHEK2 (checkpoint kinase 2); BRCA1 (breast cancer gene 1); HOXB13 (homeobox B13); MMR (mismatch repair, mutasyonları Lynch sendromu ile ilişkili); MLH1 (mutL homolog 1); MSH2 (mutS homolog 2); MSH6 (mutS homolog 6); OR = odds ratio; PMS2 (post-meiotic segregation increased 2); mismatch tamir genlerinden MSH2 mutasyonunun PK riskini en belirgin arttıran herediter MMR mutasyonu olduğu bildirilmektedir (Mark ve ark., 2021; Rosty ve ark., 2014)

IMPACT (Identification of Men With a Genetic Predisposition to ProstAte Cancer) çalışmasının erken sonuçları nadir bir ailesel DNA yanlış eşleşme -eksizyon- tamirinden (DNA Mismatch Repair, DNA MMR) sorumlu MLH1, MSH2, MSH6 veya PMS2 genlerinin patojenik varyantlarıyla karakterize Lynch sendromunun predominant olarak kolorektal ve endometriyal kanserine yatkınlık oluşturduğu uzun yıllardır bilinmesiyle birlikte, Lynch sendromunun erkeklerde erken başlangıçlı agresif PK riskinin artmış olduğu ortaya konmuştur (Bancroft ve ark., 2021). IMPACT çalışması, germline DNA mismatch tamir varyant genler ile BRCA1/2 mutasyonlarını sahip erkeklerin erken PSA taraması ile takiplerini önermektedir. Ayrıca BRCA2 mutasyonu taşıyan erkeklerde PK insidansının arttığı, erken yaşta ileri evre PK tanısı aldıklarını gösterilmiştir (Elizabeth C. Page ve ark., 2019). BRCA2 geninde mutasyon taşıyan erkeklerin 40 yaşından itibaren PSa taraması ile takibe alınması güçlü şekilde önerilmektedir.

Eksojen veya çevresel faktörlerin, genetik faktörlere ek hastalık riskinde belirleyici olabildiği, ABD’de yaşayan Japonlarda PK sıklığının Japonya’dakilere oranlara daha fazla olduğu bilinmektedir. Özellikle diyetin PK etiyolojisinde önemli olduğu, metabolik sendrom, insülin direnci, obezite, doymuş yağlardan zengin diyetin riski arttırırken, metformin kullanımı, likopen, karoten, soya tüketiminin, azalmış riskle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, D vitamin düzeylerinin düşük ve yüksek olması artmış hastalık riskini beraberinde getirdiği bildirilmektedir (Kristal ve ark., 2014). Bunun dışında, hastalık gelişim süreçlerinde önem taşıdığı düşünülen risk faktörlerini 3 temel başlık

altında toplamak mümkündür:

Kronik enflamasyon: Üriner sistem enfeksiyonları (prostatitin neden olduğu epitelyal hasar ve hiperplazi mekanizması), barsak mikrobiyomu (mikrobiyomunun üretimini stimüle ettiği metabolitler ve androjenler prostat kanseri gelişimini potansiyel arttırıcılarından olduğu düşünülmekte),

Yüksek yağlı diyet: Doymuş yağ asitlerinden zengin diyetin ve obezitenin epigenetik mekanizmalar dolayısıyla onkojenik myc transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir, yüksek doymuş ve monosatüre yağlardan oluşan diyetle beslenmenin lipid homeostazisinin transkripsiyonel regülasyonunda rol oynayan pro-metastatik SREBP aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir,

Genetik faktörler: Poligenik multifaktöryel kalıtım paternine uygun şekilde, çevresel ve genetik hazırlayıcı faktörlerin bir bütün şeklinde, obezite ve diyet gibi birtakım değişkenlerin değiştirilebilir risk faktörü olarak etkili olduğu, AR aktivasyonu, kimyasal hasarla ilişkili doku hasarı ve prostatik enflamasyonun karsinogenezin başlangıç, gelişim ve progresyon süreçlerinde etkili olduğu bildirilmektedir (M. Chen ve ark., 2018).

1.3. Sınıflama ve Evreleme Sistemleri

Tümör sınıflama sistemleri hastaların objektif kriterler çerçevesinde benzer klinik çıktılar etrafında toplanmasını amaçlamaktadır. Bu sayede görece homojen hasta popülasyonları ile klinik araştırmaların doğru şekilde dizayn edilmesi, farklı sağlık kurumlarındaki hastalara ait klinik ve patolojik verilerin karşılaştırılması olanaklı hale gelmektedir (Brierley ve ark., 2017). Uluslararası Kanser Kontrol Birliği [The Union for International Cancer Control (UICC)] ve ABD Kanser Ortak Komitesi'nin [American Joint Committee on Cancer (AJCC)] kabul ettiği 8. (2017) TNM evreleme sisteminde [Tümör özellikleri (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) durumlarını kapsayan değerlendirme] prostat kanserinde hastaların evrelemesi Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

Klinik uygulama kılavuzlarının PK'de klinik karar verme süreçlerini geliştirmeyi ve hastalık erken tanısını sağlarken overdiyagnozis ile gereksiz tedavinin de önüne geçmeyi amaçlayan, bu doğrultuda bireyin PK hastalık riskinin değerlendirilmesi akabinde serum total PSA taraması gerçekleştirilmektedir. PSA analiz sonucu, olgu özelinde belirlenen hastalık riskinin (örn. konvansiyonel eşik değer 4 ng/ml iken, genç hasta grupları (40-49 yaş aralığındaki beyaz ırka mensup erkek) için 2,5 ng/ml, vd. bireye özgü faktörler nedeniyle PK gelişim riski yüksek olan olgular) değerlendirilmesi ile alınan kalın iğne

biyopsi kararı ve biyopsi materyalinin patolojik incelemesiyle elde edilen sitolojik verilen birlikte ele alınarak hastalık riskinin belirlenmesi, hastalık ve tedavi takibinde biyokimyasal nüks riskinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Tablo 1.2’de Avrupa Üroloji Birliği’nin PSA düzeyleri ve Gleason skorlarını esas alan değerlendirme ile lokalize ve lokal ileri prostat kanseri olgularında biyokimyasal nüks riskinin derecesi belirlenmektedir. USPSTF [The United States Preventive Services Task Force; Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Önleyici Hizmetler Görev Gücü], 2008 yılında prostat kanseri tarama testi olarak PSA ölçümünün 75 yaş ve üzerindeki erkekler için önermesi ve 2012 yılında PK ile sınırlı olan öneriyi tüm erkekleri kapsayacak şekilde genişletmesi ile 2004-2018 yıllarını kapsayan ABD sağlık veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışma, ileri evre PK tanısında artış yaşandığı, tüm yaş gruplarında metastatik hastalık insidansının da arttığı bildirilmektedir (Desai ve ark., 2022) (Şekil 1.6-Şekil 1.8).

Gleason skorum sistemi, 1966 yılında Dr. Donald Gleason tarafından geliştirilen hasta prostat doku örneğinin (transrektal ultrasonografi eşliğinde gerçekleştirilen tru-cut biyopsi örnekleri ve prostatektomi materyali) 4x-10x büyütmede ışık mikroskobu altında gerçekleştirilen incelemesinde tümör hücre sitolojisini ve glandular mimariyi esas alan 1-5 arasında puanlamaları içeren, günümüzde de birtakım güncellemeler sonrası geçerliliğini sürdüren prostat kanseri derecelendirme sistemidir (Şekil 1.3) (Gleason, 1966). Prostat kanserinde hastalığın klinik projeksiyonunu sağlamakta ve klinik karar verme süreçlerinde yararlanılmaktadır.

Tablo 1.1. Prostat kanseri Tümör, Nod, Metastasis (TNM) evreleme sistemi 2017 kılavuzu.

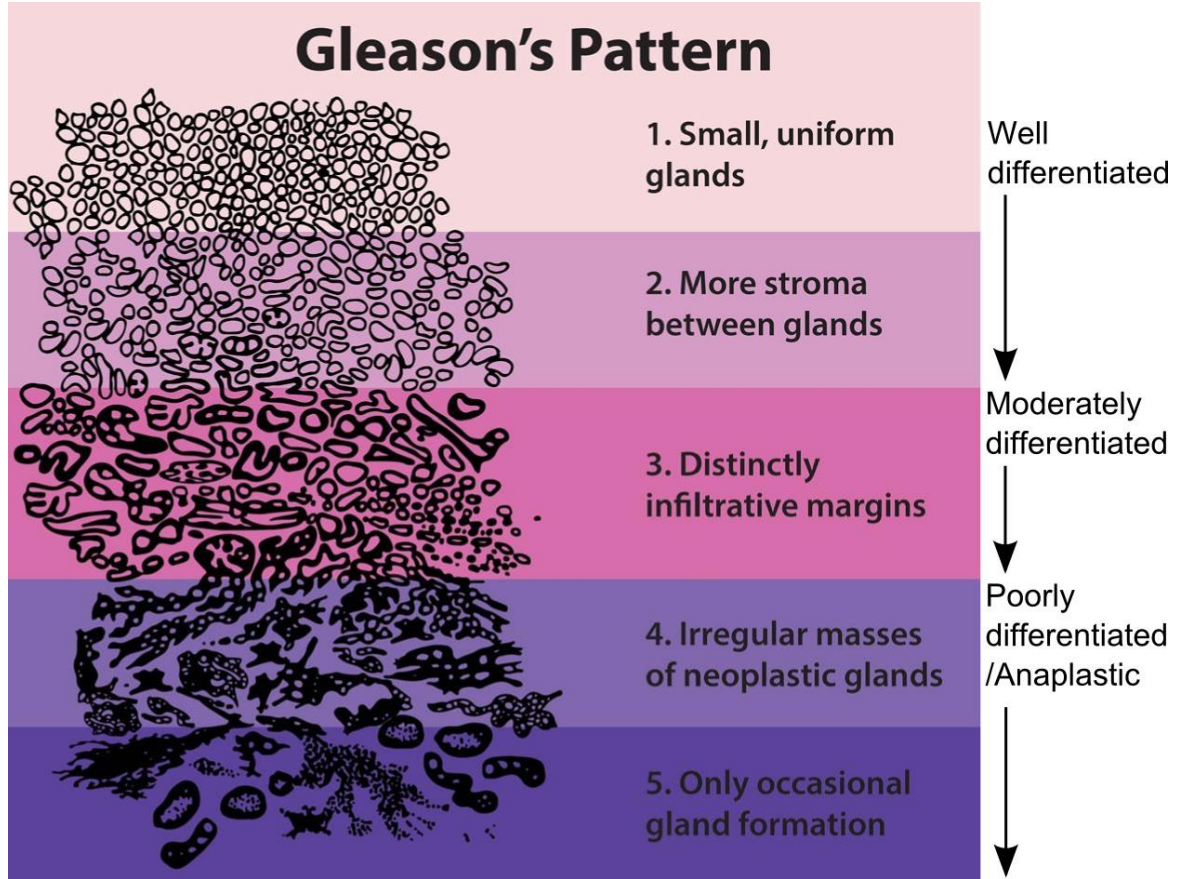
T	Primer Tümör (Dijital rektal muayeneye göre)	
T_x	Primer tümör değerlendirilememektedir	
T₀	Primer tümör varlığı için kanıt yoktur	
T₁	Klinik olarak farkedilemeyen, palpabl olmayan tümör	
	T_{1a}	Rastlantısal tümör bulgusu-rezeksiyonu yapıla doku örneğinin %5’inden azında tümör saptanması
	T_{1b}	Rastlantısal tümör bulgusu- rezeksiyonu yapıla doku örneğinin %5’inden fazlasında tümör saptanması
	T_{1c}	Tanımlanmış tümör-İnce iğne aspirasyon bx ile tümör tanısı-PSA seviyeleri yüksek olan hasta

T2	DRM’de palpabl tümör, prostata sınırlı	
	T2a	Tümör bir lobun yarısı veya daha azını infiltre etmiş
	T2b	Tümör bir lobun yarısından fazlasını infiltre etmiş
	T2c	Tümör her iki lobu infiltre etmiş
T3	Tümör prostat kapsülü aşmış	
	T3b	Ekstrakapsüler yayılım (tek veya çift taraflı)
	T3c	Tümör seminal vezikülleri infiltre etmiş
T4	Tümör fikse veya seminal vezikül dışındaki çevre dokuları (eksternal sfinkter, rektum, levator kas ve/veya pelvik duvar) da işgal etmiş	
N	Rejyonel (Pelvik) Lenf Nodları	
Nx	Rejyonel lenf nodları değerlendirilemedi	
N0	Rejyonel lenf nodu metastazı yok	
N1	Rejyonel lenf nodu metastazı var	
M	Uzak Metastaz	
M0	Uzak metastaz yok	
M1	Uzak metastaz	
	M1a	Rejyonel lenf nodlarında tümör yok
	M1b	Kemik metastazı
	M1c	Diğer bölgeler

Uluslararası Üropatoloji Cemiyetinin (ISUP, International Society of Urological Pathology) 2005 yılında güncellediği gleason skorum sistemine göre, tümör dokusunun sitolojik incelemesinde iki adet pattern birlikte yer alması halinde, en sık gözlemlenen histolojik patern primer olarak yazılmasını, ikinci sıklıkta gözlemlenen paternin ise sekonder olarak kaydedilmesini önermektedir. Tümör dokusunda ikinci bir pattern gözlemlenmiyorsa, mevcut patern primer ve sekonder patern olarak kaydedilir. Tablo 1.3’te ISUP gleason skoruna göre risk puanları; Tablo 1.4’te ise PSA düzeyleri ile olgulara ait prostat kanseri riski ISUP risk derecesi olarak sunulmaktadır.

Değerlendirilen hasta doku örneğinin üç paterne sahip olması halinde ise en sık gözlemlenen patern primer, ikinci patern ise gözlemlenme sıklığı dikkate alınmadan yüksek dereceli patern olarak yazılması önerilmektedir. Bunun yanında %5’in altında

gözlemlenen paternin sekonder olarak yazılmaması tersiyer pattern olarak değerlendirme notuna eklenmesi önerilmektedir. Toplam Gleason skoru primer ve sekonder patern puanlarının toplamı olarak belirtilir (Epstein ve ark., 2016).



https://en.wikipedia.org/wiki/Gleason_grading_system

Gleason 1: Nodüllerin kapalı şekilde paketlenmiş haldeki glandların çevresini sarmaktadır; Gleason 2: Nodülün etrafı daha gevşek glandlarla düzenlenmiş haldedir;

Gleason 3: Küçük glandular yapıların benign glandlara infiltre olması;

Gleason 4: Glandların geniş düzensiz ve kalbur benzeri delikli patterne sahip olması;

Gleason 5: Santralde komedo nekrozunun eşlik ettiği solid tümör öbekleri

Şekil 1.3. Gleason skortlama sisteminde sitolojik değerlendirme ve puanlamanın şematik diyagramı.

Tablo 1.2. Lokalize ve lokal ileri prostat kanserinde biyokimyasal nüks için Avrupa Üroloji Birliği'nin tanımladığı risk grupları

Tanım			
Düşük risk	Orta risk	Yüksek risk	
PSA <10 ng/ml ve GS<7 (ISUP derece 1)	PSA 10-20 ng/ml veya GS 7 (ISUP derece 2/3)	PSA >20 ng/ml 23,9veya GS >7 (ISUP derece 4/5)	Herhangi bir PSA düzeyi Herhangi bir GS (herhangi bir ISUP

ve cT1-2a	veya cT2b	veya cT2c	derecesi) cT3-4 veya cN+
Lokal			Lokal ileri

GS: Gleason skoru; ISUP: Uluslararası Üropatoloji Cemiyeti; PSA: Prostat spesifik antijen.

Tablo 1.3. Uluslararası Üropatoloji Cemiyeti (International Society of Urological Pathology) 2014 derecelendirme sistemi.

Gleason skoru	ISUP derecesi riski (%)
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 veya 3+5 veya 5+3)	4
9-10	5

Tablo 1.4. Serum prostat spesifik antijen (PSA) konsantrasyonlarına göre PK riski.

Serum PSA seviyesi (ng/ml)	PK riski (%)	ISUP derecesi riski (%)
0,0-0,5	6,6	0,8
0,6-1,0	10,1	1,0
1,1-2,0	17,0	2,0
2,1-3,0	23,9	4,6
3,1-4,0	26,9	6,7

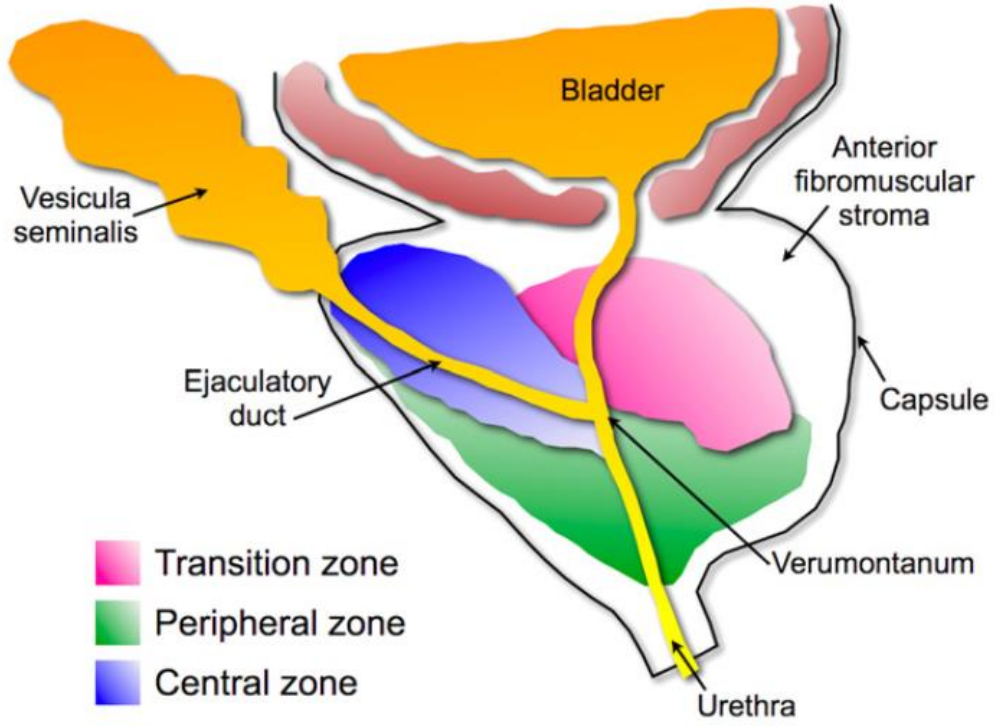
1.4. Prostat Bezi Anatomi, Embriyoloji ve Histolojisi

Prostat bezi yetişkinlerde ortalama 20 g ağırlığında, mesane boynu ve üretrayı çevreleyen retroperitoneal bir organdır. Prostat dokusu, kanalları prostatik üretraya açılan sayıları 30-50 arasında değişen tübüloalveolar bezlerden oluşan erkek cinsiyete özgü bir organdır. Embriyonik olarak endoderm orjinli ürogenital sinustan gelişmektedir. Wolf kanalları ve çevre mezenşim dokusu prostat bezi gelişim aşamalarına katkı sunmaktadır. Duktus ve asinus yapıları prostat bezinin histolojik mimarisini teşkil etmektedir. Prostatta, bezin sekresyon işlevinin gerçekleştirildiği asinusların yüzeyini kaplayan ve kolumnar tabakayı oluşturarak prostatik mayiyi üreten lüminal (glandular) hücreler, prostat duktus ve

asinuslarının yapısal olarak bazal tabakasını oluşturan bazal hücreler, lüminal ve bazal hücrelerin aralarına seyrek halde serpiştirilmiş nöroendokrin hücreler olmak üzere 3 tip hücre tipi bulunmaktadır. Nöroendokrin hücreler, nöronal hücrelerle benzer yapısal, fonksiyonel ve metabolik özellikler sergiledikleri düşünülen endokrin ve duysal hücreler olup epitel hücre büyümesi ve canlılığının korunmasına katkı sunmaktadır. Dördüncü bir hücre tipi olarak ifade edilen stromal hücreler ise prostat bez yapılarını çevreleyerek epitel hücre büyümesi ve farklılaşması süreçlerinde destek vazifesi görmektedir. Mezenşimak kökenli olan stomal hücreler, fibroblastlar, miyofibroblastlar ve düz kas hücreleri olarak ayrılmaktadır. Son olarak prostat kök hücreleri ise bazal tabakada yerleşik olup prostat dokusundaki tüm hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir (Lamb ve ark., 2011).

Prostat bezi, santral, periferik ve geçiş zonu olarak adlandırılan 3 farklı bölgeden oluşmaktadır. Periferik zon, prostat adenokanserlerinin büyük oranda orjin aldığı bölge olup, bez hacminin %70 kadarını oluşturmaktadır. Periferik zonunun alt kısmı rectum duvarının arkasına denk gelmektedir. Bu sebeple prostat kanseri tanısı için hastalardan ultrasonografi eşliğinde gerçekleştirilen doku örneklemesi, periferik zonunun üst orta ve lateral şeklinde farklı pozisyonlarından kalın iğne biyopsisi (Cor-biyopsi/Tru-cut biyopsi) olarak uygulanmaktadır. Geçiş bölgesi (transition zone) prostat bezi hacminin %5'lik kısmını oluşturur. Klinik olarak önemi ise benign prostat hiperplazilerinin (BPH) kaynak olduğu bölge olması ve BPH gelişimi sonrasında bezin çok büyük bölümünü oluşturmaktadır.

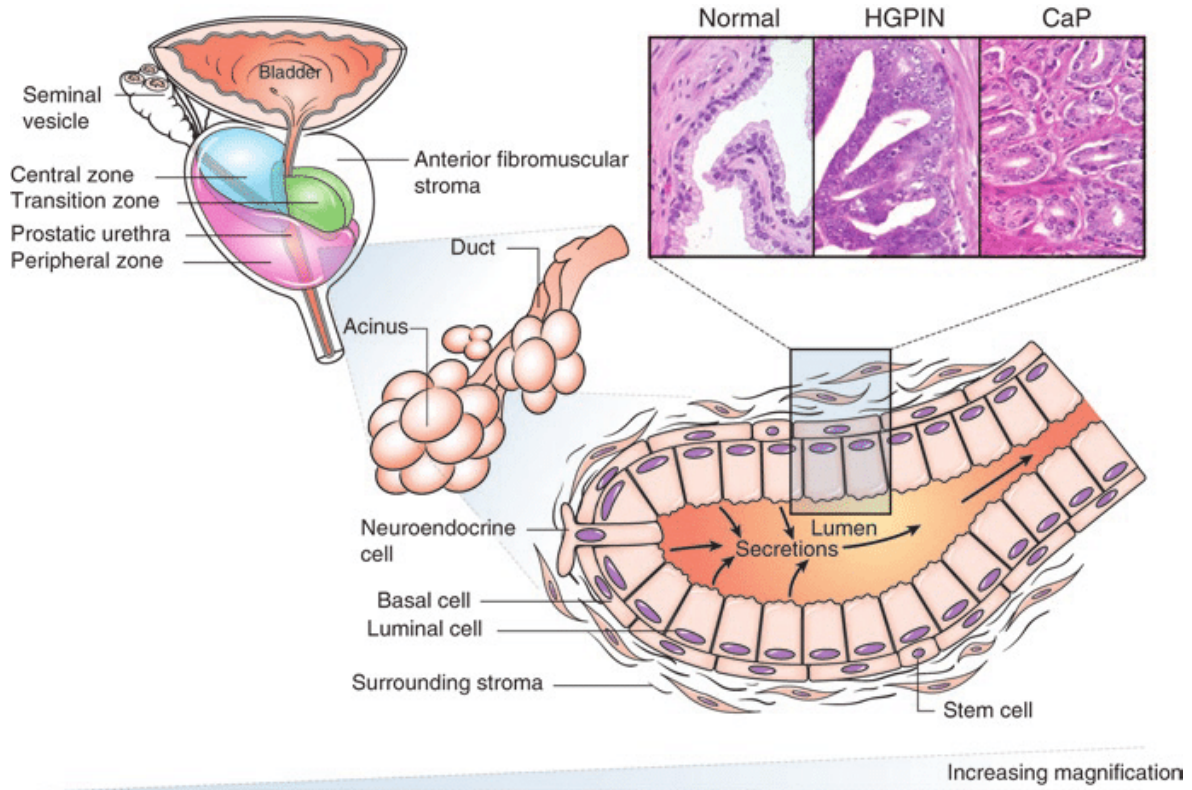
Prostat dokusunda alçak kübik epitel hücrelerinden oluşan bazal tabaka ve bu tabakanın üstünü örten sekretuar kolumnar hücreleri şeklinde iki farklı hücre tabakası bulunmaktadır (Ittmann, 2018). Yetişkinde prostat, erkek üreme sisteminin aksesuar ekzokrin bezi fonksiyonunu yerine getirmekte, ejakülasyon sürecinde üretra içerisine salgıladığı, alkali pH'sı ile vajenin asidik ortamında spermatozoaların korunması fonksiyonunu da yerine getiren ve semen sıvısı içeriğinin 1/3'ünü oluşturan kompleks proteolitik solüsyonun (başlıca bileşenleri: asit fosfataz, sitrik asit, fibrinolizin, prostat spesifik antijen ve diğer birtakım enzim ve nütriyentler) üretimini gerçekleştirmektedir (Schauer ve Rowley, 2011). Prostat adenokarsinomu, prostat kanserlerinin %95'ini oluşturmaktadır. Asiner ve duktal olmak üzere iki histolojik alt türe ayrılır. Asiner adenokanser çok daha yaygın olan tiptir.



(Schauer ve Rowley, 2011)

Şekil 1.4. İnsan prostat dokusunun zonal anatomisinin şematik gösterimi.

Nöroendokrin neoplazi, nöroendokrin diferansiasyon gösteren prostat kanseridir. İyi farklılaşmış nöroendokrin tümör, küçük hücreli nöroendokrin tümör, büyük hücreli nöroendokrin karsinoma ve intaduktal karsinoma olmak üzere farklı hücre tiplerine ayrılmaktadır.



(Lamb ve ark., 2011) Lüminal, bazal ve nöroendokrin hücreler ile kök hücreleri prostat bezi asinus yapısındaki hücre tiplerini oluşturmaktadır. Lüminal hücrelerin lümen içerisine sekresyonları duktus yapıları aracılığıyla üretraya taşınmaktadır.

Şekil 1.5. İnsan prostat bezi asinus ve duktus yapılarının şematik gösterimi.

1.5. Prostat Kanseri Tanı

Büyük çoğunlukla semptom ve bulgu vermeden ilerleyen 50 yaş üstü erkekleri etkileyen prostat kanserinde, tarama ve erken tanı diğer kanser türlerinde olduğu gibi önem taşımaktadır. Prostat kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz kabiliyetini kazandığı ileri evre PK olgularında gözlemlenebilen hematüri, pelvik ağrı, hematospermi ve erektil disfonksiyon ve vertebral kemik metastazına bağlı ağrı semptomlarına rastlanılabilir ise de PK çoğunlukla semptom oluşturmada gelişim gösterebilen bir tümördür.

50 yaş üstü erkeklerde gerçekleştirilen rektal muayenede şüpheli palpasyon bulgusuna rastlanılan veya plazma PSA seviyelerinde yükseklik saptanan olgularda transrektal ultrason eşliğinde gerçekleştirilen kalın iğne biyopsi örneklerinin patolojik incelemesi ile prostat kanser tanısı konulabilmektedir.

1.5.1. Prostat Spesifik Antijen

Prostat spesifik antijen (PSA, prostate specific antigen, Kallikrein-Related Peptidase 3) normal ve neoplastik prostat dokusu tarafından ifade edilen, semendeki major proteaz olup seminal sıvının likefaksiyonunu sağlayan bir glikoprotein molekülüdür. Prostat bezi sekretomunun en bilinen üyesi olan PSA proteini düzeylerindeki değişimlerin hastalık tanı ve tedavi takipleri süreçlerinde oldukça faydalı ve yol gösterici bir biyobelirteç olarak onkoloji pratiğinde üstlenmiş olduğu rol arketipik bir örnek olarak gösterilebilir.

Prostat kanseri gelişimi için yüksek risk taşıyan erkeklerde prostat spesifik antijen taraması önerilmektedir (Mohler ve ark., 2019). 1980li yıllarda devrimsel nitelik taşıyan bir biyobelirteç olarak serum PSA konsantrasyonlarının ölçümünün PK'de tanısal amaçlı kullanıma girmesi ile hastalığın erken evrede teşhisi mümkün olmuştur. Organ spesifik, ancak kanser spesifik olmayan PSA, prostatit, benign prostat hipertrofisi ve diğer nonmalign durumlarda da yükselebilmektedir. Ayrıca siyah ırkta beyaz ırka göre yüksek plazma konsantrasyonlarına sahiptir.

Sağlıklı erişkin erkeklerde serum PSA düzeyleri, prostat lümenal (glandular) epiteli hücre popülasyonunu ve bunun bir yansıması olarak prostat dokusu boyutlarını yansıtmaktadır. Prostat boyutlarının yaşla birlikte artış göstermesi dolayısıyla PSA konsantrasyonları artmaktadır (Crawford, 1997). Düzeylerindeki artışın hızı yaşlı erkeklerde daha fazladır. 60 yaşında sağlıklı 471 erkek üzerinde yapılan bir çalışmada PSA düzeylerinin %3,2 (0,04 ng/ml) oranında yıllık artış gösterdiği bulunmuştur (J. E. Oesterling ve ark., 1993). Yaşa özgü PSA referans aralıkları prostat kanserinde PSA taramasında pozitif prediktif değeri ve tanısal özgüllüğü arttırmaktadır. Tablo 1.5'te PSA düzeyleri için yaşa bağlı normal referans aralık değerleri verilmektedir. Ayrıca toplum tabanlı gerçekleştirilen bazı çalışmalarda prostat kanseri olmayan erkeklerde VKİ (vücut kitle indeksi) ile PSA seviyeleri arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Baillargeon ve ark., 2005; Beebe-Dimmer ve ark., 2008; Rundle ve Neugut, 2008; Werny ve ark., 2007). Ancak erken evre PK tanısı alarak radikal prostatektomi olan 14,000 erkek hastanın dahil edildiği bir kohort çalışmasında VKİ yüksek olguların plazma hacminin PSA konsantrasyonu ile çarpımı sonucu elde edilen total PSA kütlesinin hesaplanması ile bu olguların VKİ ile tPSA kütlesi arasında fark olmadığı gösterilmiştir (Banez ve ark., 2007). Buna dışında birçok ilaç PSA düzeylerinin etkileyebilmektedir. 5- α redüktaz inhibitörleri (finasteride ve dutasteride), serum total PSA (tPSA) düzeylerinde %50'den fazla düşüşe sebep olmaktadır (Wang ve ark., 1997). nonsteroid antienflamatuar ilaçlar (NSAIDs, asetaminofen) toplum tabanlı 1319 erkeği içeren bir çalışmada NSAIDs'ların tPSA düzeylerinde ortalama 0,10 ng/ml; asetaminofen kullanımının ise 0,28 ng/ml karar

düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir (Singer ve ark., 2008). Statin kullanımının yıllık periyod içerisinde tPSA düzeylerinin %4,1 oranında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir, bu azalma yaşla yıllık PSA artışı olan %3,2'nin üzerindedir (Hamilton ve ark., 2008). Yine tiyazit grubu diüretik ilaçların düşük PSA düzeyleri ile ilişkili olduğunu gösteren 1864 erkeğin dahil edildiği bir çalışmada gösterilmiştir (Chang ve ark., 2010). PSA testinin analitik açıdan ele alındığında biyolojik varyasyon ve testin belirsizliğine bağlı gün içerisinde tekrarlı ölçümlerde değişken sonuçların alınabilmektedir. PSA düzeyleri 2 ng/ml'nin altında olan 3568 erkek hastanın dahil edildiği bir çalışmada, 4 ölçümle elde edilen analitik varyasyonun %6, ortalama biyolojik varyasyonunun %14 olduğu bildirilmektedir. Bu doğrultuda ilk PSA ölçümü 2 ng/ml'nin altında olan bir olguda %30'luk değişimin normal random varyasyon dahilinde doğru bir değişimi gösterdiği ifade edilebilir. Var olan tüm bu verilerle birlikte bağımsız bir değişken olarak PSA testinin, DRM ve transrektal ultrasonografiden daha iyi bir PK prediktörü olduğu bildirilmektedir (Catalona ve ark., 1994).

Kallikrein-3 (KLK3)'ün tümör dokusunda lenfanjiojenezi arttırdığı bilinmektedir. VEGF'lerden (vascular endothelial growth factor) biri olan ve lenfanjiojenezin indüksiyonunda önemli olduğu gösterilen VEGF-C aktivitesinin posttranslasyonal modifikasyonundaki rolü ile PSA tarafından artırıldığı gösterilmiştir (Jha ve ark., 2019) [VEGF-A ve homolog genler tarafından ifade edilen VEGF paralogları (PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D)]. PSA, indifferansiye yüksek dereceli prostat kanserleri haricinde prostat tümör hücrelerinin tamamı tarafından sentezlenmekte ve sekrete edilmektedir. Normal prostat dokusunda, tubuloalveolar asinusların lümen bakan yüzeyini örten sekretuar prostat epitel hücresinde (lümenal, glandular hücreler) proenzim olarak (proPSA) olarak sentezlenen PSA lümen içerisine sekrete edilmeleri sonrasında propeptid kısmı uzaklaştırılarak aktif PSA enzimine dönüşümü gerçekleştirilmektedir (Ferraro ve ark., 2021). Lümen içerisindeki aktif PSA'nın küçük bir kısmı, proteolizis ile sonrasında kan dolaşımına geçerek bağılı olmayan serbest PSA'yı (fPSA) oluşturacak olan inaktif PSA'ya dönüştürülür. Asiner lümen içerisindeki aktif PSA da (proteolitik parçalanmaya uğramamış) direkt olarak periferik kan dolaşımına difüze olabilmektedir. Bu şekilde periferik dolaşıma geçen proteolitik özelliğe sahip aktif PSA, hızlıca α -1 antitripsin, α -2 makroglobulin gibi proteaz inhibitörü fonksiyona sahip plazma proteinlerine bağlanarak kompleks halinde taşınır (Balk ve ark., 2003; Lilja ve ark., 1991; Mikolajczyk ve ark., 2002).

Prostat kanserinde (PK), normal prostat dokusuna göre epitel başına düşen PSA üretimi

daha düşük olmasına karşın epitel tabakasının tabanındaki bazal hücrelerin azalmasının bir sonucu olarak kapiller endotel hücreleri ile asinus yapılarını ayıran membran olan bazal lamina yapısının ve mimarisinin bozulmasıyla lümen içerisine sekrete edilen proPSA ve diğer birkaç kırılmış PSA formunun kan dolaşımına direkt geçişinde artış yaşanmaktadır. PK’de, lümen içerisinde proteolitik parçalanmadan kaçarak kan dolaşımına sızan aktif PSA formlarının oranı daha fazla olmakta, bu nedenle de bağlı PSA oranı daha yüksek olmaktadır. İnternal proteolitik olarak kırılan ve inaktive edilen matür PSA proteinini yansıtan serum serbest PSA (fPSA) düzeyleri normal prostat dokusu özelliğini yansıtmaktadır. PK olgularında, normal prostat veya BPH’ı olanlara göre düşük fPSA/tPSA veya yüksek kompleks PSA (cPSA) miktarları gözlemlenmektedir (Balk ve ark., 2003; Björk ve ark., 1996; Christensson ve ark., 1993; Partin ve ark., 2002).

PK olmayan 40-79 yaş aralığındaki 3874 beyaz ırka mensup sağlıklı erkeğin dahil edildiği toplum bazlı prospektif bir çalışma elde edilen bulgulara göre PSA yaş aralığı için düzeylerinin yaşa bağlı önerilen normal referans aralığı beyaz erkeklerde 45 yaşına kadar 2,5 ng/ml, 60 yaşına kadar 4 ng/ml olarak ifade edilirken, 40-49 yaş için 0,0-2,5 ng/ml; 70-79 yaş için 0,0-6,5 ng/ml olarak bildirilmektedir (Joseph E. Oesterling ve ark., 1993). 40-79 yaş aralığındaki 1673’ü siyah ırktan, 1802’si beyaz ırktan toplam 3475 PK olmayan erkek ile, 411’i siyah ırktan 1372’si beyaz ırktan toplam 1783 PK tanılı erkek olgunun dahil edilerek PSA için normal referans değerlerin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada, beyaz ve siyah ırka mensup erkeklerde yaşa bağlı referans üst limitleri sırasıyla: 40-49 yaş aralığı için 2,5/2,0 ng/ml; 50-59 yaş aralığı için 3,5/4,0 ng/ml; 60-69 yaş aralığı için 3,5/4,5 ng/ml; 70-79 yaş aralığı için 3,5/5,5 ng/ml olarak belirtilmiş olup, siyah ırka mensup erkekler için normal referans üst limiti %95 yüzdeler dilimin üstünün kabulü halinde PK olanların %40’ında yanlış negatiflik sorunu ortaya çıktığı bildirilmektedir (Morgan ve ark., 1996). Türkiye’de DRM ve TRUS yapılan ve PSA, prostat hacmi, PSA dansitesi değerleri belirlenen prostat patolojisine sahip olmayan 40 yaş üstü 255 erkeğin dahil edildiği toplum bazlı bir çalışma verilerine göre 40-49 yaş aralığındaki erkeklerde PSA için tespit edilen normal üst limit (%95 yüzdeler dilim değeri) 4,51 ng/ml olarak belirtilirken, 60-69 yaş için bu değer 6,17 ng/ml, 70 yaş üstü için 10,18 ng/ml olarak bildirilmektedir (Muezzinoglu ve ark., 2005). Diğer taraftan İngiltere Sağlık ve Klinik Mükemmellik Enstitüsü (NICE-National Institute of Health and Clinical Excellence) dahil birtakım ülkelerde sağlık otoriteleri PSA düzeyleri için yaşa bağlı referans üst limitlerin belirlenmesinin ve olguları normal aralıkta veya değişik şekilde sınıflandıran tanı algoritmasını kullanmanın fayda sağlamadığı dolayısıyla da klinik pratik uygulamalarında

yer verilmemesi önerilmektedir (Gilbert ve ark., 2018).

PSA dansitesi: Transrektal USG (TRUS) ile prostat boyutları belirlenen olgularda serum PSA düzeylerinin PSA hacmine oranlanması ile elde edilen bir $>0,15$ ng/ml/cc kesim değerinin yüksek PSA dansitesi olarak belirtildiği ve PK için artmış risk ile ilişkilendirilirken daha düşük oranlar benign prostat hipertrofisi lehine şeklinde belirtilmektedir (Benson, Whang, Olsson, ve ark., 1992; Benson, Whang, Pantuck, ve ark., 1992). Ancak çok merkezli bir çalışmada elde edilen veriler $0,15$ ng/ml/cc kesim değerini esas alarak biyopsi kararını belirlemenin kanser olgularının yarısının erken tanı almasının önüne geçeceğini göstermektedir (Catalona ve ark., 1994). Tedavi uygulanması öncesinde PSA ölçümleri gerçekleştirilen 1809 PK tanımlı erkek hastanın verileriyle gerçekleştirilen bir çalışmada hasta tPSA düzeylerini baz alarak bir düzeltme ile PSA dansitesinin klinik karar verme kesim değerinin duyarlılığının arttırılabileceği rapor edilmiştir. Buna göre total PSA düzeyleri 4-10 ng/ml aralığındaki olguların PSA dansite değerleri $0,1$ ng/ml/cc; 10-20 ng/ml aralığındaki olgularda ise $0,19$ ng/ml/cc düzeltmesinin uygulanmasını önerilmektedir. (Stephan ve ark., 2005). Bunun dışında TRUS ile belirlenen prostat volümlerindeki hatadan kaynaklanan variabilitenin aynı hastada gerçekleştirilen ölçümlerde bile PSA dansitesi değerinde %15 civarında değişime neden olduğu bildirilmektedir (Brawer ve ark., 1993).

Tablo 1.5. Serum total PSA düzeyleri için belirlenen yaşa bağlı referans aralıkları (Partin ve ark., 1996).

Yaş Aralığı	Serum total PSA seviyesi (ng/ml)
40-49	0,0-2,5
50-59	0,0-3,5
60-69	0,0-4,5
70-79	0,0-6,5

PSA hızı (velocity): Zaman içerisindeki serum PSA düzeylerinin ne hızda değiştiğinin belirlenmesi yaklaşımı, serum PSA düzeyleri yüksek olarak belirlenen bireylerin PK'ye sahip olmaları halinde, zamana bağlı PSA konsantrasyonlarında düzenli artışın gözlemlendiği bir paterne sahip olmasının çok daha olası olması ile geliştirilmiştir (Smith ve Catalona, 1994). Yapılan bir çalışmada $0,75$ ng/ml yıllık PSA hızı kesim noktası alındığında PK'nin BPH vd. prostat hastalıklarıyla ayırmadaki özgüllüğünün sırasıyla %90 ve %100 olduğu gösterilmiştir (Carter ve ark., 1992).

Serbest PSA (fPSA) ve bağı PSA (bPSA): PK ile benign durumlar karşılaştırıldığında, fPSA/tPSA oranı düşük, bPSA düzeylerinin ise yüksek olması PK için çok daha karakteristiktir. tPSA düzeyleri yaş ve ırka özgü normal referans aralıklar içerisinde tespit edilen, fPSA ve bPSA'nın hasta ile paylaşılan klinik karar verme süreçlerinin bir parçası olarak diagnostik sürece dahil edilmesinin tanı özgüllüğünü arttırdığı, bu sebeple klinik uygulamalarda kullanımı önerilmektedir. DRM'de prostat dokusu palpabl, tPSA düzeyleri 4-10 ng/ml aralığında ölçülen, 50-75 yaş aralığındaki 379'u PK, 394'ü benign prostat hastalık tanılı toplam 773 erkek olgunun dahil edildiği bir çalışmada, f/t PSA oranını %25 kesim değerinde alınmasının PK dışı benign durumlar olarak tespit edilen olguların %80'ininde gereksiz biyopsinin önlenmesindeki faydasına ek, PK olgularının %95'inin tespit edilmesini sağladığı, f/t PSA kesim değeri %10 alındığında PK riskini %56 olarak belirlendiği, >%25 olan olgularda ise PK risk olasılığının %5-9 olarak tespit edilmiştir (Catalona ve ark., 1998).

Kompleks PSA (cPSA): α -1 antikimotripsin ile kompleks yapmış olan PSA'nın ölçümü için geliştirilen bir testtir. f/tPSA oranına benzer şekilde tanı özgüllüğünü arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ek ekonomik maliyet getirmesi dolayısıyla kullanımı sınırlıdır.

Percent [-2]proPSA: lüminal epitelde sentezlenerek lümen içerisine sekrete edilen proPSA PK olgularında belirgin şekilde kan dolaşımına sızmaktadır. proPSA'nın proteinlere bağlı olmayan özel bir formu olan ve PK olgularında kan düzeyleri artış gösteren [-2]proPSA'nın dolaşımdaki fPSA ile oranlanması PK tanısal özgüllüğü arttıracak düşünülmemektedir. [-2]proPSA/fPSA'nın (%[-2]proPSA) tanı algoritmasında kullanımına ilişkin FDA henüz değerlendirmesi sürmektedir (Sokoll ve ark., 2010).

Prostat sağlık indeksi (phi, prostate health index): tPSA değerleri 4-10 ng/ml aralığındaki 658 erkek hastanın dahil edildiği çok merkezli bir çalışmada, PSA, fPSA, [-2]proPSA ve phi'nin tanısal tahmin performanslarının prostat biyopsi sonuçlarıyla karşılaştırılması kapsamında elde edilen sonuçlar phi'nin, tüm bu diğer belirteçlerden prostat kanseri, yüksek dereceli prostat kanseri ve klinik olarak anlamlı prostat kanserini tahmininde daha üstün olduğunu göstermiştir (Loeb ve ark., 2015). Radikal prostatektomi uygulanan 438 erkek hastanın dahil edildiği diğer bir çalışmada ise, phi ve [-2]proPSA istatistiksel olarak anlamlı şekilde patolojik incelemede agresif tümör karakterinin tespitiyle uyum gösterdiği ancak klinik karar verme modellerine ve hastaya net olarak ek klinik fayda sağlamadığı bildirilmiştir (Fossati ve ark., 2015). tPSA değerleri 4-10 ng/l DRM kanser düşündüren muayene bulgusu olmayan >50 yaş erkek hastalarda FDA

tarafından kullanımı onaylanmış bir kanser risk değerlendirme test olmasına karşın PK karar verme süreçlerinin yönetimindeki konumu henüz netleşmemiştir.

1.5.2. Yeni Biyobelirteçler

Negatif biyopsi sonrası ikinci bir biyopsi kararının PK için klinik anlamlılığını belirlemede yararlanılan testlerdir. Yukarıda sayılan phi, dışında Progensa-PCA3, SelectMDX DRE idrar testi ve doku temelli epigenetik ConfirmMDX testi bu gruptadır.

Progensa- Prostate cancer gene 3 (PCA3) idrar testi: PCA3, PK'de yüksek ifadelenen, kodlanmayan uzun RNA (long non-coding RNA) yapısındaki bir biyobelirteç olup, idrar sediment analizinde tespiti esasına dayanmaktadır. Biyopsi sonucu pozitif çıkan yüksek PSA düzeylerine sahip olgularda PK varlığının belirlenmesinde fPSA ve tPSA'ya göre üstün olsa da ilk biyopsi sonucu negatif olarak değerlendirilen olgularda ikinci bir biyopsinin endike olup olmadığını belirlemede belirsiz bir konuma sahiptir (Auprich ve ark., 2011; Hessels ve ark., 2010).

Stockholm3 testi: Farklı birtakım klinik değişkeni içine alan (yaş, birinci derece yakınında PK öyküsü, önceki biyopsi), kan biyobelirteçleri [tPSA, fPSA, f/tPSA, hKLLK2, MIC-1 (macrophage inhibitor cytokine-1) ve MSMB (microseminoprotein-β)] ve ISUP ≥ 2 poligenik risk skoru tahmin modeli olarak geliştirilmiştir (Lendinez-Cano ve ark., 2021; Maggi ve ark., 2021). Bu testin MRI ve tPSA birlikte kullanıldığı toplum taramasında klinik olarak önemsiz PK yüzdesini azaltmada yarar sağladığı gösterilmiştir (Eklund ve ark., 2021).

SelectMDX DRE idrar testi: Hasta idrar numunesinde HOXC6 ve DLX1 mRNA düzeylerini belirleyerek PK yüksek riskinin değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır (Lendinez-Cano ve ark., 2021). Çok merkezli bir klinik çalışmada SelectMDX MRI PI-RADS (Multiparametric Magnetic Resonance Imaging) skoru <4 veya PI-RADS skoru <3 olan erkeklerde klinik olarak anlamlı prostat kanserini (csPCa, clinically significant prostate cancer) yakalayamama yüzdesinin sırasıyla %6,5 ve %3,2 olduğu (olguların sırasıyla %45,8 ve %40'ında biyopsi endike değildir) bildirilmektedir (Lendinez-Cano ve ark., 2021; Maggi ve ark., 2021).

ConfirmMDX testi: Benign prostat dokusunu temel alan ve hasta doku örneğinde seçilen 3 gendeki epigenetik değişikliklerin belirlenmesi esasına dayanan negatif prediktif değeri %88 olan bir testtir. Test APC, RASSF1 ve GSTP1 gen promoterler bölgelerinde

metilasyonun varlığını belirlemekte, gen promoter bölgelerinde metilasyon varlığında ikinci bir biyopsiyi önermektedir.

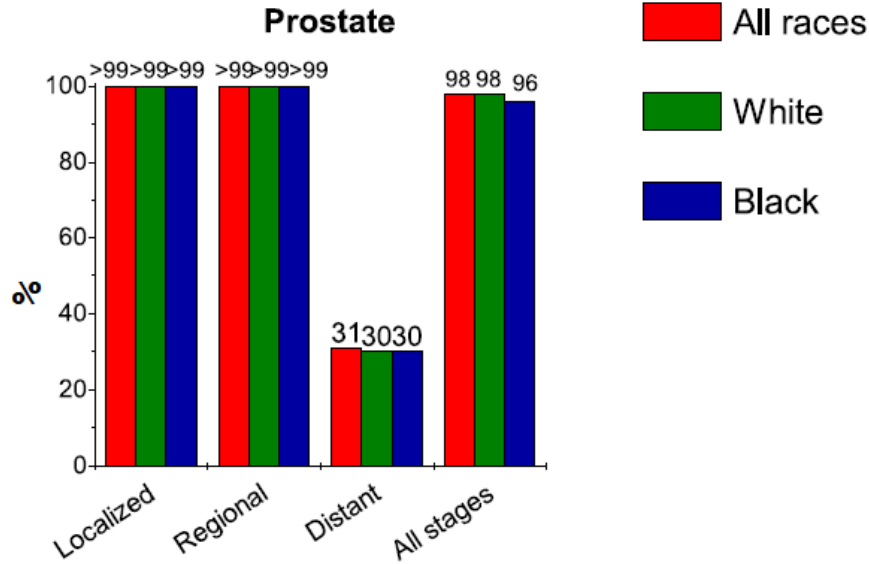
Doku örneği tabanlı prognostik biyobelirteç testler: ASCO-EAU-AUA uzmanları tarafından önerilen 5 ticari ürün şu şekildedir: Oncotype Dx®, Prolaris®, Decipher®, Decipher PORTOS and ProMark®. Lokalize prostat kanseri olan hastalarda aktif sürveyans veya radikal prostatektomi kararın verilmesinde klinik karar verme süreçlerinin doğru şekilde belirlenmesinde katkı sundukları düşünülmektedir (Eggerer ve ark., 2020). Ayrıca, diyagnostik amaçlar taşıyan sistematik prostat biyopsisi yaklaşımlarında yararlanılan TRUS (transrectal ultrasonography), MRI (Manyetik rezonans görüntüleme ile hedefli prostat biyopsisinde) gibi görüntüleme tekniklerinin kullanımını ifade etmek önemli olacaktır (Bryk ve ark., 2017).

Moleküler tanı araçları: FDA, tercihen metastatik prostat adenokarsinomu doku örneği olmak üzere, primer tümör dokusunda homolog rekombinant tamir (HRR, homolog recombinant repair) ve DNA yanlış eşleşme tamirinden (MMR, mismatch repair) sorumlu genlerde somatik mutasyon araştırılmasını olgulara önerilmesini tavsiye etmektedir. Diğer alternatif hala daha yaygın olmayan kan dolaşımındaki tümör DNA (ctDNA, circulating tumor DNA) örneği ile de genomik araştırmalar yapılabilmektedir. FoundationOne® Liquid CDx testi FDA tarafından onaylanmıştır (Food and Drug Administration, 2020). MMR proteinlerinin (MSH2, MSH6, MLH1 ve PMS2) immünohistokimyasal analizi ve/veya yeni nesil dizileme (new generation sequencing) ile ilgili genomik patolojilerin tespiti mümkündür. BRCA1/2, ATM ve MMR genlerine ilişkin germline mutasyonların araştırılması PK için yüksek risk taşıyan bireylerde ve özellikle metastatik PK'li olgularda klinik endikasyon ile birlikte önerilmektedir (Lotan ve ark., 2020).

PK erken tanısının önemli olduğu bireye özgü risk faktörleri: >50 yaş, >45 yaş [birinci dereceden akrabasında PK olması (Albright ve ark., 2015), Afrika kökenliler]. Afrika kökenliler daha fazla şekilde ileri evre PK tanısı almakta ve radikal prostatektomi sonrası hastalık nüksü daha erken gerçekleşmektedir (Chornokur ve ark., 2011; Karami ve ark., 2007; Sanchez-Ortiz ve ark., 2006). Bireye özgü risk faktörlerinden bir diğeri agresif PK ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan germline mutasyonlara sahip olunmasıdır. BRCA1 ve BRAC2 tümör baskılayıcı genlerinde mutasyon taşıyan erkekler daha erken yaşta PK tanısı almaktadır (Gorodetska ve ark., 2019; E. C. Page ve ark., 2019). 40 yaşında bazal tPSA düzeyleri <1 ng/ml ve 60 yaşında <2 ng/ml olan erkeklerde metastatik hastalık gelişmesi veya PK bağlı ölüm riskinin düşük olduğu bildirilmektedir (Carlsson ve ark., 2014).

PK tanısı, hastalığın farklı evrelerinde (lokalize, lokal ileri evre veya metastatik)

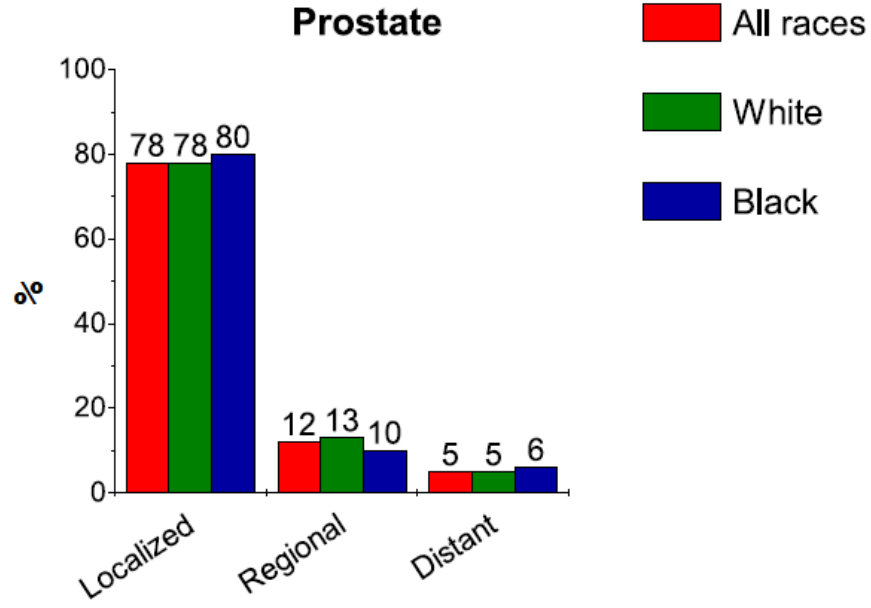
konmaktadır (Litwin & Tan, 2017). Lokalize prostat kanseri düşük proliferatif indeks ve heterojen şekilde dağılım gösteren somatik mutasyonları taşıyan hücre gruplarıyla multifokal paternde bir hastalıktır. Lokalize PK tedavisinde aktif izlem, radikal prostatektomi, radyoterapi ya da HIFU (high-intensity focused ultrasound) yer alırken, lokal ileri aşamada, radyoterapi ve radikal prostatektomi tedavi seçeneklerini oluşturmaktadır. Metastatik evrede, radyoterapi, hormon terapisi/androjen deprivasyon terapisi (ADT) [androjen reseptör sinyal yolağını hedefleyen antiandrojen ajanlar (flutamid, enzalutamid, dorulatamid, apalutamid vd.), cerrahi ya da medikal kastrasyonla androjen üretiminin baskılanması] ya da dozetaksel, paklitaksel vd. ajanlarla kemoterapi yaklaşımlarına yönelinmektedir (Rebello ve ark., 2021).



(Siegel ve ark., 2020)

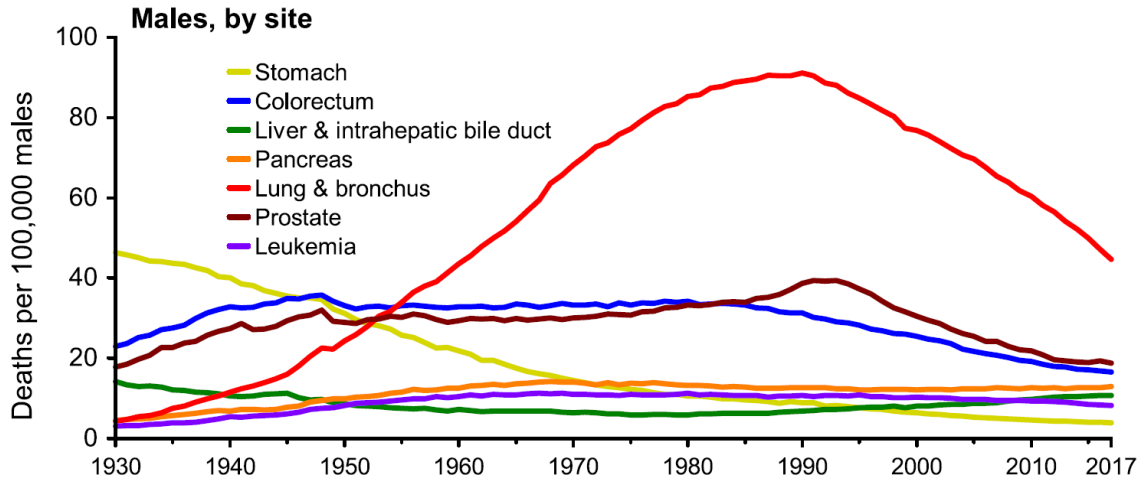
Not: Görsel, 2009-2015 yılları arasını kapsayan ABD sağlık verilerini esas almaktadır.

Şekil 1.6. Prostat kanser olgularında tanı anındaki hastalık evresi ve PK tanısı alan olgunun siyah veya beyaz ırktan olmasına göre 5 yıllık relatif sağkalım hızları.



Not: Görsel, 2009-2015 yılları arasını kapsayan ABD sağlık verilerini esas almaktadır (Siegel ve ark., 2020).

Şekil 1.7. Prostat kanser olgularında tanı anındaki hastalık evresi yüzde dağılımı.



(Siegel ve ark., 2020).

Şekil 1.8. ABD’de erkek cinsiyette önde gelen kanser türlerinden 7’sinin 9 dekadlık dönemi kapsayan mortalite hızlarındaki değişim trendi.

PK hastalık seyri ve prognozun belirlenmesi hedefiyle PTEN kaybının moleküler olarak tespiti, geçmişte mikrosatellit analiziyle gerçekleştirilmekteydi, ancak bu yöntemler klinik laboratuvar pratiğine tam olarak uygunluk göstermemektedir (Cairns ve ark., 1997). Günümüzde maliyet etkin ve yararlı bir analiz olarak immünohistokimyasal yöntemle PTEN biyobelirteç analizi, PTEN proteinini güçlü şekilde bağlayan antikorların geliştirilmesi ile

birlikte gerçekleştirilebilmektedir (Lotan ve ark., 2015). Ayrıca PTEN kaybının genomik tespitinde FISH (Fluorescence in situ hybridization) analizi de gerçekleştirilebilmektedir (Yoshimoto ve ark., 2007).

FDA metastatik PK olgularında germline mutasyon taramasının hastalara teklif edilmesini önermektedir. Homolog rekombinant tamir (HRR, homolog recombinant repair) mutasyonu saptanan olgularda Faz 3 PROfound çalışmasının sonuçlarından elde edilen veriler doğrultusunda PARPi tedavisinin (olaparib, rucaparib) ARTA'ya alternatif (androgen receptor targeted agents) sunduğunu göstermektedir (Hussain ve ark., 2020).

1.5.3. Evrelemede Kullanılan Görüntüleme Testleri

^{99m}Tc-Kemik sintigrafik taraması; Fluoride PET [¹⁸F-sodyum florid (¹⁸F-NaF) PET veya PET/CT], kemik sintigrafisine benzer bir yöntemdir; choline PET/CT visseral nodal metastazların tespitinde faydalı olduğu gösterilmiştir; MRI, kemik metastazlarının tespitinde CT'den üstün olduğu gösterilmiş bir görüntüleme yöntemidir (Van Nieuwenhove ve ark., 2022; Zacho ve ark., 2020).

1.6. Prostat Kanserinin Moleküler Patogenezi

Prostat kanserinin androjen bağımlı gelişim gösterdiği 1940'lı yıllarda ilk olarak Huggins ve Hodges'in PK-testosteron ilişkisini ortaya koymasıyla hastalığın hormonal yönünün aydınlatılması ile gerçekleşmiştir.

AR sinyalizasyonu, ligandın (T, DHT) sitoplazmada şaperon proteinlerle kompleks halde bulunan AR'ye bağlanması sonrasında aktive olan AR'nin kompleksten ayrılarak nükleusa transloke olmasıyla DNA üzerindeki hedef gen bölgelerinde etkinliği şeklinde özetlenebilir. AR'nün etkinliğinde ligand bağlayıcı bölge (LBD) son derece önemli olup PK tedavisinde temel moleküler hedeflerdendir. Hastalık progresyonunda anahtar konumda yer alan genetik değişimler: ETS ailesi genleri ile TMPRSS2 füzyonu, c-myc onkogen amplifikasyonu, TP53 ve PTEN mutasyon ve/veya delesyonu yanında, ileri evre hastalıkta androjen reseptör (AR) mutasyonu ve/veya amplifikasyonudur. PTEN kaybı, daha agresif tümör özellikleri ve kötü prognozla ilişkili olup, lokalize PK olgularında <%20 oranında PTEN kaybı saptanmakta iken, metastatik KDPK'li olgularda >%40 düzeydedir (Leinonen ve ark., 2013; Troyer ve ark., 2015). PTEN kaybının altında yatan mekanizmanın aberran CpG metilasyonları olduğunu gösteren deliller bulunmaktadır (Zhao ve ark., 2017).

Myc onkogeni nükleer DNA'ya bağlanarak hücre siklusunu düzenleyici fonksiyon gösteren aynı isimdeki proteini kodlamaktadır. c-myc, hücre proliferasyonu, immortalizasyon, dediferansiasyon ve transformasyonunda rol oynamaktadır. Diğer taraftan prostat kanserinde hastalık agresif karakteriyle ilişkilendirilen uyarılan katlanmamış protein yanıtları ve özellikle IRE1 α -XBPs ile güçlü bir ilişki sergilemektedir (Sheng ve ark., 2019).

PI3K (phosphoinositide-3-kinase; fosfotidil inozitol-3 fosfat kinaz)/Akt (protein kinaz B) sinyal yolağı prostat kanserinde hücre canlılığı ve androjen reseptör (AR) ile birlikte kanser hücre proliferasyonunda esansiyel yere sahip olduğu bildirilmektedir. PI3K/Akt sinyal yolağının aşağı akış düzenlemesinde substrat olan FOXO3a (Forkhead transcription factor) AR gen ifadesinin pozitif yönde düzenlenmesinde fonksiyonu olduğu gösterilmiştir (Yang ve ark., 2005).

Klinik ve deneysel çalışmalar, prostat kanserinde PTEN (tumor suppressor phosphatase and tensin homolog) gen kaybı ve myc gen ifadesinde artışın PK progresyonu ve AR sinyalizasyonun inhibisyonuna karşı dirençle ilişkili olduğunu göstermektedir (Donovan ve ark., 2015; Salami ve ark., 2018). Tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren bir lipid fosfataz olan PTEN, onkojenik membran reseptör tirozin kinaz aktivitesi gösteren sinyal yolaklarının aktivasyonunda rol oynayan PIP3'ün [phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate] fosfat grubunu uzaklaştırarak PIP2 [phosphatidylinositol (4,5)-trisphosphate] dönüşümüne neden olmaktadır. Bu yönüyle, membran fosfolipidlerinin PIP2 $\rightarrow$ PIP3 dönüşümünü katalizleyerek onkojenik sinyal yolaklarının aktivitesini destekleyen PI3K'ın fonksiyonunu antagonize etmektedir. PIP3, kanserlerde sıklıkla yüksek aktivite sergileyen onkojenik Akt sinyalizasyonunu aktive ederek mTOR'u (mammalian target of rapamycin) içine alan diğer sinyal yolaklarının uyarılmasına neden olmaktadır. Bir bütün olarak değerlendirildiğinde PTEN/PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının, PTEN gen kaybının gerçekleştiği prostat tümör hücrelerinde yüksek aktivite kazanmasıyla progrese olan tümör hücrelerinin metastatik özellikler kazandığı ve tedaviye dirençli prostat kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Robinson ve ark., 2015; Taylor ve ark., 2010).

1.7. Androjen Reseptör Biyokimyası ve Fonksiyonu

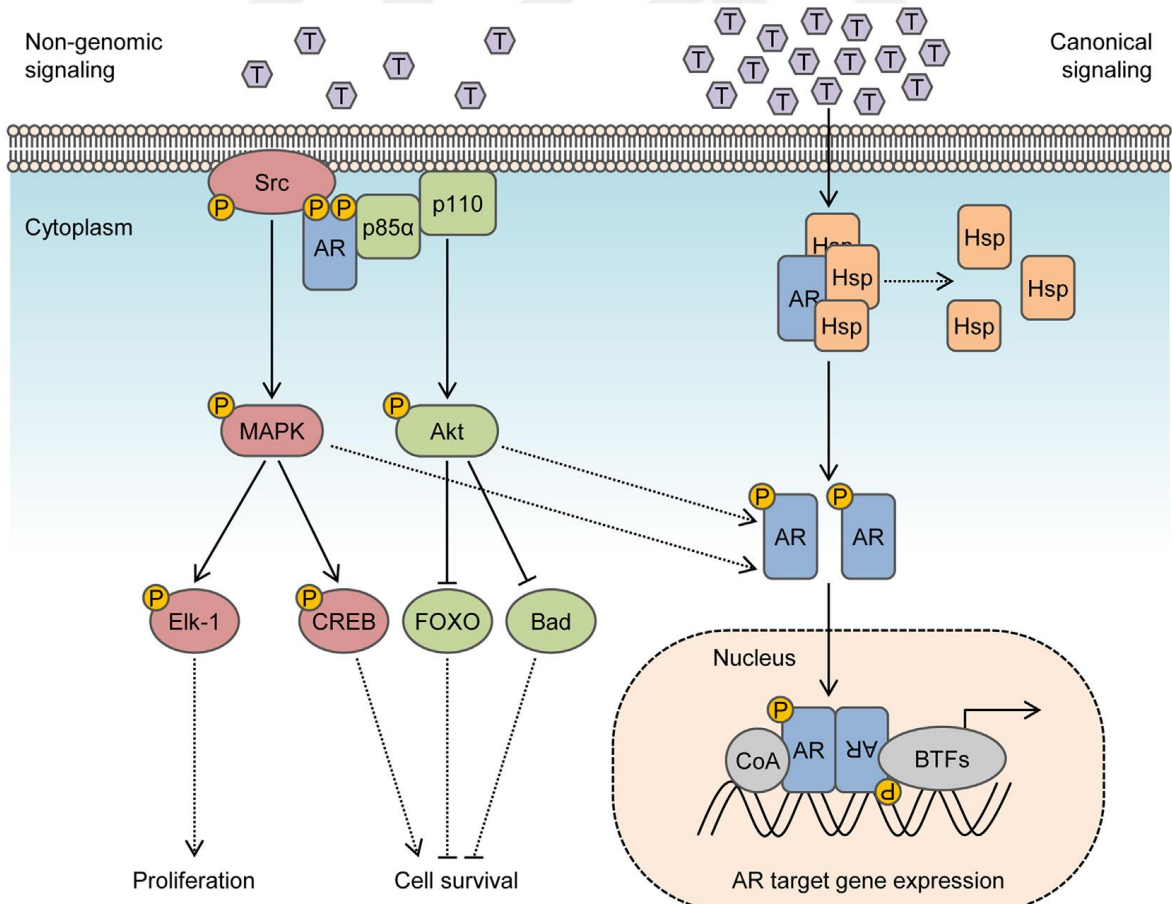
Androjen reseptörü (AR, NR3C4) X kromozomunun uzun kolundaki Xq11-Xq12 lokusunda yer alan AR geni tarafından kodlanan 919 aa uzunluğunda 110 kDa moleküler

ağırlığa sahip, nükleer reseptör süper ailesinin steroid hormon reseptörü alt ailesinin üyesi ligand bağımlı transkripsiyon faktörü olarak spesifik genlerin kontrolünü sağlamaktadır. Diğer nükleer reseptörlerde olduğu gibi AR 3 major fonksiyonel bölgeye sahiptir: N (amino)-terminal domain (NTD; 1-555 aa rezidüleri), karboksi terminal ligand bağlama domain (LBD; 555-623 aa rezidüleri), DNA bağlanma domain (DBD; 665-919 aa rezidüleri). LBD ile DBD'i birleştiren esnek menteşe bölgesi (hinge region; 626-664. aa rezidüleri) bazı kaynaklarda reseptörün 4. bölgesi olarak tanımlanmaktadır. DBD, AR'nin filogenetik olarak yüksek oranda korunmuş bölgesi olarak AR'nin promoter (DNA üzerinde transkripsiyonun başlatıldığı gen bölgeleri) ve enhancer bölgelerine (DNA üzerinde transkripsiyonun güçlendirildiği motifler) bağlandığı ve böylelikle LBD ve NTD stimülasyonuna yanıt olarak AR tarafından düzenlenen genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesi fonksiyonunu üstlenen kısmıdır. NTD'nin AF1 bölgesi (activation function 1, 142-485 aa bölgeleri), LBD'nin ligand bağımlı transkripsiyonel aktivitenin gerçekleştirilmesinden sorumlu ligandın bağlandığı cep kısmı dışında sahip olduğu AF2 (activation function 2) ve BF-3 (binding function-3) olarak isimlendirilen iki hidrofobik yüzey koaktivatörler ile etkileşim kurmakta ve dimerizasyondur (He ve ark., 1999; McEwan, 2004). LBD,

Androjen reseptör aktivitesi, doğal agonistleri olan erkek cinsiyet hormonları testosteron (T) ve dihidrotestosteron (DHT) reseptörün LBD'deki ligand bağlayıcı cebine bağlanması ile hücresel yanıtların transkripsiyonel olarak kontrol edildiği ve düzenlendiği konvansiyonel genomik düzeyde gerçekleştirilen aktivitesidir. Nongenomik aktivasyon olarak adlandırılan nonkonvansiyonel AR aktivitesi reseptörün sinyal kaskadlarını uarması ile ilişkilidir (Fischer ve Smieško, 2020; Jimenez-Panizo ve ark., 2019).

Sitoplazmada liganda bağlı olmadığı durumda AR monomeri kendisini degradasyondan koruyan HSP (ısı şok proteinleri) şaperon kompleksi (Hsp-90, Hsp-70 Hsp-40) ve diğer koşaperon proteinlerle kompleks halde hücre iskeletine tutunmaktadır. Hsp70 ve Hsp40 AR'nün ligandın bağlı olmadığı monomerik formunun inaktif konformasyon tutulmasını sağlayan moleküler şaperonlardır (Eftekharzadeh ve ark., 2019). Yukarıda özet olarak aktarılan AR sinyal yolağının konvansiyonel aktivasyonu şu şekilde gerçekleşmektedir: sitoplazmada şaperon proteinlerle kompleks halde bulunan AR, ligand bağlanması ile konformasyon değişimi ile birlikte bağlı olduğu proteinlerden ayrılmakta fosforile ve homodimerize olarak aktif hale geçmekte, edindiği protein-protein etkileşimi kabiliyeti ile hücre iskeleti proteini olan filamin A ile etkileşime girerek nükleusa transloke olmaktadır. AR nükleer translokasyon aşamasında sitoplazmada bağlı olarak bulunduğu

Hsp90'nın 89. pozisyonunda tirozin rezidüsünün protein kinaz A tarafından fosforilasyonu gerektiği, bu aşamanın inhibe edilmesi AR nükleus translokasyonu aşamasını bloke etmektedir (Dagar ve ark., 2019; Streicher, 2019). AR hedef genlerin enhancer ve promoter bölgelerinde yer alan androjen yanıt elementi (ARE, androgen response element) olarak adlandırılan spesifik tanıma dizilerine bağlanmakta ve gen ifade düzeylerini modüle etmektedir. AR'nin selüler fonksiyonlarını hedef genlerin transkripsiyonun düzenlenmesi aracılığıyla açıklayan kanonik yolda AR'nün etkinliğinde LBD hayati derecede önem taşımaktadır. LBD delesyonunun AR'nin androjenlere tamamen yanıtsızlığına neden olduğu gösterilmiştir (Dai ve ark., 2017). DNA üzerinden gerçekleştirilen kanonik aktivitesi dışında AR, henüz nükleusa transloke olmadan dahi androjenlerin LBD'ye bağlanmasıyla AR'nin konformasyonel değişimi ile edindiği protein-protein etkileşimi kabiliyetiyle sitoplazmik moleküler substratlar ve hücre membranının iç yüzündeki intraselüler kinaz kaskadlarını aktive edebildiği hücre proliferasyonu ve migrasyon üzerine etkide bulunduğu bilinmektedir (Heinlein ve Chang, 2002; J. K. Leung ve M. D. Sadar, 2017) (Şekil 1.9).



(Heinlein ve Chang, 2002; J. K. Leung ve M. D. Sadar, 2017). Düşük doz androjen seviyelerinde (picomolar konsantrasyonlar) AR'nin Src kinaz ve PI3-K'nın p85a düzenleyici subunitiyle etkileşime girmesi MAPK

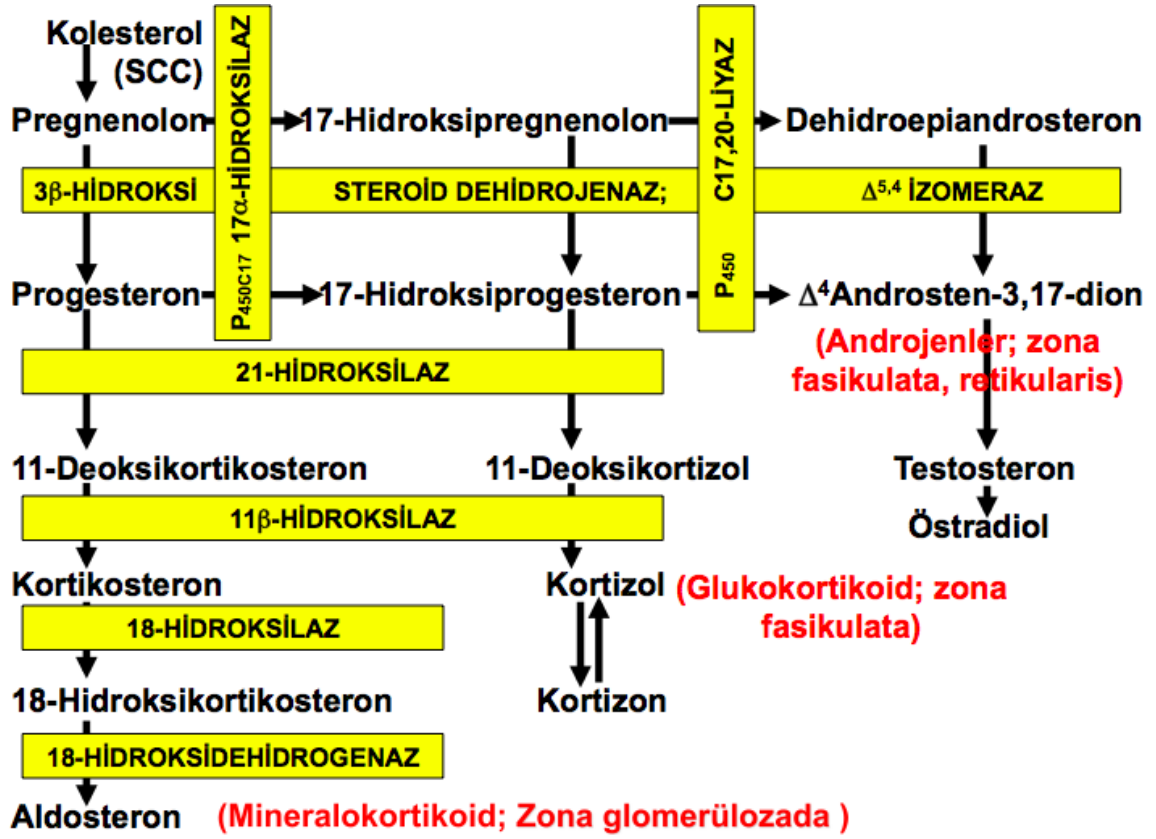
(mitogen activated protein kinaz) ve Akt sinyal yolağı aktivasyonuna neden olmakta ve nongenomik etkiyle hücre canlılık ve proliferasyonunu uyarmaktadır. Yüksek androjen seviyelerinde (nanomolar) ise AR, kanonik yol ile aktive olarak hedef genlerin ifade düzeylerine etki etmektedir. MAPK ve Akt'nin nongenomik sinyal yoluyla AR tarafından aktive edilmesi AR'nin ve transkripsiyonal koaktivatörlerinin fosforilasyonunu uyarak AR'nin genomik sinyalizasyonunu da arttırmaktadır.

Şekil 1.9. Kanonik ve nongenomik (ankonvansiyonel) androjen reseptör sinyalizasyonun entegrasyonu.

1.8. Adrenal ve Testiküler Steroidojenez ve Androjen Hormonları

Tüm steroid hormonların biyosentezinden sorumlu iki major fonksiyonel enzim sınıfı sitokrom P450 (CYP) ve hidroksisteroid dehidrojenaz enzimleridir (Schiffer ve ark., 2019). Hemoproteinlerden olan CYP enzimleri NADPH'nin elektron donörü olarak moleküler oksijene elektron transferinde yer almaktadırlar.

Adrenal korteks mineralokortikoidler, glukokortikoidler ve adrenal androjen prekürsörleri ve androjenlerin (yüksek primatlara özgü) sentezinde rol alır (Arlt ve ark., 2002; Cutler ve ark., 1978). Adrenal korteks zonal özgüllük gösteren biçimde steroidojenez enzimlerini 3 ayrı fonksiyonel zonda ifade etmektedir. Korteksin dış kısmındaki zona glomerulosa tabakasında aldosteron başta olmak üzere mineralokortikoidler sentezlenmekte, renin-anjiotensin-aldosteron sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Orta tabaka olan zona fasikulatada, kortizol başta olmak üzere glukokortikoidler sentezlenmekte hipotalamo-hipofizer-adrenal eksen (HHA; CRH→ACTH) ACTH ile kontrol edilmektedir. En içteki tabaka olan zona retiküleriste klasik androjen sentez yolu olarak adlandırılan Δ^5 yolunda dehidroksiepiandrosteron (DHEA), dehidroksiepiandrosteron sülfat (DHEAS), androstenedion (A4) ve 11 β -hidroksiandrostenedin (11OHA4)'i içeren C19 androjen prekürsörleri sentezlenmektedir ve HHA tarafından düzenlenmektedir.



Şekil 1.10. Adrenal korteks hormonları ve sentezlerinin şematik gösterimi.

Testiste (kadın cinsiyette over; gonadlar), steroid hormon sentezi, hipotalamo-hipofizer-testis aksı (HHT) tarafından düzenlenmekte ve gonadotropin serbestleştirici hormonun (GnRH) puberte döneminde hipotalamik sekreyonu ile başlamaktadır. GnRH, gonadlardan östrojen ve testosteron sentezinin uyarıcısı olan lüteinleştirici hormonun (LH) hipofiz bezinden sentezi ve sekresyonunu uyarmaktadır. Gonadal hormonlar negatif geri besleme ile GnRH ve LH sekresyonunu baskılamaktadır. Klasik androjen sentez yolu pregnenolonun CYP17A1 (17- α hidroksilaz) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla 17- α hidroksipregnenolonun sentezlenir. 17- α hidroksipregnenolon, CYP17A1 enziminin enziminin 17,20 liyaz aktivitesine ait substratı olup, 21 karbonlu prekürsör steroidlerden 19 karbonlu steroid hormon dönüşümünü sağlar. Bu aktivitenin gerçekleşebilmesi sitokrom b5 oksidoredüktaz (CYB5A) aktivitesini gerektirmekte, bu sebeple prepubertal dönem öncesinde enzim gen promotörü aktive durumda değildir.

Androjenler steroid yapıdaki cinsiyet hormonları embriyogenez, adölesan dönemdeki seksüel maturasyon ve yetişkinlikte sekonder seks karakterleri dahil erkek üreme fonksiyonu ve davranış paternlerinde erkek fenotipin gelişiminde esansiyel konumdadır. Androjenler ayrıca kemik, kas, beyin, deri, kalp, kan damarlar, kan ve yağ dokusu dahil

birçok diğer çevre dokularda fizyolojik ve patolojik durumlar dahil olmak üzere önemli fonksiyonlar üstlenmektedir. Kan dolaşımındaki miktarı en yüksek olan androjen olan testosteronun kaynağı hipotalamo-hipofizer-testis aksının kontrolünde sentez ve sekresyon gerçekleştiren testislerdeki Leyding hücreleridir. Dehidroepiandrosteron, androsetenediol ve androstenedion gibi diğer androjenler adrenal korteks zona retikülaris tabakasındaki hücreler tarafından sentez ve sekrete edilmektedir. Kan dolaşımına geçişleri sonrasında periferik bazı organlarda testosterona dönüştürülebilmektedir. Lipofilik yapıda olması dolayısıyla kan dolaşımında büyük oranda seks steroid bağlayıcı globüline bağlı halde bulunan testosteron (T) hormonun serbest formu aktif olarak ifade edilmekte, hedef doku ve organlarda hücrelere kolayca difüze olmaktadır. Testosteron intraselüler kompartmanda 5- α redüktaz enziminin (tip I veya II) katalizlediği reaksiyonla 10 kat kadar daha aktif formu olan dhidrotestosterona dönüştürülmektedir.

1.9. Prostat Kanseri Tedavisinde Hormonal Terapi Yaklaşımları

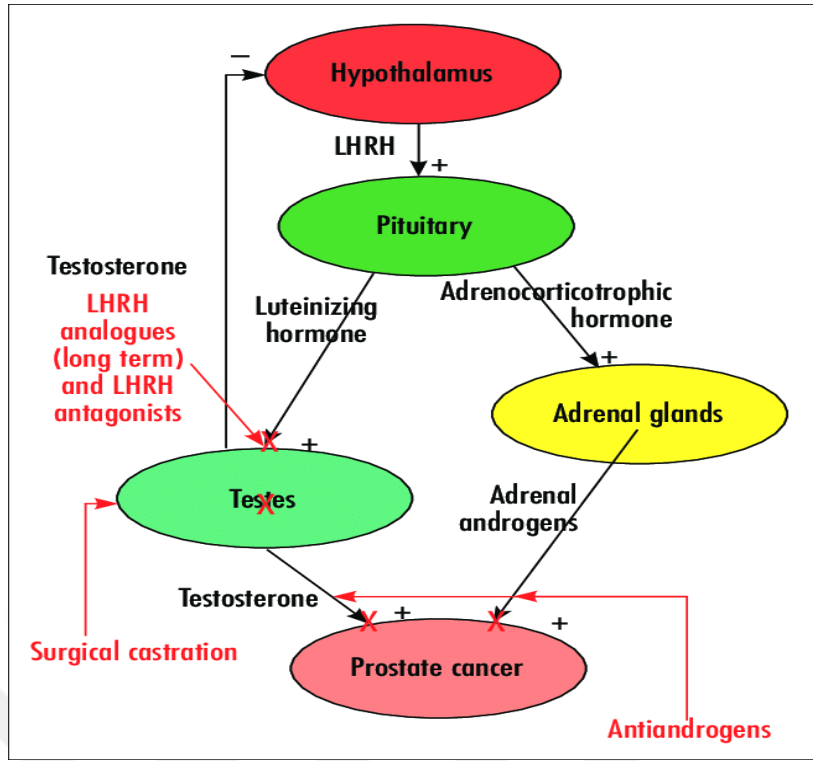
Androjen deprivasyonu testiküler androjenlerin sekresyonunu farklı şekillerde baskılanması ile gerçekleştirilebilmektedir. Maksimal (total/komplet) androjen blokajı, periferik kandaki androjen hormon düzeylerini baskılamada fonksiyon gösteren eski antiandrojen ilaçlarla hormonal aktiviteyi reseptör düzeyinde bloke eden ilaçların kombinasyonu ile elde edilmektedir (Pagliarulo ve ark., 2012).

1.9.1. Testosteron Düşürücü Terapiler (Kastrasyon)

Bilateral orşiektomi, testosteron fonksiyonlarının östrojenler üzerinden baskılanması (geçmişte dietilstilbestron ile gerçekleştirilen uygulamalarda venöz tromboemboli gözlemlenmesi ile arka planda bir tedavi modalitesidir), LHRH (Luteinizing-hormone-releasing hormone) agonistleri, günümüzde ADT uygulamalarının temelini oluşturmaktadır. LHRH sentetik analogu ilaçların depo formlarının hastalara enjeksiyonu ile uygulanmaktadır. Tedavinin ilk haftasında LH, FSH ve testosteron seviyelerinde yükselme ile seyreden testosteron surge fenomeni, prostat kanserinde alevlenmeye bağlı klinik etkilere (kemik ağrısı, akut mesane çıkış obstrüksiyonuna bağlı böbrek yetmezliği, spinal kord kompresyonu vd.) yol açabilmektedir. Antiandrojen ilaçlar 4 haftalık uygulaması ile flare-up fenomeninin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Ancak bu uygulamanın uzun vadede flare-up'ı önlemede yararı güçlü şekilde gösterilebilmiş değildir (Krakowsky ve Morgentaler, 2019). Kronik LHRH uygulaması LHRH reseptörlerini

azaltmakta, böylelikle LH, FSH ve testosteron seviyelerinde düşüş sağlanabilmektedir. Kastrat seviyelerine ulaşılması 2-4 haftayı almaktadır. Orşiektomi LHRH tedavisinden sağkalım açısından ek fayda sağlamadığı yüksek kalitedeki klinik çalışmalarla gösterilmiştir (Ostergren ve ark., 2017).

Tarihsel perspektifte (~40 yıl öncesi) testosteron ölçüm hassasiyetinin günümüz seviyesinde olmamasına bağlı olarak plazma total testosteron seviyelerinin kastrat seviyesi olarak kabul edilen 50 ng/dL altına düşürülmesi antihormon tedavilerin temel hedefi olarak uygulanmıştır. Cerrahi kastrasyon gerçekleştirilen olgularda ortalama testosteron seviyelerinin 15 ng/dL olduğunun immün ölçüm teknolojisinde kaydedilen ilerlemeler ve monoklonal antikorlar geliştirilmesi ve dahası LC-MS/MS ile steroid hormon düzeylerinin yüksek hassasiyetle ölçülebilir olması sonrasında gösterildiği günümüzde cerrahi veya medikal kastrasyon modaliteleri ile plazma testosteron seviyelerinin <20 ng/dL hedeflenmekte olduğu ifade edilse de çoğunlukla <50 ng/dL seviyeleri klinik çalışmalar dahil birçok durumda kastrat seviyesi olarak referans alınmaya devam etmektedir (Gomella, 2009). Abirateron asetat ile birlikte enzalutamid, yeni nesil androjen reseptör aksını hedefleyen ajanlar (ARAT, androgen receptor-axis-targeted agents) olarak dosetaksel tedavisine refrakter PK'de standard tedavi modalitesi olarak klinik kullanım onayı almıştır. Bunun yanı sıra enzalutamid, apalutamid ve darolutamide, androjen reseptör yolağını hedefleyen (ARTA, androgen receptor pathway targetting agents) yeni nesil terapötikler sınıfında değerlendirilmektedir (Miyake ve ark., 2021). LHRH reseptör antagonisti ilaçlar (degarelix), LHRH agonistlerinde olduğu gibi ilaç etkinliğinin başlaması için 2-4 haftalık bir süreye ihtiyaç göstermemekte, flare-up fenomenine neden olmamaktadır. Buna karşılık 1 aylık depo form haricinde uzun süreli tedavi sağlayan depo formülasyonları bulunmamaktadır. FDA tarafından PK'de kullanım onayı alan GnRH (onadotropin-releasing hormon) antagonisti relugolix oral alınabilen bir ilaç olarak, kardiyovasküler yan etki açısından LHRH agonisti leuprolide karşı üstün olduğu gösterilmiştir (Shore ve ark., 2020).



Şekil 1.11. Hormon terapide kullanılan ajanların etki mekanizmalarının şematik gösterimi.

1.9.2. Antiandrogenler

Peroral ilaçlar olarak kimyasal yapılarına göre iki sınıfa ayrılan ilaç grubudur. Steroid yapısındaki bu ilaçlar hidrokspirogesteron türevidir: siproteron asetat (CPA), megestrol asetat ve medroksiprogesteron asetat; non-steroid yapıdaki ilaçlar: flutamide, bicalutamid ve nilutamiddir. Androjenlerle reseptör seviyesinde yarışmalı inhibisyon gerçekleştirmektedirler.

1.9.3. Apalutamid (ARN-509)

DHT ile AR LBD için yarışmalı inhibisyona girerek antitümöral etkinlik sergileyen ilaç grubunun (antiandrojenler) ilk üyelerinden flutamid ve bicalutamid ile ADT'ye yanıt alınamayan KDPK'li ve/veya progrese hastalığa sahip olguların çoğunda AR'den bağımsız tümör dönüşümü gerçekleşmemiş olup edinilen farklı şekillerdeki direnç mekanizmaları (AR gen amplifikasyonu, ko-aktivatörler-AR ilişkisini reseptörün genomik etkinliğini arttırıcı yönde değişimi, AR protein aşırı ifadenmesi ve AR LBD'nin ligand spesifitesinde azalmaya neden olan mutasyonların reseptörün DHT/T dışı moleküllerle de uyarılabilir duruma gelmesi) neticesinde AR sinyal yolağı aktivitesinde artış ile tümör büyüme ve çoğalmasında AR'ye gereksinimin sürdüğü gösterilmiştir (Moilanen ve ark.,

2015). Birinci nesil antiandrojen ilaçlara yanıtızsızlıkla ilişkili AR nokta mutasyonları tümör hücrelerinde parsiyel agonist olarak AR aktivasyonunu uyarmasıyla yeterli klinik etkinlik sergileyememesi sonrasında diariitihidantoininden türetilen çok sayıda molekülü içerecek şekilde yürütülen çalışmaların başarıya ulaşmasıyla, AR'ye bağlanma konusunda yarıştığı fizyolojik ligandı olan DHT'ye göre bağlanma afinitesi 1/30'u kadar olan bikalutamide nazaran çok daha yüksek bağlanma afinitesine sahip nonsteroidal AR inhibitörü ilaçlar [enzalutamid (MDV3100), apalutamid (ARN-509), darolutamide (ODM-201) vb.] geliştirilmiştir (Clegg ve ark., 2012; Halabi ve ark., 2021; Tran ve ark., 2009). Yeni nesil antiandrojenler olarak isimlendirilen bu ilaçlar bikalutamidin KDPK'de parsiyel agonist etki ile AR'ye bağlanması ve AR'nün nükleer translokasyonu, transkripsiyonel aktivitesi, AR kodlayan gen ifadesinin artışı ve prostat kanser hücre proliferasyonunu uyarıcı yönde etkilerinden arındırılmış ve androjen hormonların reseptör etkinliklerini tüm süreçlerinde inhibe eden, çok daha potent şekilde AR'ye bağlanan ilaçlardır (Zurth ve ark., 2019).

Konvansiyonel ADT ile kombine edilen apalutamidin nonmetastatik KDPK olgularında hastalığın uzak organ tutulumu gerçekleştirerek ilerleyişini %72 oranında azalttığı, plasebo grubunda (ADT+plasebo) metastazsız sağkalımı medyan değeri 16,2 ay iken, apalutamid tedavisi alan grupta 40,5 ay olduğu, ölüm riskini %22 oranında azalttığı SPARTAN çalışmasıyla ortaya konmuştur (Lotan ve ark., 2020; Smith ve ark., 2021; Smith ve ark., 2018).

1.9.4. Androjen Reseptör Sinyalizasyonu ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres ve AR sinyalizasyonun karşılıklı etkileşim göstererek prostat kanseri gelişim ve kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK) dönüşümü ve hastalık progresyonunda kritik önemdeki rolü yaygın şekilde bilinmektedir (Shiota ve ark., 2011). Oksidatif stresin, tümörögenez ve PK progresyonuna sunduğu katkının önemli bir bölümünü AR sinyalizasyonundaki aktivite artışının oluşturduğu düşünülmektedir. PK'de selüler redoks dengesinde gözlemlenen aberan veya uygunsuz değişimler bu düşüncüyü destekleyen hususlardan biridir. Ayrıca ADT, AR sinyal yolağının tümör hücrelerinde DNA oksidasyon hasarı tamir yanıtları dahil redoks homeostazisini sağlayan antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğinde düşüşle oksidatif stresi tetiklediği ve ayrıca ADT'ye bağlı gelişen diğer doku ve organlardaki advers etkilerin (osteoporoz, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalık) patogeneğinde yatan biyokimyasal mekanizmanın AR sinyalizasyonun blokajına bağlı oksidatif streste yaşanan artışla ilişkili

olduğu düşünülmektedir. ADT bağlı oksidatif stresteki artışın reaktif oksijen türlerinin üretiminde azalmayı da sağlayan antioksidan moleküllerle baskılabileceği, bu yöndeki terapötik yaklaşımların tümör başlangıç, gelişim, progresyon ve ayrıca KDPK dönüşümü dahil tüm süreçlerinde yer alan oksidatif stres ve diğer yönden de ADT'ye bağlı oksidatif stresteki artışın önüne geçilebileceği yönündeki tedavi modalite arayışlarına temel teşkil etmektedir.

ADT'de kısa süre içerisinde gelişen kastrasyon dirençli prostat kanseri (KDPK), tedavide karşılaşılan temel sorunlardan biridir. KDPK gelişiminde AR bağımsız ve bağımlı olmak üzere iki temel mekanizma tanımlanmıştır: KDPK tümör biyolojisinde meydana gelen adaptif değişimler intraselüler androjen seviyelerinin yükselmesi (intrasek steroidogenezi—androjen sentezi) ve ligand konsantrasyonundaki azalmaya yanıt olarak AR ligand duyarlılığının reseptör miktarının artırılarak sağlanması şeklindedir (Montgomery ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar neticesinde KDPK'nde etkili ikinci nesil antiandrojen ilaçlar kullanıma girmiştir. Abiratreon asetat + prednisolone (AAP) ve enzalutamid metastatic KDPK olgularında kullanım için FDA onayı almıştır. Ayrıca AAP, enzalutamid ve apalutamid metastatik hormon sensitif prostat kanserinde kullanım için FDA onayı almıştır. Son olarak apalutamid, darolutamid ve enzalutamide, non-metastatik KDPK'nde kullanım onayı almıştır. Abirateron asetat, CYP17 enzim inhibitörü (17 α -hidroksilaz ve 17,20-liyaz inhibitörü) ilaç olarak tümör içi intakrin androjen sentezi ile adrenal kortekste sentezlenen androjenlerin üretimini bloke etmektedir. Abirateron asetat ilaca bağlı hiper aldosteronizmin gelişmesini önlemede sağladığı fayda nedeniyle prednizolon ile kombine edilmesiyle intraselüler testosteron seviyeleri güçlü şekilde düşürmektedir.

Apalutamid, darolutamid, enzalutamid, bicalutamide göre AR'ye afiniteleri oldukça yüksektir. Bicalutamid, AR nükleer translokasyon sürecini bloke edememekte, bu tarafıyla AR için parsiyel agonist ilaç etkinliği göstermektedir. Yeni nesil antiandrojenler (ARTA, New androgen pathway targeting agents), AR'nin nükleer translokasyonu ve DNA üzerinde transkripsiyonun düzenlenmesi süreçleri dahil AR genomik aktivitesinin de blokajını sağlamaktadır (Chong ve ark., 2018; Moilanen ve ark., 2015).

1.9.5. Anti-Hormon Terapi Direnci

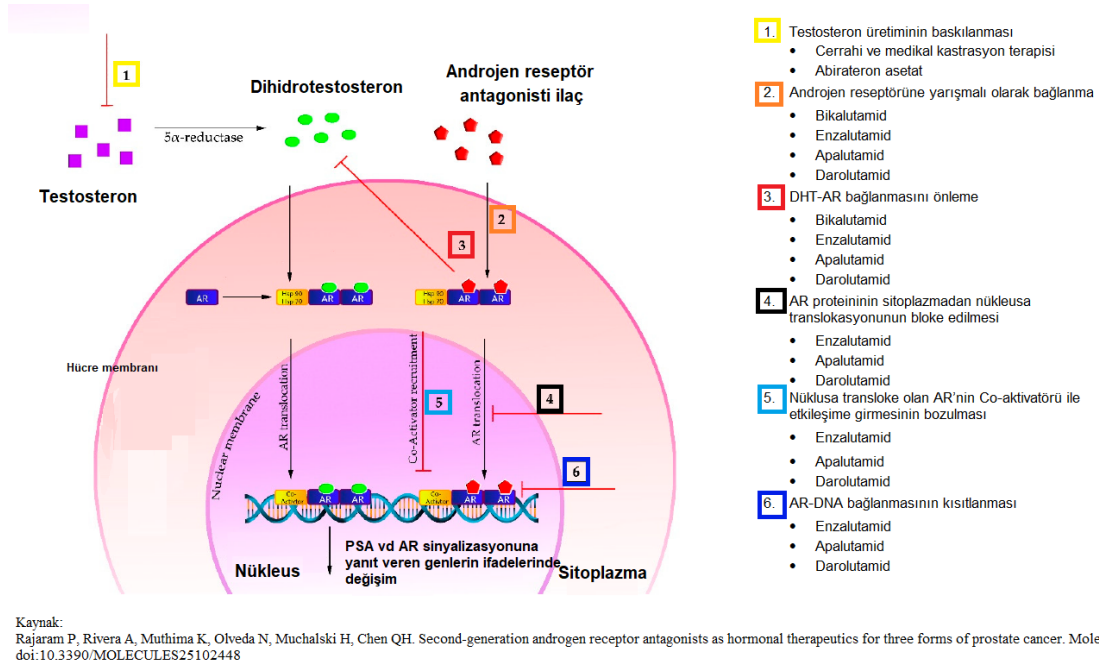
AR'ünün LBD üzerinden yarışmalı inhibitör etkinlik gösteren nonsteroid yapıda yeni nesil antiandrojen ilaç olan apalutamid 2019 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)

tarafından klinik kullanım onayı almıştır.

Radikal prostatektomi öncesi prostat kanser olgularında 3 ay süresince neoadjuvan androjen deprivasyon tedavisi (ADT) uygulamasının etkilerinin araştırıldığı randomize kontrollü klinik çalışmalardan elden edilen verilerin özetlendiği Cochrane derlemesinde, neoadjuvan ADT tümör evresinde düşüş, pozitif cerrahi sınırda azalma ve pozitif lenf nodu sayısında azalma sağladığı gösterilmiştir. Bu klinik faydaların ADT 8 aya kadar uzatılmasıyla artış sağlandığı bildirilmektedir. Buna karşın bu tedavi modalitesi PSA relapssız sağkalım ve de kanser spesifik sağkalımda iyileşme sağlamadığı bu sebeple standart bir tedavi olarak neoadjuvan ADT'nin uygulanmaması önerilmektedir.

Yapılan çalışmalar, androjen deprivasyon tedavisinin, normal prostat epitelyal kompartmanlarında minör hücre gruplarından olan, prostat karsinogenezi ile birlikte malign lezyonlarda miktarında artış gözlemlenen, tümörogenisite ve hormon refrakter büyüme ile doğrusal ilişki gösteren nöroendokrin hücrelerde artışı indüklediği ve prostat epitelinde nöroendokrin transdiferansiasyona neden olduğu gösterilmiştir (Yuan ve ark., 2006).

Snail transkripsiyon faktörü (TF), hücre adezyon moleküllerinden e-cadherin miktarında düşüğe (hücre membranından sitozole göçü uyarır), mezenkimal markerlarda ise (vimentin, n-cadherin) artışa neden olarak epitelyal mezenkimal transizyonu (EMT) indüklediği bilinmektedir. LNCaP hücrelerinde nöroendokrin diferansiasyonun (NED), snail TF ile düzenlendiğini gösteren bir çalışmada, NED'in hormon dirençli agresif tümör karakterini uyardığı, bunun yanı sıra farklı hücresel süreçlerle: tümörogenezi (tümör hücre migrasyonu ve metastatik potansiyel için önemli bir gösterge olan EMT ve indüklenmesi yanı sıra parakrin mekanizmalarla hücre proliferasyonunu) desteklediği bildirilmektedir.



Şekil 1.12. Androjen reseptörü ligand bağlayıcı bölgesini (LBD) hedefleyerek AR sinyal yolağının inhibe eden farklı antiandrojen ajanlarının etki mekanizmalarının şematik gösterimi.

İkinci nesil antiandrojen ilaçların keşfi ve enzalutamidin 2013 yılında PK tedavisinde kullanım onayı almasıyla birlikte hızlı şekilde KDPK'nin birinci ve ikinci basamak tedavisinde abirateron ve kabazitaksel ile yarışır konuma gelmesi AR'nin LBD bölgesinde meydana gelen mutasyonların ve splice varyantlarının gelişimi enzalutamid direncinin ortaya çıkışı ve dirençli olgu sayısında artışa yol açmıştır. Bu durum, hali hazırda onkoloji pratiğinde PK tedavisi için kullanımdaki terapötik ajan repartuarını genişletme amacını taşıyan ilaç geliştiricilerde alternatif arayışlarını beraberinde getirmiştir (Martinez-Ariza ve Hulme, 2015). Antiandrojen tedavilere karşı gelişen ilaç direncinde etkili olan moleküler mekanizmalar şu şekilde listelenebilir:

1. AR amplifikasyonu, overekspresyonu ile çok düşük miktarlardaki androjenin AR aktivitesi için yeterli olması (AR duyarlılığında artış),
2. AR mutasyonları ile ligand spesifitesini yitirmesi ile ortamdaki farklı moleküllerle (östrojenler, progestin, adrenal androjenler, glukokortikoidler ve AR antagonistleri) androjene ihtiyaç göstermeden aktive olabilmesi (AR ligand binding domain gain-of-function mutasyonu) (Buchanan ve ark., 2001),
3. Tümör hücre içerisinde intakrin androjen üretimi (intratümöral steroidogeneizde artış),
4. Nükleusa transloke AR'nin DNA bağlanmasında aracılık eden co-aktivatörlerin overeksprese olması (veya co-aktivatörlerle etkileşerek AR-ligand kompleksinin

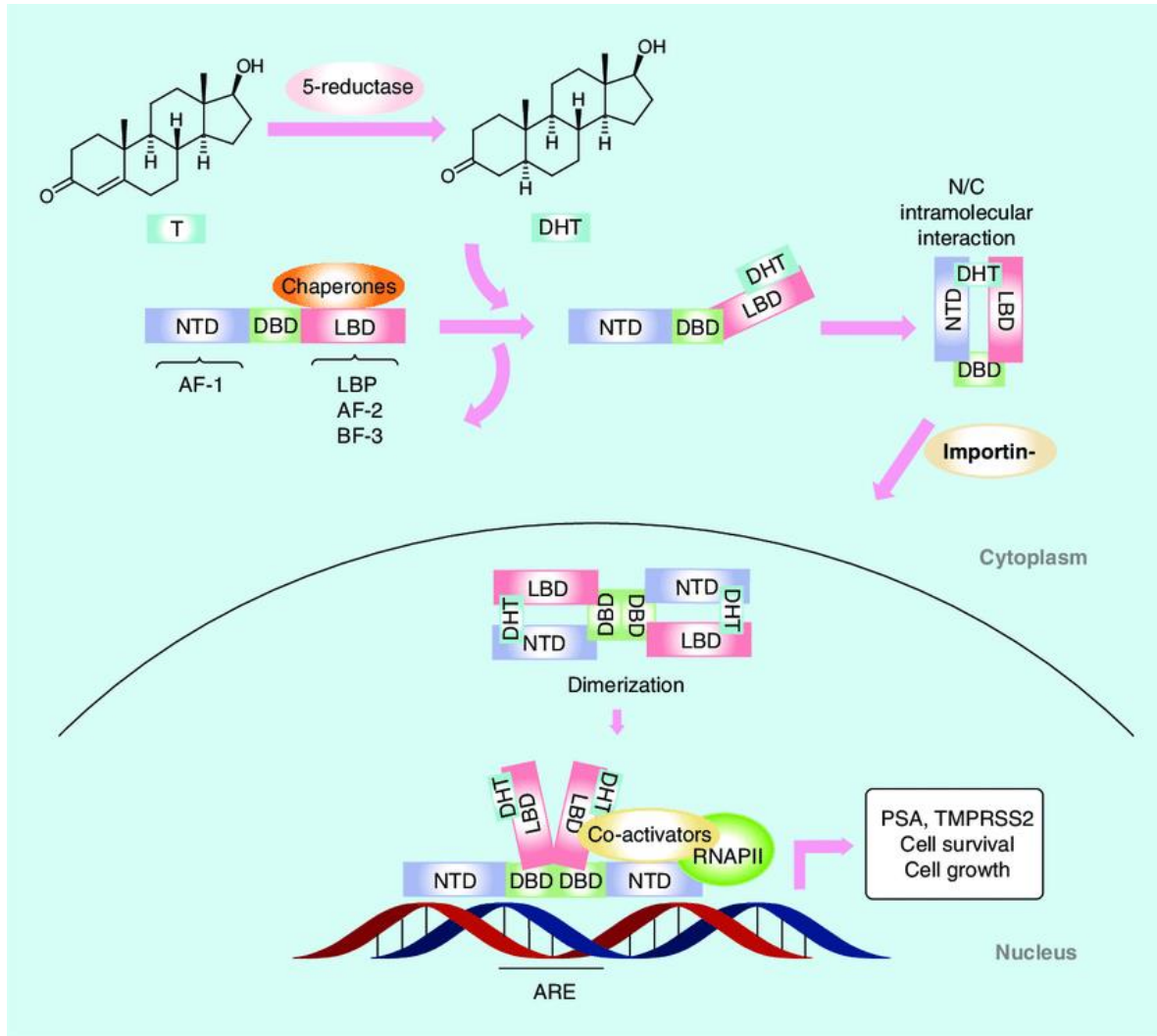
DNA'daki transkripsiyonel aktivitesini arttıran AR N terminal domain bölgesi mutasyonları) ve düşük androjen düzeylerinde dahi AR transkripsiyon aktivitesinin tümör progresonu için yeterli seviyede olmasının sağlaması,

5. Androjen hormonunu ligand kabul eden konvansiyonel AR aktivasyon yolunun dışındaki (ligand bağımsız), alternatif AR aktivasyon yolunun etkisi (çeşitli büyüme faktörleri ve intraselüler sinyal yolları ve sitokinlerin etkin olduğu ankonvansiyonel AR aktivasyonu yolu) (Debes ve Tindall, 2004),
6. Yapısal olarak aktif AR mRNA splice varyantlarının gelişimi (ligand bulunmaksızın yapısal aktif AR varyantları) ile glukokortikoid reseptör ifadesinde artış, PTEN, p53 gibi tümör baskılayıcı genleri etkileyen mutasyonlar, prostat adenokarsinoma hücrelerinde epitelyal-mezenkimal transizyonda artış ve nöroendokrin transdiferansiasyon göstermeleri, selüler adaptif yanıtlar: katlanmamış protein yanıtı, otofaji, tümör mikroçevresinde yer alan immün hücrelerin protümöral etkileri CRPC dönüşümünde rol oynayan mekanizmaların belli başlıcalarıdır. Bu mekanizmaların mekanistik yönleriyle aydınlatılması ile sürece etki eden faktörlerin ortadan kaldırılması AR sinyalizasyonun prostat kanseri tedavisinde kritik öneme sahip bir hedef olmasını ve antiandrojen ilaçların etkinliğinin devamını sağlayacağı düşünülmektedir.

Hormon refrakter PK olarak adlandırılan yeni nesil AR antagonistleri dahil hormonal terapiye yanıt vermeyen tümör aşamasında, mevcut antitümöral yaklaşımların tedavi başarısı henüz istenen seviyede değildir. Enzalutamid tedavisi her ne kadar KDPK olgularında ortalama yaşam süresini ekstra 4,8 ay kadar artış sağlıyor olsa da nöroendokrin diferansiasyonu (NED) indüklemesi yoluyla bir takım istenmeyen etkilere sebep olabilmektedir. Nöroendokrin prostat kanseri (NEPK) olgularından elde edilen hücrelerle gerçekleştirilen fare ksenograft modelinde gerçekleştirilen preklinik çalışmada lncRNA-p21'in (kodlamayan RNA-p21) yüksek miktarlarda ifade edildiği, bu bulgunun, hücre hattı ve insan klinik örnekleriyle gerçekleştirilen analizlerdeki sonuçlarla uyumlu olduğu gösterilmiştir. Bu veriler ışığında NEPK ve enzalutamid tedavisi alanlarda yüksek ifadelenen lncRNA-p21'in kanser progresyonu ve ilaç direnciyle ilişkili neden olabileceği düşünülmektedir. Yeni nesil antiandrojenler olarak isimlendirilen ilaç grubundaki ajanlar, AR'nin hormon ligandı bağlama bölgesine (ligand binding domain, LBD) bağlanarak oluşturdukları inhibisyona ek AR transkripsiyon faktörünün hormon yanıt elemanı olarak bağlandığı DNA dizisini değiştirerek farklı bölgelere bağlanmasına, EZH2 fonksiyonunun histon-metiltransferazdan non-histon metiltransferaza değişimine yol açar. Bu durum ise

STAT3'ün metilasyonu ile epigenetik olarak aşağı yönde düzenlenmesi ile NED desteklemektedir. Nöroendokrin prostat kanser hücrelerinden elde edilen ksenograft modeliyle farelerde gerçekleştirilen Preklinik çalışmalar EZH2 inhibitörü ilaçların Enzalutamidin neden olduğu nöroendokrin diferansiasyonu bloke ettiğini göstermiştir. Bu bulgular Enz/AR/lncRNA-p21/EZH2/STAT3 sinyal yolağını hedeflemenin KDPK progresonunun önlenmesinde daha başarılı tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Luo ve ark., 2019).

Diğer taraftan farklı kanser türlerinde tedavi direnci, hastalık nüksü ve metastazda önemli rol oynayan kanser kök (stem, progenitör) hücreler, primer tümör dokusunda hücre popülasyonunun küçük bir kısmını oluşturmaya karşın pluripotensleri (kendilerini sonsuz sayıda yenileyebilme ve farklı hücrelere dönüşebilme kabiliyeti) nedeniyle son dönemde üzerinde önemle durulan hususlardan biridir. Normal prostat dokusunda bazal ve lüminal tabakalarda lokalize prostat kök hücreler onkojenik transformasyon için hedef hücreler olarak düşünülmekte, prostat kanseri kök hücrelerinin (PCSCs, prostate cancer stem cells) gelişiminde rol oynadıkları düşünülmektedir (Mei ve ark., 2019). Prostat kanserinde PTEN kaybı karsinogenezin önemli ön aşamalarından biri olmasına karşın tümör hücrelerinin metastatik kabiliyet edinimleri için yeterli değildir. PTEN kaybı ile diğer önemli tümör baskılayıcı genlerden RB1 ve TP53'ün inaktivasyonu özellikle metastazlarda ve KDPK'de gözlemlenmekte, moleküler olarak hücre adezyonunda temel olan e-cadherin kaybına yol açarak EMT artışı ile metastazın uyarılmasında rol oynamakta ve tümör hücrelerinde kanser kök hücreye gidişte önemli bir aşama olan plastisitenin ediniminde önem taşımaktadır (Arima ve ark., 2008; Jiang ve ark., 2011).

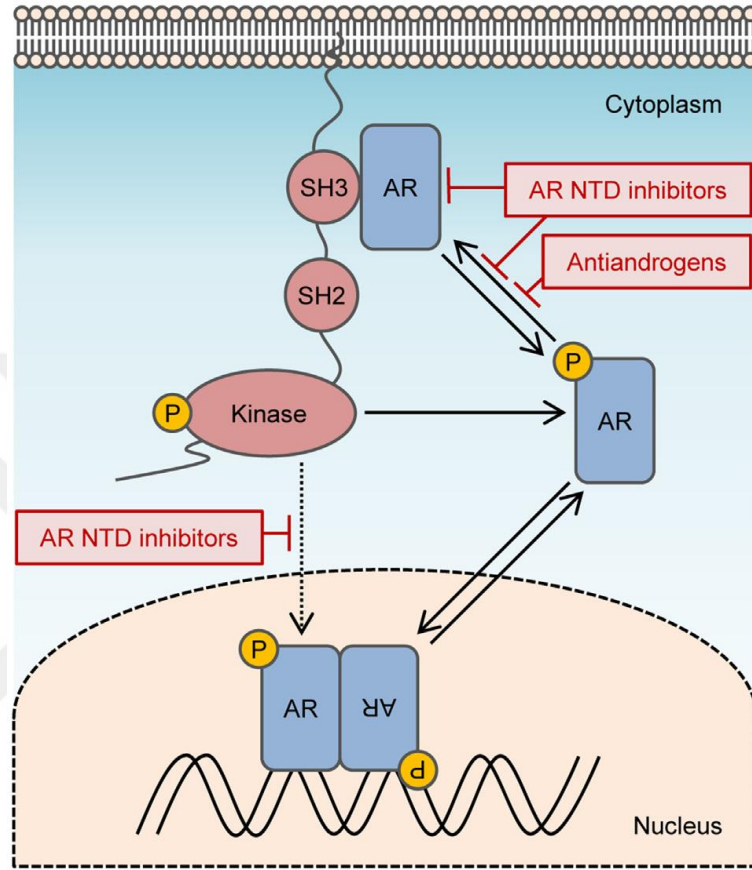


AF-1: Activation function 1; AF-2: Activation function 2; ARE: Androgen response element; BF-3: Binding function-3; DBD: DNA binding domain; DHT: Dihidrotestosteron; LBD: Ligand binding domain; LBP: Ligand binding pocket; NTD: N-terminal domain; PSA: Prostat spesifik antijen; RNAPII: RNA polimeraz II; T: Testosteron; TMPRSS2: Transmembrane protease serin-2.

Şekil 1.13. Kanonik androen reseptör sinyal yolağı ve N-terminal bölgesinin terapötik hedef bölgeleri.

AR NTD (N-terminal domain) bölgesini hedefleyen terapötiklerin, tümör büyümesini nükleusa translokasyona ihtiyaç göstermeksizin uyaran AR'nin nongenomik sinyalizasyonunu bloke edebileceği düşünülmektedir. Günümüzde AR'nin NTD bölgesinin AF1 (Activation function 1) kısmına bağlanan ve transaktivasyonu önlediği gösterilen Sintokamid A ve EPI olarak isimlendirilen iki kimyasal ailesinin keşfi gerçekleştirilmiş durumdadır. Her iki ajanın, enzalutamide dirençli-KDPK fare ksenograftinde tümörde gerileme sağladığı gösterilmiştir. Bu ajanların AF1'in ayrı kısımlarına bağlandıkları ve bu şekilde etki mekanizmaları farklılık taşıdığı nükleer manyetik rezonans spektroskopisi analizleriyle gösterilmiştir (Banuelos ve ark., 2016). Bu ajanlar AR'nin protein-protein

etkileşimlerinin önüne geçerek sitoplazmik sinyal yollarında nongenomic AR aktivasyonunu durdurabildiği, transkripsiyon preinisiyasyon kompleksinin TFIF ve CREB-bağlayan proteinin AF1 ile; AR'nin Src ile; yine tam boyuttaki AR'nin STAT3 ile etkileşimini önlediği gösterilmiştir (Andersen ve ark., 2010; Banuelos ve ark., 2016).



Şekil 1.14. Androjen reseptörü N-terminal bölgesini (n-terminal domain (NTD)) hedefleyerek AR sinyal yolağının intefere eden ajanlarının etki mekanizmalarının şematik gösterimi.

Metastaz kabiliyeti kazanan prostat kanser hücrelerinin intratümöral de novo steroidogenez ile T ve DHT üretimi gerçekleştirebildikleri gösterilmiştir (Locke ve ark., 2008; Titus ve ark., 2005). Yine ikinci nesil antiandrojen ilaçların nükleusa transloke durumdaki AR-Hsp27-ligand kompleksinin kendi genomik etkilerini gerçekleştirdiği gen promoterındaki ARE (androgen response element) dışında örneğin glukokortikoid reseptör yanıt elemanlarına bağlanarak farklı bir genomik etkinlik sergileyebildiği bu yönüyle antiandrojen ilaçların daha önce ifade edildiği gibi bir ölçüde parsiyel agonist etkinlik gösterdiği ifade edilmektedir.

1.9.6. Metastatik KDPK'de Birinci Basamak Kemoterapi Yaklaşımları

Konvansiyonel androjen depreviasyon yaklaşımlarının (LHRH analogları), kastrasyon dirençli tümör aşamasında da sürmesini, mevcut tedavi yaklaşımlarının gerçekleştirildiği klinik çalışmaların androjen süpresyonu altında gerçekleştirildiği gözönünde bulundurularak ve düşük yan etki profilleri dolayısıyla kullanımları önerilmektedir.

Abirateron asetat ve prednizolon kombinasyon tedavisi: Kemo naif asemptomatik veya hafif düzeyde semptomatik mKDPK (viseral organ metastazları değerlendirme dışında tutulmuş) olguların dahil edildiği faz III COU-AA-302 çalışmasında etkinliği değerlendirilen bu terapinin hasta sağkalımlarında belirgin artış sağladığı ve ayrıca >75 yaş popülasyonda da etkin olduğu gösterilmiştir (Roviello ve ark., 2016; Ryan ve ark., 2013).

Dosetaksel ve prednizolon kombinasyon tedavisi: Temel etki mekanizması mikrotübüllere bağlanarak stabilize etmekte ve dinamik birleşme-ayırışma süreçlerini engelleyerek mitoz içciklerinin oluşumu ile hücre bölünmesini ve mitozu inhibe etmesi şeklindedir (Nader ve ark., 2018). Yaş, başlı başına dosetaksel tedavisi için kontrendikasyon oluşturmaktadır. Metastatik PK'li olguların dahil edildiği, 50 ay medyan takip süresine sahip GETUG-AFU randomize kontrollü çalışmanın sonuçlarına göre ADT ile dosetaksel kombinasyonunun hasta sağkalımında artış sağladığı bildirilmektedir (Gravis ve ark., 2013). Bir metaanaliz çalışmasında, erken başlanan dostetaksel ADT kombinasyon terapisi (taksan bazlı kemohormonal terapi) tek başına ADT'ye göre kansere bağlı ölümlerde azalma sağladığını [HR (%95 güven aralığında): 0,77 (0,68-0,87)] gösterilmiştir (Sathianathen ve ark., 2018). Birinci basamak kemoterapide dosetaksel ve prednizolon kombinasyonunun, tmitoksanton prednizolon kombinasyon terapisine göre medyan hasta sağkalımında 2,9 aya kadar artış ve hastalık kliniğinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir (Tannock ve ark., 2004).

PARP inhibitörleri: PARP [Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)] enzimini bloke ederek tek zincir DNA hasar tamir yolu (single strand break repair pathway) aktivitesinin blokajını sağlar. BRCA mutasyonu olan tümörlerde (holomolog rekombinasyon tamir mekanizmasının etkinliğinin önlenmesiyle) çift zincir DNA kırık tamiri de aktivite göstermemesi ile tümör hücreleri onkojenik genler dahil yoğun DNA mutasyonları ile apoptoza yönlendirilmiş olur. PARPi BRCA1 mutasyonu olan, hızlı proliferasyon gösteren tümör hücrelerinde daha etkilidir (Gui ve ark., 2019; Jannetti ve ark., 2020).

İmmün kontrol noktası inhibitörleri (Immune check point inhibitors): antijen sunucu hücrelerin (APC, antigen presenting cells) B7-1/B7-2 ve T hücrelerindeki CTLA-4 immün

kontrol noktası proteinleri immün sistemin anahtar düzenleyici molekülleridir. B7-1/B7-2 CTLA-4'e bağlı olması T hücrelerini inaktif durumda kalmasına neden olmaktadır. İmmün kontrol noktası inhibitörleri (anti-CTLA4 antikoru) ile T hücrelerinin aktif hale gelerek kanser hücrelerini öldürmesini olanaklı kılmaktadırlar (Claps ve ark., 2020; Venkatachalam ve ark., 2021). FDA onaylı immün kontrol noktası inhibitörleri, CTLA4, PD-L1 (programmed death ligand 1), PD-1 (programmed cell death protein 1) proteinlerini hedeflemektedir. Kanser hücrelerinde PD-L1 yüzey proteinlerinin yüksek ifadenmesi T hücre yanıtlarını baskılayıcı etkinlik göstermektedir. PD-L1 ile PD-1 proteinlerinin etkileşiminin inhibisyonunu amaçlayan bu yaklaşımda T hücrelerinin tümör hücrelerinin ölümü indüklenmesi hedeflenmektedir.

Protein kinaz B inhibitörleri (AKT inhibitörleri): PTEN kaybına bağlı olarak (metastatik KDPK'de %40-60 PTEN kaybı bulunmaktadır) kanser hücre büyümesi için anahtar konumda yer alan PI3K/AKT sinyal yolunun aktive olması ile tümör progresyonu ve agresif tümör karakterinin uyarıldığı, hastalık kötü prognozuyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca AR sinyal yoluyla AKT sinyal yolu karşılıklı çapraz düzenlemeye sahiptir. Birinin inhibe edilmesi diğer sinyal yolunu aktive etmektedir (Chen ve ark., 2016; Ha ve ark., 2011; Nelson ve ark., 2007).

Sipuleucel-T: KDPK tedavisi için geliştirilen ilk immünoterapi modalitesi olan bu tedavi otolog dentritik hücre tedavisi şeklinde özetlenebilir. Dentritik hücreler antijen sunucu immün hücrelerin başlıcalarından olup, T hücrelerin antitümöral fonksiyonlar sergilemesi için esansiyeldir. PK'de hücre membran dış yüzeyinde ifade edilen tümör ilişkili antijenler [PAP (prostatic acid phosphatase), PSA ve PSMA (prostate-specific membrane antigen)] immünoterapinin temel hedefleri oluşturmaktadır (Kantoff ve ark., 2010; Small ve ark., 2006).

1.10. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi (TM), malign, non-malign hücreler ve ekstraselüler matriksten oluşan dinamik bir ortamdır. Tümör hücreleri ile karşılıklı etkileşim içerisindeki TM hücresel bileşenleri ile tümör progresyonuna katkıda bulunmaktadır. Tümör ilişkili makrofajlar (TAMs, Tumor associated macrophages), CD8⁺ sitotoksik T lenfositler, Treg hücreleri (regulator T cells), myeloid derive süpresör hücreler (MDSCs, myeloid-derived suppressor cells), tümör ilişkili nötrofiller (TANs, tumor-associated neutrophils), dentritik hücreler (DCs dendritic cells), fibroblastlar ve vasküler endotel hücreleri gibi birçok farklı

hücre tipini barındırmaktadır. TAM'lar, çoğu kanser türünde, TM'nin baskın immün hücre tipini oluşturmakta ve hastalık kötü prognozuyla ilişkilendirilmektedir. Dinamik yapıdaki tümör mikroçevresinde en önemli değişimlerden biri TAM'ların iki zıt karakterini temsil eden M1 ve M2 makrofajlara polarizasyonudur. Makrofajların M1 ve M2 polarizasyonlarında çevresel etkiler belirleyici rolde olup, bu iki makrofaj alt grupları, çift taraflı dönüşebilir (switch) immün hücre özelliğindedir (Malekghasemi ve ark., 2020).

1.11.1. Enflamatuvar Tümör Mikroçevresi ve Prostat Kanseri

İntraprostatik enflamasyon prostat karsinogenezi için diyet, kimyasal toksinlerin hücre hasarı ve mikrobiyomdaki değişimle birlikte önemli bir risk faktörüdür. İntraprostatik enflamasyon, immün hücrelerin epitel hücrelerinde oksidatif stresi tetikleyerek DNA çift zincir kırıklarına yol açmakta ve androjen reseptör aktivasyonunu tetiklemektedir. Hücre senesensi (senescence) ilişkili sekretuar fenotipin oluşması ile local enflamatuvar fırtına durumunun gelişimi ile serbest radikallere bağlı ek DNA hasarı gelişmektedir (de Bono ve ark., 2020). Yoğun DNA hasarı ile DNA tamiri ve tümör baskılayıcı genlerin aşırı ekspresyonu tetiklenmekte, bu durum ise mutajenlere duyarlılığa yol açarak karsinogenez sürecini başlatan germline DNA tamir gen defektlerinin akselerasyonuna neden olmaktadır.

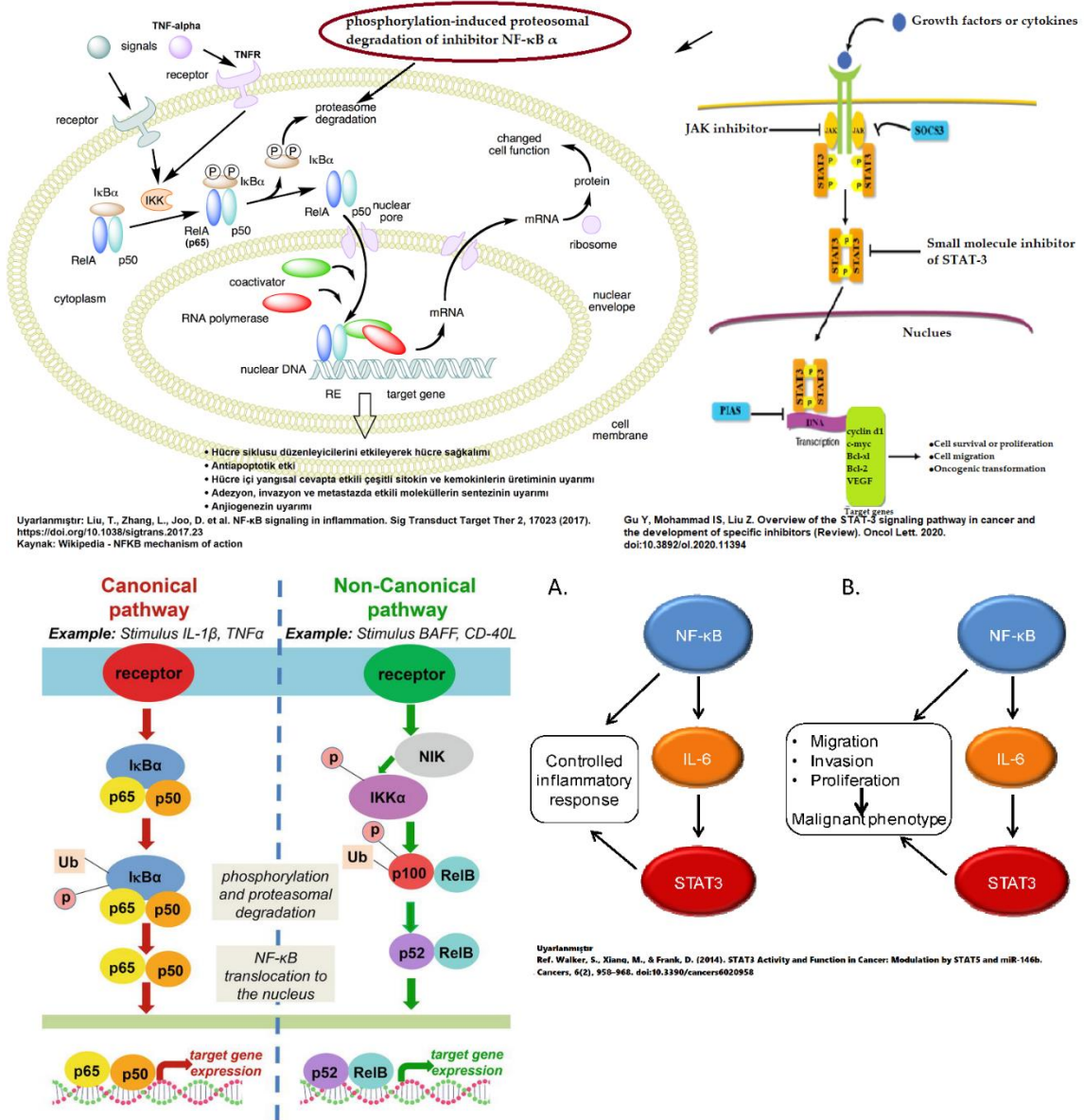
Tümör mikroçevresinin, birçok yönden kanser tedavisinde karşılaşılan güçlüklerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2018). Çoğunlukla, iskemik olan bu alanda birçok immün sistem hücresinin [doğal öldürücü hücreler (NK, natural killer), makrofajlar, CD8⁺ sitotoksik T hücreleri ve Treg (regulator T hücresi)] infiltrasyonu söz konusudur. Kan monositlerinden köken alan makrofajlar doku içerisinde immün yanıtı düzenlemesinde oynadığı role ek tümör hücresi ile girdiği çift taraflı etkileşimle hastalığın gidişatına yön verici olabilmektedir.

Tümör mikroçevresinde kanser hücresi üzerine birbirine ters yönde etkinlik gösteren makrofaj hücreleri yer almaktadır. Bu hücrelerin faaliyetleri (salgıladıkları sitokinler vd.) kanser ilerleyişinde önemlidir. Hücre içi enflamatuvar süreçler ve sitokinlerin prostat kanserinde androjen reseptöründen bağımsız yol üzerinden kanser progresyonunda rolü olduğu gösterilmiştir (Stark ve ark., 2015).

Androjen yoksunluk tedavisi (ADT) ileri prostat kanseri olgularında başlangıçta etkili olsa da, zaman içerisinde kaçınılmaz şekilde kastrasyona dirençli prostat kanseri (KDPK) gelişimi ile neticelenmektedir. Sitokinler, AR'nin liganddan bağımsız aktivasyonunu

destekler. KDPK olgularında özellikle IL-6 uyarımının AR sinyal yolağında önemli uyarıcı etkililik sergilediği gösterilmiş olup, plazma IL-6 seviyesi yüksekliği hastalık progresyonu arasındaki ilişki ve devamında IL-6 inhibitörü ilaçla PK olgularının tedavi yanıtlarının incelendiği randomize kontrollü klinik çalışmada beklentilerin aksine başarılı klinik sonuçlar elde edilememiştir (Dorff ve ark., 2010). KDPK dönüşümü ve tümör biyolojisine ilişkin sahip olunan bilgilerin hastalığın moleküler temellerinin bütünü anlaşılmaması için henüz yetersiz kaldığı açıktır.

Kronik enflamasyonun, farklı etki mekanizmaları (örn. membranda lokalize reseptör tirozin kinaz, Jak/STAT-3, NF- κ B vd. onkojenik sinyal yolları uyarımı) ile karsinogenezi desteklediği bilinmektedir. Epigenetik modifikasyonla enflamasyonun uyardığı aberran DNA metilasyonun tümör progresyonunu desteklediği bildirilmektedir. Enflamatuvar sitokinlerin en bilinenlerinden olan IL-6'nin PK'de tümör progresyonunda rol oynadığı, AR aktivitesini stimüle ettiği, apoptozis, terapi direnci ve hücre diferansiasyonu üzerine pleotropik etkilerle tümör hücre proliferasyonu ve sağkalımını desteklediği bilinmektedir (Attar ve ark., 2009; Corcoran ve Costello, 2003; Wegiel ve ark., 2008). Dahası taksan grubu ilaçlar ve/veya ADT'ye dirençli KDPK olgularında hastalık ilerleyişinin önlenmesinde başarılı standart ikinci basamak terapötik yaklaşımlar konusundaki sorunlar, karsinogenezdeki farklı moleküler hedeflerin antikanser tedavi stratejileri açısından değerlendirilmesi amacını taşıyan çok merkezli faz 2 çalışmasında, bir kez kemoterapi (taksan grubu veya mitoksantron) almış metastatik KDPK'li olgularda monoklonal IL-6 antikoru olan siltuksimabın klinik etkinliği araştırılmıştır. Primer sonlanımı PSA düzeylerinde %50'den fazla azalma olarak belirlenen, medyan takip süresi 14,8 ay olan ve çalışmaya dahil edilenlerde plazma sitokin ve büyüme faktör düzeylerinin de ölçülerek terapiye yanıtlarının izlendiği çalışmada, progresyonsuz medyan hasta sağkalımlarının 1,6 ay; çalışmaya dahil olan olguların tümünde sağkalımın 11,6 ay olduğu, 40 hastadan sadece ikisinde PSA yanıtı alınabilirken, >12,5 pg/ml plazma IL-6 seviyeleri saptanan olgularda sağkalım oranlarının kötü olduğu gösterilmiş ve IL-6 antikor tedavisi alan 38 olgunun 32'sinde CRP düzeyleri azalırken, plazma IL-6 düzeylerinin 250 kattan fazla yükseldiği tespit edilmiştir (Dorff ve ark., 2010). Daha önceki klinik çalışmalarda CNTO 328 ile IL-6 sinyal yolağı blokajının AKT sinyal yolağı süpresyonu ile antitümöral etkinlik gösterebileceği düşünülürken, PK'de beklentilerin dışında ilacın tümör progresyonuna yol açtığına ortaya konmasıyla bu ajanın mKDPK tedavisinde monoterapi veya kombinasyon terapisinde yeri olmadığı gösterilmiştir (Fizazi ve ark., 2012; Hunsucker ve ark., 2009).



Şekil 1.15. Enflamasyonla uyarılan NF-κB ve STAT-3 sinyal yollarının şematik gösterimi.

1.11.2. Tümör İlişkili Makrofajlar (Tumor associated macrophages, TAMs)

Ekstraselüler alana sekrete ettikleri içeriğin gerçek zamanlı analizi ile M1 ve M2 polarize makrofajların metabolik karakterizasyonları gerçekleştirilebilmektedir. Spesifik metabolik sinyal yollarındaki farklılık dolayısıyla makrofaj alt gruplarının ayrımının gerçekleştirilmesi klinik karar verme süreçleri açısından önem taşımaktadır. M1 polarize makrofajlar pro-enflamatuar özellikler sergilemekte ve klasik aktive makrofajlar olarak adlandırılmaktadırlar. Alternatif olarak aktive olan makrofajlar olarak adlandırılan M2 makrofajlar IL-4 ile uyarılmaktadırlar. M2 makrofajlar anti-enflamatuar özellikte olup

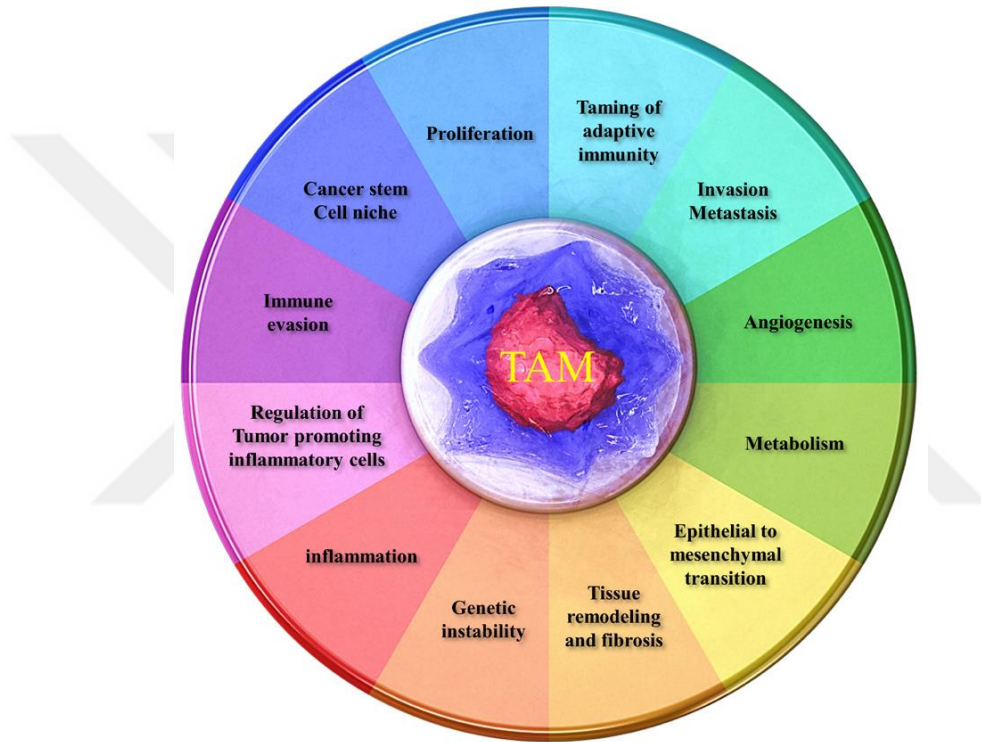
M2a, M2b, M2c ve M2d olmak üzere farklı alt gruplarda sınıflandırılmaktadırlar (Van den Bossche, Baardman, & de Winther, 2015). M2 polarize makrofajlar, CD163, CD200 R1, MMR/CD206'yı yüksek ifade ederken, MHC sınıf II antijenleri ve Arjinaz I'i (ARG1) düşük seviyede ifade etmektedir.

1.11.3. M1 ve M2 Polarize Tümör İlişkili Makrofajlar

Prostat kanseri tümör mikroçevresinde bulunan tümör ilişkili makrofajların (TAMs) M1 ve M2 tipinde polarizasyonu ve farklılaşmalarının hastalık progresyonu, tedavi etkinliği ve direnç gelişimi ve prostat kanserinde prognoz üzerine etkili olabileceği yönünde birçok farklı çalışma bulunmaktadır (JiaWei ve ark., 2021; Nonomura ve ark., 2011; Yuri ve ark., 2015). Genel olarak ifade edildiği şekliyle M1 polarize makrofajlar pro-enflamatuar özellikler sergileyen ve bu etkinlikleri ile antitümöral hücreler olarak bilinmekte ve klasik aktive makrofaj tipi olarak tanımlanmaktadır. Diğer taraftan immünmodülasyon, anjiojenez, ilaç direnci gelişimi, yara iyileşmesi ve rejenerasyonu, doku remodeling (yeniden düzenlenmesi), EMT ve metastatik potansiyelde artış ve dahası tümör mikroçevresinin anti-enflamatuar metabolik etkileriyle immünsüpresif karaktere sahip olması yönündeki düzenleyici rolüyle protümöral TAMs'lar olarak karakterize edilen M2 polarize TAMs'ların farklılaşması Th2 sitokinler aracılığıyla gerçekleşmektedir (Mantovani ve ark., 2013). İnterlökin 4 (IL-4) M0 nonpolarize makrofajların M2 polarize makrofajlara farklılaşmasına aracılık eden anti-enflamatuar özellikler sergileyen sitokindir. IL-4, IL-13, IL-10, IL-33 ve TGF- β sitokinleri ile uyarılan makrofajların M2 hücre tipinde polarize oldukları ifade edilmektedir (Porta ve ark., 2015; Wang ve ark., 2014). M2 polarize makrofajlar, alternatif olarak aktive olan makrofaj hücreleri olarak ta adlandırılmaktadır. Bulundukları çevreye sekrete ettikleri IL-10, TGF- β , IL-8 ve IL-6 gibi sitokinlerin aracılık ettiği anjiojenez, nöroendokrin transdiferansiyasyon ile EMT artışı yönündeki etkileri dolayısıyla tümörögenezi destekleyici etkiler dolayısıyla tümör mikroçevresindeki makrofaj infiltrasyonunda görece fazlalıkları PK'de hastalık kötü gidişatıyla ilişkilendirilmektedir. Dahası progrese PK olgularının periferik kan örneklerinde IL-4 sitokin düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Özellikle M2 polarize TAMs'lardan yoğun şekilde tümör mikroçevresine sekrete edilen IL-4'ün AR'nin androjenlere olan ligand affinitesini arttırdığını, IL-4 sitokinini yoğun eksprese eden LNCaP hücrelerinde, parental hücrelerin aksine bikalutamidin AR sinyalizasyonunu bloke edemediği, DHT uyarısına hücre büyümesine olan etkisinin IL-4 ile güçlendirildiği ve

dahası androjenden bağımsız tümör büyümesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Aynı modelin prelinik olarak araştırıldığı çalışmada, araştırmacılar kastrasyon uygulanan farelerde tümör büyümesinin devam ettiğini bildirilmektedirler (Lee ve ark., 2008).

Ayrıca, enflamatuvar uyarımla aktifleşen Nf-kB sinyal yolağının kastrat seviyelerindeki androjen varlığında dahi AR aktivasyonunu uyardığı bilinmektedir (Şekil 1.15). Nf-kB sinyal yolağı, organizmadaki tüm hücre tiplerinde bulunan, enflamatuvar yolak başta olmak üzere çok sayıda farklı selüler yanıtların düzenlenmesinde merkezi konumdaki transkripsiyon faktörü (TF) özelliğindeki sinyal yolağıdır.



(Malekghasemi ve ark., 2020).

Şekil 1.16. Tümör ilişkili makrofajların tümör biyolojisine etkilerinin şematik gösterimi.

1.11. Prostat Kanseri ve Oksidatif Stres

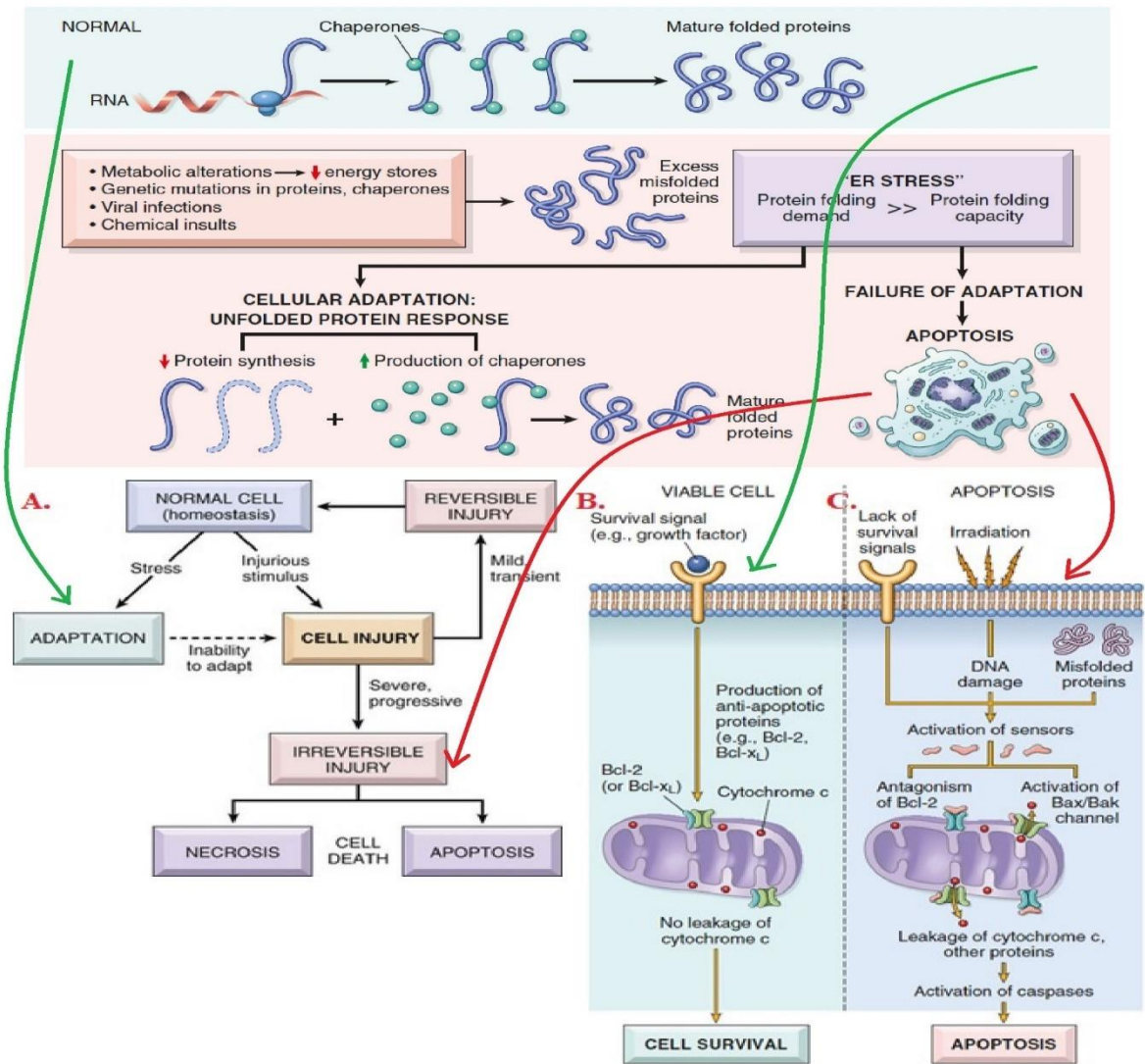
Bilimsel çalışmalarla elde edilen kanıtlar, selüler oksidatif hasarın, başlıca hücre membranı yapısındaki lipidler ile protein ve DNA (nükleer ve mitokondriyal) molekülleri üzerine olan kalıcı nitelikteki etkilerle meydana geldiğini göstermektedir. Mutajenik oksidatif DNA baz hasarının yaşla birlikte artış gösterdiği prostat dokusunda, prostat kanseri insidansındaki artışla paralellik göstermektedir. Mitokondriyal oksijenli solunum sırasında açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin fazla miktarda üretimi, ekzojen ve çevresel genotoksinlerin neden olduğu selüler redoks dengesini bozan yoğunlukta ROT maruziyeti

gibi farklı birçok etkenin oksidatif DNA hasarında artışa neden olmaktadır. Ayrıca antikanser kemoterapötikler ve iyonize radyasyon, ROT artışı ile genotoksik stres oluşturmaktadır. Oksidasyon hasarına uğramış DNA lezyonları [başlıca oksidatif DNA hasarı ve karsinogenez 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine veya 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG veya 8-OHdG); 8-hydroxyadenine (8-oxoA) ve 5-hydroxycytosine (5OHC)], DNA baz eksizyon tamiri mekanizması ile kalıcı bir defekte neden olmadan düzeltebilirken, detoksifikasyondan sorumlu enzim düzeylerindeki dalgalanmalar veya DNA tamir genlerindeki bozukluklar oksidatif strese olan hücre duyarlılığını arttırmakta, onkojenik aktivasyon ve/veya tümör baskılayıcı genlerde mutasyonun gerçekleşmesi ile karsinogenez süreci tetiklenmektedir (Scott ve ark., 2014; Trzeciak ve ark., 2004). DNA hasarı ile birlikte hücrelerde hasarın tanınması, uygun yanıtların oluşturulması için selüler stres yanıt ağına aktarımı (iletimi) ve nihayetinde hasar tamir yanıtı (DDR, DNA damage response) olarak isimlendirilen bir süreç başlatılır. DNA hasar yanıtı/tamir yolları: yanlış eşleşme eksizyon tamiri (MMR, mismatch repair), baz modifikasyonlarının düzeltilmesinde, baz eksizyon tamiri (BER, base excision repair); zincirde çapraz bağlantılar ve timidin dimerlerinin düzeltilmesinde, nükleotid eksizyon tamiri (NER, nucleotide excision repair); DNA tek zincir hasarı tek zincir annealing (SSA, single strand annealing); ve transkripsiyon ile ilişkili, transkripsiyonla eşleşen tamir (TCR, transcription coupled repair) şeklinde sınıflandırılmaktadır. ROT ilişkili DNA hasarı, DNA çift zincir kırığına yol açmasıyla DDR aktifleşir. DDR, homolog rekombinasyon tamiri (HRR, Homologous recombination repair), homolog olmayan eklenti sonu (NHEJ, Non-homologous End Joining), mikrohomojoloji kaynaklı eklenti sonu (MMEJ, Microhomology Mediated End Joining) ve fankoni anemisi tamir kompleksi (FA, Fanconi Anaemia repair complex) şeklinde isimlendirilen diğer hasar tamir ağlarının etkinleştirilmesinde rol oynamaktadır (Goldstein ve Kastan, 2015; Srinivas ve ark., 2019). Diğer taraftan oksidatif DNA hasarına karşı gelişen tamir yanıtında OGG1 (8-Oxoguanine DNA glycosylase 1) önemli rol oynayan bir enzim olup, hasara bağlı gen ifadelerinde artış yaşanmaktadır, bu artış 8-OHdG düzeyleri ile güçlü korelasyon göstermesi dolayısıyla oksidatif DNA hasarının gen düzeyinde izlenmesinde yararlanılmaktadır (Ji ve ark., 2013; Whongsiri ve ark., 2019).

Fizyolojik ve patolojik koşullar altında, metabolik süreçler reaktif oksijen türleri (ROT) ($\text{OH}^\cdot$, H_2O_2 ve $\text{O}_2^\cdot$) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) (nitrojen dioksit, dinitrojen trioksit ve nitrojen peroksit) oluşumuna neden olmaktadır. ROT/RNT düzeylerindeki artış geleneksel şekilde doku incinmesi ve/veya hücre hasara neden olan dejeneratif bir süreç olarak

düşünülmektedir. Stres uyarının süresi ve şiddetinin, hücre stres yanıtlarının bir bütün olarak belirleyici olacağı biçimde geri dönüşümsüz hücre hasarında hücre ölümü ve apoptozis; geri döndürülebilir hücre hasarında adaptif selüler yanıtlar, hücre sağkalımını mümkün kılmaktadır (Şekil 1.22). Onkogen aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcı genlerde mutasyon olduğu durumlarda karsinogenez sürecini oluşturan moleküler tetik mekanizması aktive olmaktadır.

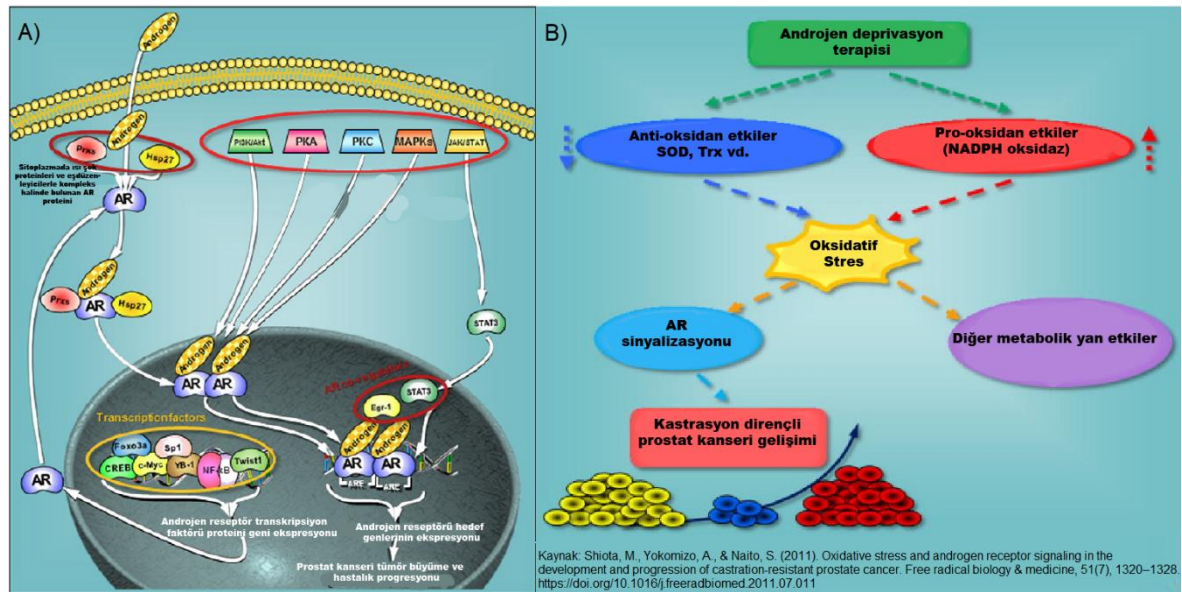
DNA hasar tamir yanıtıyla ilgili çalışmalarda yoğun şekilde yer verilen bir protein olan ve genomun güvenlik bekçisi şeklinde de tanımlanan H2A.X, DNA hasarı ile birlikte 139. pozisyonundaki serin kalıtlarından (rezidü) fosforile olmakta ve DNA çift zincir kırık tamirinin DNA üzerinde başlatılmasında fonksiyon göstermekte ve DDR bileşenlerinin çoğuyla ortak hareket ederek hasarın iyileştirilmesinde görev almaktadır (Fernandez-Capetillo ve ark., 2004; Rogakou ve ark., 1998).



(Vinay Kumar, 2015) A. Geri döndürülebilir hücre hasarı, adaptif selüler yanıtlar, hücre adaptasyonun sağlanması. B. Büyüme sinyalleri, anti-apoptotik sinyallerin baskın durumda olması ve mitokondriden sitokrom c sızıntısının durması ile hücre canlılığının sağlanması. C. Büyüme sinyallerinin yokluğu veya hücre hasarına yol açan faktörün geri döndürülemez seviyedeki DNA hasarı ve/veya katlanmamış protein miktarında artışa neden olması, adaptif selüler yanıtların hücre sağkalımını mümkün kılacak restorasyonu gerçekleştirememesi ile aktifleşen kaspazlarla hücrenin apoptoza gidişi.

Şekil 1.17. Hücre hasarı, adaptasyon, hücre sağkalımı ve apoptozis süreçlerinin şematik gösterimi.

Ancak, ROT/RNT geniş yelpazede fizyolojik ve patolojik hücre süreçlerine (hücre proliferasyonu, hücre siklus progresyonu, antiapoptotik mekanizmalar, invazyon, metastaz ve anjiogenez) katılmaktadır. Bu hücre süreçleri ise prostat kanseri patogenezinde (prostat karsinogenezi, prostata kanseri progresyonu) rol oynamaktadır. Prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengeyi bozan faktörler, prostat kanserine sebebiyet veren oksidatif stres ve oksidasyon hasarının artışına neden olmaktadır (Şekil 1.23). Yaş, ırk ve aile öyküsü prostat kanserine neden olduğu kanıtlanmış risk faktörleri arasında iken, androjenler, enflamasyon, diyet ve yaşam tarzı potansiyel risk faktörleri olarak önerilmektedir. Oksidatif stresle ilişkilendirilebilen PK için risk faktörleri olarak tanımlanan bu hususlar aynı zamanda oksidatif stres-prostat kanseri bağlantısını da oluşturmaktadır.



(Shiota ve ark., 2011). Oksidatif stres, çeşitli intraselüler sinyal sistemleri ve sarmal yollarını (transkripsiyon faktörleri: NF-KB, c-myc, twist-1, Foxo3a vd.; AR eş düzenleyicileriyle intraselüler yollarlar) aktive ederek AR sinyal yolağını uyarmaktadır.

Şekil 1.18. A) Prostat kanserinde oksidatif stres ile aktive olan sinyal yollarının şematik gösterimi. B) Androjen deprivasyon tedavisi, oksidatif stres, AR sinyalizasyonu ve KDPK gelişimi arasındaki ilişkinin şematik gösterimi.

Mitokondriyal biyoenerjetikler -NADPH oksidaz (Nox) kompleksi [Nox1-5 ve dual oksidaz (Duox1/2)], ksantin oksidaz, siklooksijenaz (COX) selüler mikroçevre ortamından kaynaklanan durumlar (örn. hipoksi) endojen ROT üretiminin önemli kaynaklarıdır. Endojen RNT üretimi ise nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından oluşturulan NO'nun ROT ve metallerle etkileşime girmesi sonucu gerçekleşmektedir. Hücreler, sahip oldukları antioksidan savunma mekanizmaları ile ROT/RNT ve oksidatif stres düzeylerinin artışına karşı korunmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı antioksidan bileşikler ve redüktan tampon sistemleri, bunun yanı sıra antioksidan enzimler: SOD (süperoksit dismutaz), katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler organizmada antioksidan savunma sistemlerinden bazılarıdır. Ayrıca bazı transkripsiyon faktörleri oksidatif strese yanıt olarak redüksiyon/oksidasyon (redoks) dengesinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Antioksidan savunma mekanizmalarında önemli düzenleyici fonksiyonlar üstelenen transkripsiyon faktörlerinden bazıları, Nrf2 (NF-E2-related factor 2), NF-κB (nuclear factor-κB) ve AP-1 (activator protein 1) şeklindedir. Bu proteinler redoks homeostazisinin devamını sağlamaktadır (Shiota, 2021).

Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan selüler yollara ilişkin genlerin tümör hücrelerindeki transkripsiyon düzeyleri yoğun oksidatif stres maruziyetine bağlı olarak yukarı düzenlenmiş durumdadır (Perillo ve ark., 2020).

1.11.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller

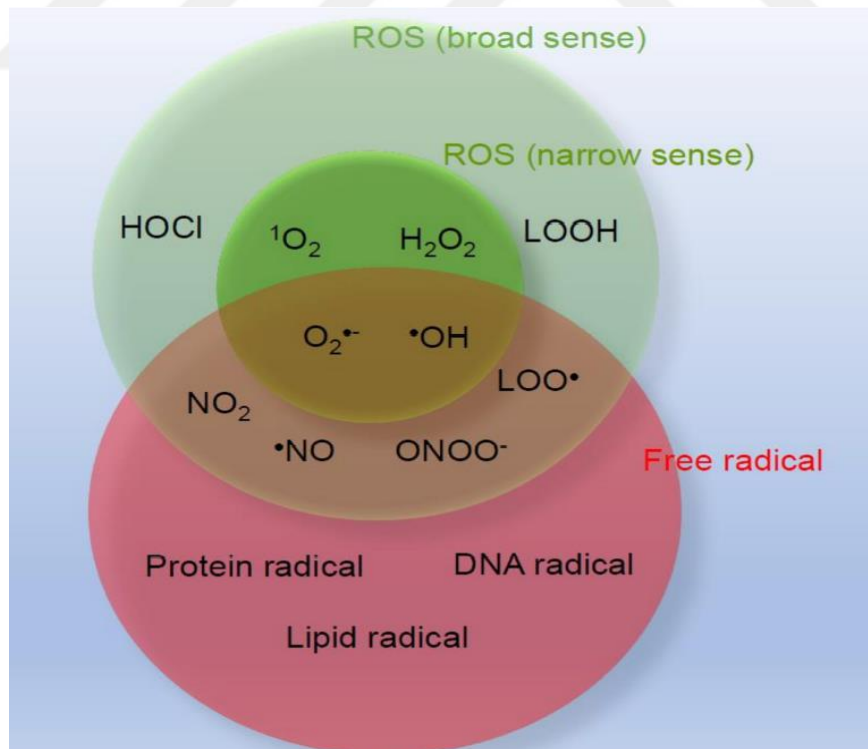
Ayrıca transkripsiyon faktörü olan NF-κB proteini çeşitli kanserlerin başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynadığı düşünülen anahtar bir moleküldür. Fizyolojik koşullarda NF-κB proteini enflamatuar süreçlerde yer alır. Hücre döngüsü ile sağ kalımını düzenler. Normalde sitoplazmada inaktif durumda tutulur. Sinyalin alınması ile inhibitör proteini fosforile edilerek parçalanır ve serbest kalarak aktifleşen NF-κB molekülü sitoplazmadan çekirdeğe taşınır. Çekirdeğe taşınan NF-κB proteini hedefi olan genlerin transkripsiyonunu uyarır.

Reaktif oksijen türleri (ROT) normal metabolizma ve ksenobiyotik maruziyeti sonucu açığa çıkan, yüksek reaktiviteye sahip, hücrede moleküler oksijenin tam olmayan redüksiyonuyla oluşan oksijen içeren moleküllerdir (Santos ve ark., 2018). Bazı fizyolojik durumlarda gerekli olan ancak fazla miktarda olmaları veya kendilerini dengeleyecek antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı çoğu koşulda organizmaya zararlı etkileri olmaktadır. Ayrıca hücre içi çeşitli redoks sistemleri glutatyon, tiyoredoksin ve

piridin nükleotit redoks eşleri apoptotik hücre ölümü dahil birçok hücresel fonksiyonda ve hücre sinyal iletim yollarında aracılık etmektedir (Circu ve Aw, 2010).

ROT'lar aynı zamanda serbest radikal olabilecekleri gibi serbest radikallerin üretiminde rol alabilmektedirler. Serbest radikaller, atom veya molekülün son yörüngesinde eşlenmemiş elektron bulundurması şeklinde tanımlanmaktadır. Serbest radikaller ROT'lara nazaran çok daha reaktif, yüksek enerjili atom veya moleküllerdir.

Reaktif oksijen türleri organizmada enerji metabolizması süreçlerinde üretilmektedir. Aerobik hücre solunumunda elektronların mitokondriyal elektron transport zinciri protein komplekslerinden terminal elektron alıcısı olan moleküler oksijene (O_2) aktarılması sürecinde elektronların %5-10 kadarlık kısmının oksijen molekülünün tam olmayan redüksiyonu sonucu meydana gelmektedir. Bunun dışında ksenobiyotik metabolizması, işlenmiş gıdalar, çevre kirliliğinden kaynaklanan ROT maruziyeti de diğer kaynakları oluşturmaktadır. ROT'lar, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), H_2O_2 ve singlet oksijen ($^1O_2$) olarak dört türde tanımlanmaktadır. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve peroksinitritler ($ONOO^{\cdot}$) de bazı kaynaklarda ROT sınıfına dahil edilebilmekle birlikte reaktif nitrojen türleri olarak gruplandırılabilirler (Nakai ve Tsuruta, 2021).



(Nakai ve Tsuruta, 2021)

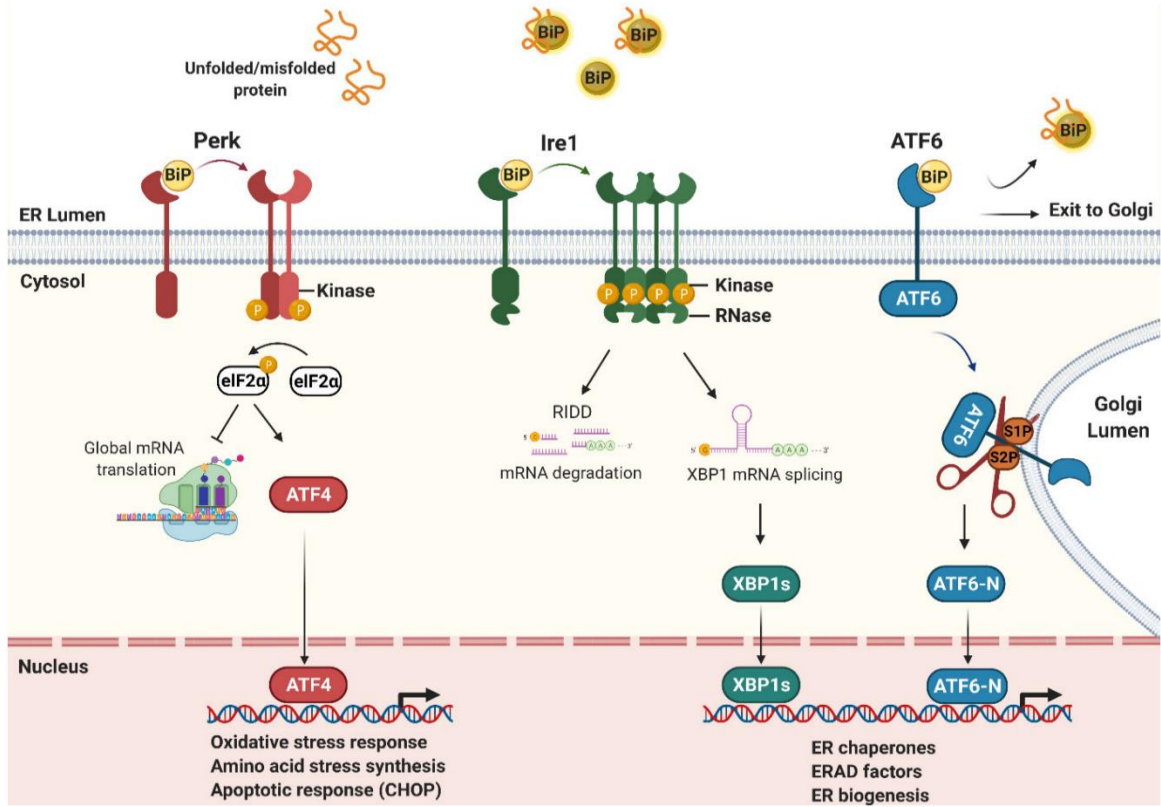
Şekil 1.19. Reaktif oksijen türleri (ROT/RNT) ve serbest radikaller.

1.11.2. Oksidatif Hücre Hasarı

DNA çift zincir kırıkları (DSBs, double strand breaks) tamiri, genomik stabilite için esansiyel major yollarından biridir. Ökaryotik hücrelerde DNA hasar tamir mekanizmaları homolog rekombinasyon (homologous recombination) ve non-homolog son birleştirme (NHEJ, non-homologous end joining) olmak üzere iki temel mekanizma ile gerçekleştirilmektedir (Scully ve ark., 2019). DSBs varlığı, hücrede DNA tamirinde önemli fonksiyonlar üstlenen kromatide büyük değişimlerin meydana gelmesine yol açmaktadır. DNA kırık bölgesinde DNA hasar yanıtı kinazların aktifleşmesi ile birlikte DNA hasar tamir yanıtı olarak isimlendirilen sinyal yolağı aktifleşmektedir. H2AFX geni tarafından kodlanan histone varyant H2AX proteini 139. pozisyonundaki serin rezidülerinin fosforile edilmesi ile aktive olan H2A.X p(Ser139) γ -H2AX kromatin bölgelerini oluşturur.

1.12. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER), sekrete edilecek proteinlerin temel üretim merkezi ve posttranslasyonel modifikasyonlar için esansiyel bir organel olması yanı sıra proteinlerin hücre içerisinde kalite kontrollerinin gerçekleştirildiği ve proteinlerin fonksiyon gösterebilmeleri için gerekli olan 3 boyutlu konformasyonun sağlandığı organellerdir (Almanza ve ark., 2019; Benham, 2019). Protein homeostazisinin korunmasındaki rolünün dışında ER, kalsiyum homeostazisinin sağlanması ve lipid biosentezinde önemli fonksiyonları gerçekleştirmektedir (Ballar ve ark., 2020). ER’de lokalize, ER stres proksimal sensörü ve transdüser (sinyal iletimi) fonksiyonunu üstlenen 3 transmembran proteini; PKR’yi anımsatan ER kinaz [PERK: protein kinase RNA-activated (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase], inozitol-gerektiren enzim-1 (IRE1; inositol requiring enzyme1) ve aktifleştiren transkripsiyon faktör 6 (ATF6; activating transcription factor 6), selüler proteomun stabil koşulların sağlandığı (proteostasis, protein homeostasis) proteostazın korunduğu fizyolojik koşullarda, ER şaperon proteini olan Grp78 (glucose-regulated protein 78; BiP, Binding Immunoglobulin Protein; ısı şok proteini 70 ailesine üye Hsp70 proteini) tarafından monomerik yapıda inaktif halde tutulmaktadır. ER stresi master regülatörü olan Grp78, ER lümeninde katlanmamış/yanlış katlanmış proteinleri tespit etmesiyle inaktif halde tuttuğu 3 transmembran proteininden ayrılır ve temel görevlerinden olan protein katlanması fonksiyonunu yerine getirmek üzere hareket geçer (Şekil 1.16 ve 1.17).



(Alshareef ve ark., 2021)

Şekil 1.20. ER stresin uyarılması ve katlanmamış protein yanıtının aktivasyonunun şematik gösterimi.

Bu aşamada Grp78 denetiminden kurtulan ER transdüser fonksiyonuna sahip transmembran proteinleri dimerize olarak aktive olmakta, kazandıkları kinaz ve/veya endonükleaz katalitik aktiviteleriyle (IRE1α ve PERK için durum böyleyken, ATF6 dimerizasyonu sonrasında golgiye göç eder, burada kırılmasıyla nükleer translokasyon özelliğini kazanır ve transkripsiyon faktörü işlevini yerine getirir: Grp78 gen ifadesini yukarı yönde düzenler) aşağı akış yollarındaki molekülleri etkinleştirmek suretiyle, yaygın bilinen şekliyle katlanmamış protein yanıtı (KPY veya ER stres yanıtı) olarak isimlendirilen adaptif sinyal yolağını harekete geçirir (Carrara ve ark., 2015; Cho ve ark., 2019; Dadey ve ark., 2016). Özetlemek gerekirse KPY'nin ER membranında lokalize 3 proksimal sensör proteini, protein katlanmasının kalitesini gözlemler ve bu bilgiyi hücrenin geri kalanına yayar (proteostasis sağlanması), eğer aktive olan KPY, ER homeostazisi yeniden sağlamayı başaramazsa ve/veya uzun süreli ER stres ve KPY, apoptotik hücre ölümünü uyarmaktadır (Almanza ve ark., 2019).

1.12.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Yanıtı

Farklı birçok eksternal veya internal stres uyarımı, hücrede ER stres oluşturabilir: patojen mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar (örn. viral hepatit), toksinler, kimyasal ajanlar, hipoksi, hipoglisemi, nütriyent deprivasyonu, reaktif oksijen türlerine maruziyet (hücre redoks dengesindeki değişimler), oksidatif DNA hasarı (örn. sekrete edilen proteinlerin yanlış katlanmasına yol açan nokta mutasyonları), kalsiyum homeostazisinin bozulması (ER’de lokalize Ca^{++} bağımlı şaperonların fonksiyonlarının sekteye uğraması) vd. etmenler ER stresini tetikleyebilmektedir (Hetz ve ark., 2015; Madden ve ark., 2019). Ökaryotik hücreler, ER homeostazisindeki bu türdeki dalgalanmaların hücre yaşamını tehdit eder boyutlara ulaşmasının önüne geçerek restoratif ve adaptif yanıt oluşturmayı hedefleyen güçlü bir sürveyans sisteminin harekete geçirilmesi şeklindeki selüler mekanizmayı evrimsel süreçlerde geliştirmiştir. ER’nin protein katlanması ve kalite kontrolü süreçlerindeki esansiyel rolü, organel işlevlerindeki bozulma ile birlikte katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimiyle ER stresinin indüklenmesi ile katlanmamış protein yanıtı (KPY; UPR, unfolded protein response) yolağı aktive olmaktadır. Özetle, ER lümeninde, protein katlanması fonksiyonunu bozan fizyolojik ya da patolojik süreçlerin bütünü, ER stresine neden olarak adaptif selüler sinyal yolu olan KPY’yi etkinleştirir (Obacz ve ark., 2017). Aktive olan KPY, yanlış katlanmış protein seviyelerini düşürerek ve oluşturduğu diğer adaptif selüler yanıtlarla hücre kurtuluşunu sağlamaktadır. Bu şekilde birçok hastalığın biyopatogenezinin temelinde yer aldığı, malign fenotipe dönüşüm dahil karsinogenez süreçlerinde ve antikanser terapilere direnç gelişiminde önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. Özellikle, belirgin sekretuar fonsiyonları olan, hormon bağımlı meme ve prostat kanserlerinde ER stresi ve KPY uyarılmış durumdadır. Bu durumun nihai olarak, tümör hücrelerinin ER strese verdikleri adaptif KPY’nin tümörögenezi destekler nitelikte olduğu bilinmektedir (Jin ve Saatcioglu, 2020). ER stresi ile indüklenen KPY’nin kanser hücrelerinde koruyucu (tümör hücre sağkalımını artırıcı ya da antiapoptotik) nitelikte bir stres yanıtı olduğu bilinmekte, bu yönde KPY’nı hedefleyen tedaviler üzerine yoğun araştırmalar sürmektedir (Jin ve Saatcioglu, 2020; Sheng ve ark., 2015; Sheng ve ark., 2019; Storm ve ark., 2016). Prostat kanseri tümör hücrelerinde ER stresi ve KPY’nin IRE1 α üzerinden ilerleyen kolunu selektif olarak hedefleyen potent IRE1 RNase inhibitorü farmakolojik bir ajan olan MKC8866 ile gerçekleştirilen bir çalışmada, IRE1 α katalitik aktivitesinin blokajı ile transkripsiyon faktörü XBPs’nin aktifleşmesi ve KPY üzerine olan etkinliğinin

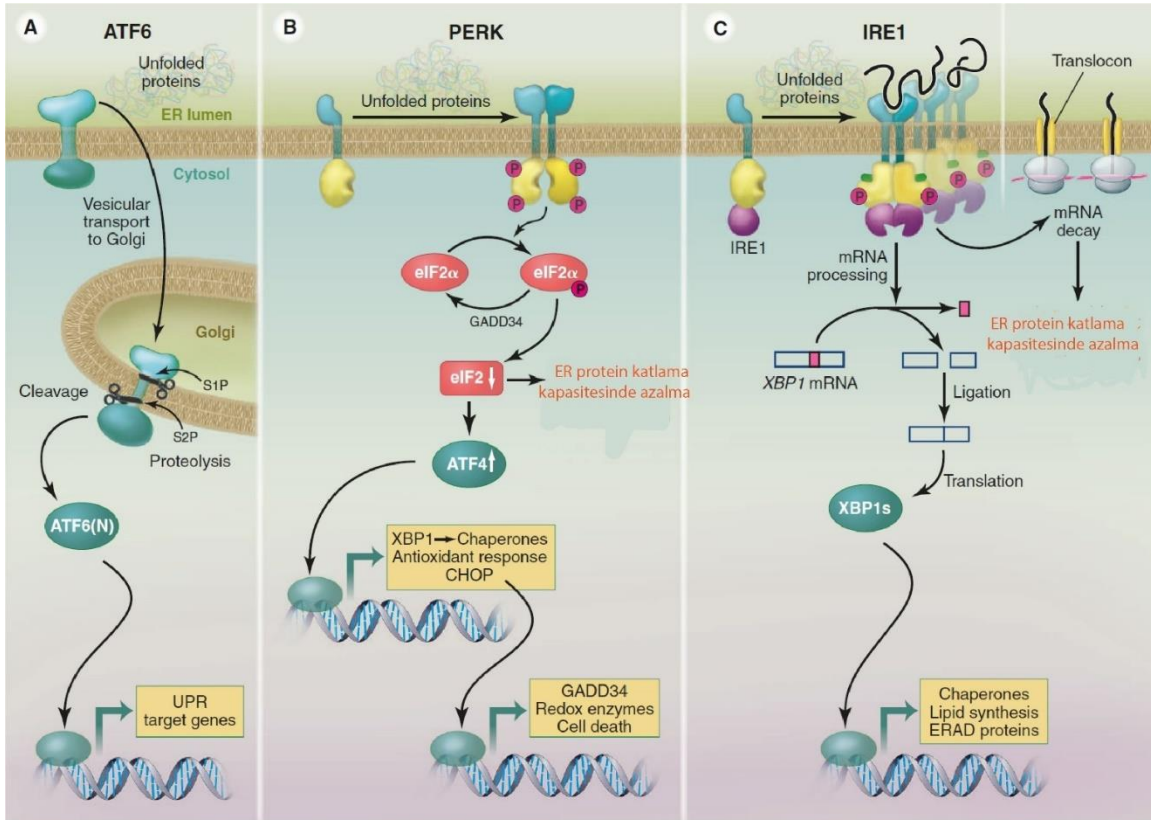
sonlandırıldığı, ayrıca XBPs ile c-myc onkogeninin eşgüdömlü karsinogenezi destekleyici etkilerinin de inhibe edildiği, ek olarak ikinci nesil antiandrojen ilaç olan enzalutamid terapötik yanıtlarında artış sağlandığı *in vitro* ve *in vivo* preklinik çalışmalarla göstermiştir (Sheng ve ark., 2019). Ayrıca, ER stres inhibitörü & KPY modölatörü farmakolojik bir ajan olan salubrinalin, hormon pozitif meme kanserinde tamoksifen ile birlikte kullanıldığında tümör hücre apoptozisini potent şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Hamamura ve ark., 2014; Sengupta ve ark., 2019).

Mikroçevre stresi ile indüklenen ER stresi, tümör mikroçevresinde birçok faktör etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Öncelikle tümör dokusunda hızlı proliferasyon ve yüksek metabolik aktiviteye karşılık mikrodolaşım yetersizliği ile birlikte nütriyent ve O₂ azlığı ile hipoksi, beslenme yetersizliği ve asidozla sonuçlanan lokal mikroçevre stresi yaratarak ER stresini indüklemekte, protein ve lipid sentez süreçlerinde bozulmalara neden olmaktadır (Giampietri ve ark., 2015).

ER stresindeki artış sonrası Grp78'in ayrılmasıyla fosforile olarak aktive olan KPY'nin transdüser fonksiyonu gösteren 3 transmembran protein kolundan biri olan PERK, dimerizasyonu sonrası kazandığı katalitik kinaz fonksiyonuyla aşağı akış düzenlemede substrat molekülü olan eIF2 α 'yı [eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α)] fosforile etmekte ve PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP sinyal yolunu harekete geçirmektedir. p-eIF2 α selüler tüm transkriptomla birlikte mRNA translasyonu büyük oranda baskı altına alır (Ali ve ark., 2017; Teske ve ark., 2011). Yeni teknolojik gelişmelerin sağladığı muazzam boyuttaki imkanlar mesajcı RNA translasyonu süreçlerindeki mekanizmanın aydınlatılmasında mekanistik izahatı mümkün kılmıştır. Ökaryotik mesajcı RNA translasyonu oldukça kompleks bir süreç olup başlangıç (initiation), uzama (elongation), sonlanma (termination) ve ribozom geri dönüşümü (ribosome recycling) olmak üzere 4 aşamadan ve protein ve protein olmayan moleküllerin dahil olduğu farklı mekanizmalardan oluşmaktadır. Translasyon sürecinin düzenlenmesi temel olarak çok sayıdaki ökaryotik başlangıç faktörlerinin (eukaryotic translation initiation factors) kontrolü altında geekleştirilmektedir.

İnoзитol gerektiren transmembran kinaz/endoribonöklaz 1 α [Inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α (IRE1 α)], ER'de lokalize bir transmembran proteini ve katalitik aktiviteye sahip bir enzim olup, ERN1 geni tarafından kodlanmaktadır. IRE1 α , biri endoribonökleaz diğeri trans-otofosforilasyon protein kinaz olmak üzere iki fonksiyonel enzimatik alana sahip endoplazmik retikulum (ER) stres sensörü ve katlanmamış protein yanıtı (KPY) selüler sinyalizasyon kaskadının 3 ana kolundan biridir

(Bravo ve ark., 2013). Aktive olması sonrasında, IRE1 α oligomerize olur ve klasik olmayan bir mRNA splicing aktivitesi ile X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) mRNA'dan bir intronu çıkararak fonksiyonel bir transkripsiyon faktörü olan XBP1s'ye dönüşümünü sağlar (XBPu---XBPs). XBP1s, genomik etkinliğiyle ER stresini azaltmaya yönelik düzenlemeler ve hücreyi koruyucu nitelikte fonksiyonlar sergiler: ER şaperonlarını ve endoplazmik retikulumla ilişkili bozunma (ERAD, Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) genlerini düzenler (Walter ve Ron, 2011).



Şekil 1.21. Endoplazmik retikulum (ER) stresini ve katlanmamış protein yanıtı (KPY) sinyal yolağının şematik gösterimi.

1.12.2. Isı Şok Proteinleri, Proteotoksisite ve Proteostazis

Proteozom, ökaryotik hücrelerde major degradasyon makinesi olarak binlerce kısa ömürlü, yanlış katlanmış, hasarlı proteinin intraselüler varlığının sonlanmasından sorumludur (Hoeller ve Dikic, 2016). Proteozom, hücrede protein kalite kontrolünün sağlanmasında anahtar roller üstlenmektedir. Proteozomal aktivitede azalma yaşlanma, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer ileri yaşla ortaya çıkan dejeneratif hastalıkların biyopatogenezinde yer almaktadır. Kanser hücreleri gibi yüksek proliferative özellik

sergileyen hücreler protezomal aktivitenin devamına ihtiyaç duymaktadır. Bu yönüyle birçok kanser türünün tedavisinde proteozom inhibitörü ilaçların kullanılarak tümör hücreleri kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır (Cohen-Kaplan ve ark., 2016). Proteostazis, protein sentezi, katlanması, trafiği, sekresyonu ve intraselüler proteinlerin primer degradasyon yolu olan ubikuitin-proteazom sistemi (UPS) de içine alan entegre bir takım sinyal yolları aracılığıyla selüler proteomun hücre fonksiyonlarının normal şekilde sürdürülmesi için gereken koşulların kontrol edilmesini ifade eden terimdir (Martinez ve ark., 2017). UPS, hücre siklusunun düzenlenmesi, oksidatif stresle indüklenen bazı proteinlerin yıkımı dahil çok sayıda ve geniş yelpazedeki selüler fonksiyonların devamını sağlayan esansiyel bir hücre sürecidir (Chen ve Zhao, 2013). Tümöröenez sürecinin bir parçası olan ve proteotoksik stresin bir yansıması olarak mutant onkoproteinlerin seviyesinde meydana gelen artışla tümör hücrelerinde Isı şok proteinleri (Heat shock proteins, HSPs) miktarında artış yaşanmaktadır (Calderwood, 2018).

Hücre içerisinde sentezlenen proteinlerin 1/3'ünün sentez, katlanma ve yapısal maturasyonlarının sağlanması süreçleri ER'da gerçekleştirilmektedir (Ballar ve ark., 2020; Kramer ve ark., 2019). Özellikle sekrete edilen, ER, golgi, lizozom ve plazma membranında lokalize olacak proteinlerin translasyonu ER'de gerçekleştirilmektedir (Hetz ve ark., 2015). Proteinlerin doğru şekilde katlanabilmesi ve posttranslasyonel modifikasyonların (glikolizasyon ve lipidasyon) gerçekleştirilmesi için ER mikroçevresinin yükseltgeyici (okside edici) ve yüksek Ca^{++} konsantrasyonları ile Grp78, kalneksin, kalretikülin ve protein disülfid izomerazlar (PDI) gibi ER şaperon proteinlerinin (ER şaperon proteinlerinin çoğu Ca^{++} bağımlı etkinlik sergilemektedir) yoğun miktarlarda bulunmasına ihtiyaç duymaktadır (Tameire ve ark., 2015). Bu yönleriyle proteostazisin korunmasında temel görevli selüler yapı olan ER, selüler proteomun fonksiyonel halde devamını, birbirine bağlı çalışan iletişim ağının eşgüdümüyle gerçekleştiren protein kalite kontrol sisteminin anahtar roldeki bileşenidir. Şaperonlar, oksidoredüktazlar ve glikozilasyondan sorumlu enzimler ER içerisinde, sekretuar proteinlerin doğru katlanması, modifikasyon ve multiprotein kompleksler şeklinde birleştirilmesi ve sonrasında sekretuar yolakla bu proteinlerin görevli oldukları lokasyonlara transferleri gerçekleştirilir. ER lümenine transloke olan proteinlerin en az %30'u protein kalite kontrolünden geçememektedir. Kalite kontrol denetiminden geçebilen protein oranı bazı proteinler (kritik öneme sahip sinyal iletiminde görevli proteinler, polipeptid hormonlar ve hücre yüzey reseptörleri) için çok daha azdır (Schubert ve ark., 2000). Sıkı bir deneyim sağlayan protein kalite kontrol sistemleri (örn. ERAD, ER associated degradation) tarafından doğru

şekilde katlanmadığına hükmedilen ve kontrol altına alınan ve katlanmamış proteinlerin sitoplazmaya uzaklaştırılması ve sırasıyla ubiquitinasyon ve 26S proteozomu tarafından degradasyona uğratılması süreçlerini organize etmektedir. Protein kodlayan gen bölgelerinde kalıtsal mutasyonlar ve ortaya çıkan klinik hastalık tablolarında protein katlanması fonksiyonunun etkilenmesi ve efektif protein translasyonunda düşüş meydana gelmektedir. Örneğin kistik fibrozis hastalığında, Cl⁻ iyonun transferinden sorumlu iyon kanalı proteininin katlanması fonksiyonuyla ilişkili mutasyon [kistik fibrozis transmembran konduktans regülör (CFTR) mutasyonu] transporter proteini eksikliğine neden olmaktadır. ER protein katlama kapasitesi hücre tipine göre çeşitlilik göstermektedir. Sekretuar fonksiyonlar sergileyen hücrelerde ER büyükçe ve gelişkindir. 1 dakika içerisinde 1 milyon insülin molekülünü sekrete etme kabiliyetine sahip pankreas beta hücreleri ER protein katlama kapasitesi en büyük hücre tiplerinden biridir. İnsülin direnci evresinde pankreasın yoğun insülin sekresyonu gerçekleştirerek insülin direncine karşı mücadelesi beta hücrelerinin devasa protein katlama kapasitesinin aşılması ile katlanamamış proteinlerin yol açtığı ER stresi ortaya çıkmasıyla KPY aktive olmaktadır. Düzeltilemez ER stresi durumunda bu mekanizma hücre apoptozisini terminal KPY olarak aktifleştirmektedir. Kronik ER stresine bağlı hücre hasarı yaygın hastalıklarla (enflamasyon, kanser, nörodejenerasyon, viral enfeksiyonlar, pulmoner fibrozis, DM, stroke, metabolik hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar) yakın ilişkide bir süreç olduğu artık kabul edilen bir durumdur. Birbirinden çok farklı bu hastalık spektrumunun tümünde protein katlanması fonksiyonundaki bozukluk ve proteostazisin sağlanamaması ortak olarak bulunmaktadır.

Katlanmamış veya yanlış katlanmış protein toksisitesinin birçok dejeneratif sürecin temelinde yer aldığı ifade edilmektedir (Hughes ve Mallucci, 2019). Non-fonksiyonel olan katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler, termodinamik yönden yüksek entropiye sahip olmaları ve anstabil yapılarıyla hücre için istenmeyen ve dahası agregatlar oluşturarak hücre fonksiyonlarını bozucu niteliktedir (Herczenik ve Gebbink, 2008; Lindorff-Larsen ve ark., 2005). ER stres ve KPY ile ilişkisi en iyi tanımlanan hastalık tablolarından olan nörodejeneratif hastalıklarda proteostazisin bozulmasına bağlı süreçlerin hastalık biyopatogeneğinde sorumlu temel mekanizmalardan biri olarak gösterilirken, postmortem doku incelemelerinde KPY'nin belirgin şekilde aktive olduğu ve özellikle PERK yolunun hastalık progresyonu ile güçlü şekilde ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Stutzbach ve ark., 2013).

Androjen reseptör sinyal yolağı endoplazmik retikulum-aracılı yıkım yolağını (ERAD)

düzenlemektedir. Prostat kanseri tedavisinde kullanılan androjen reseptör antagonisti ilaçlar ve apalutamid ERAD yolunu etkileyerek tümör biyolojisinde farklılık meydana getirebilir. Endoplazmik retikulum stresi prostat kanseri ilişkisi son dönemde önemi giderek artan konulardan biridir (Logothetis ve ark., 2018).

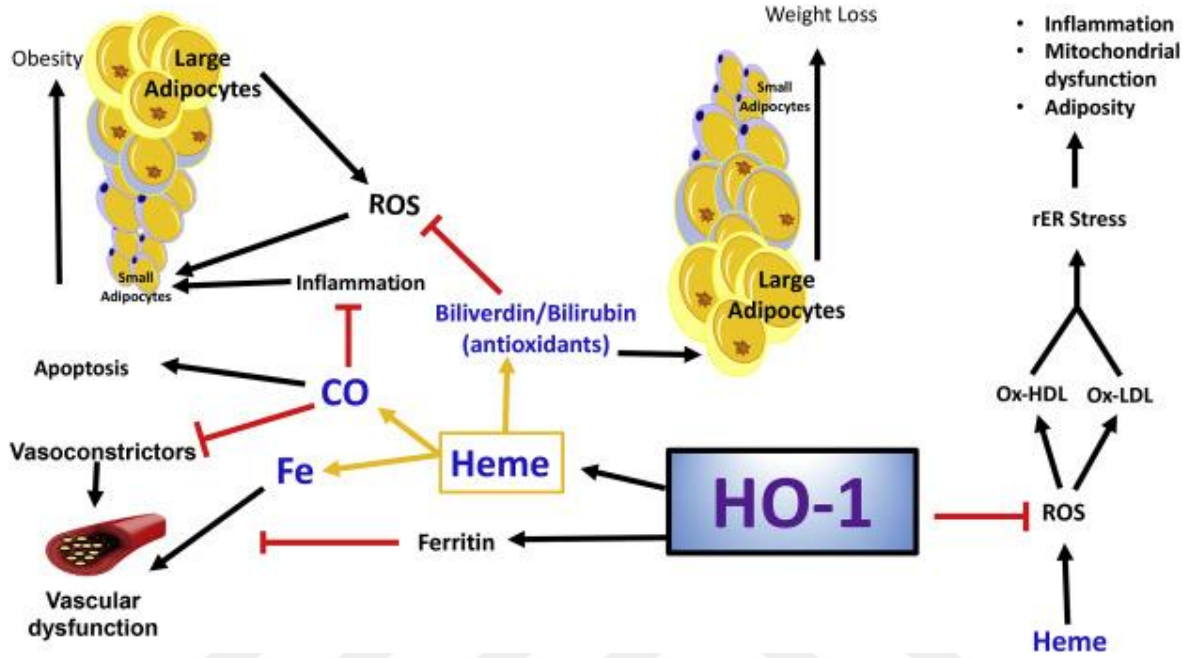
Ca^{++} düzeylerinde düşme, reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı oksidatif stres, hipoksi, asidoz, glukoz ve nütriyent deprivasyonu oluşturan fizyolojik veya patolojik durumlar (malign hastalıklar, nörodejeneratif hastalıkları, viral enfeksiyonlar) ER şaperon protein fonksiyonlarının bozulması sonrasında ER protein katlama kapasitesinde azalma ile katlanmamış/yanlış katlanmış protein miktarının artışı ve birikimiyle karakterize ER stres tablosuna yol açmaktadır (Boyce ve Yuan, 2006).

1.12.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Oksidatif Stres

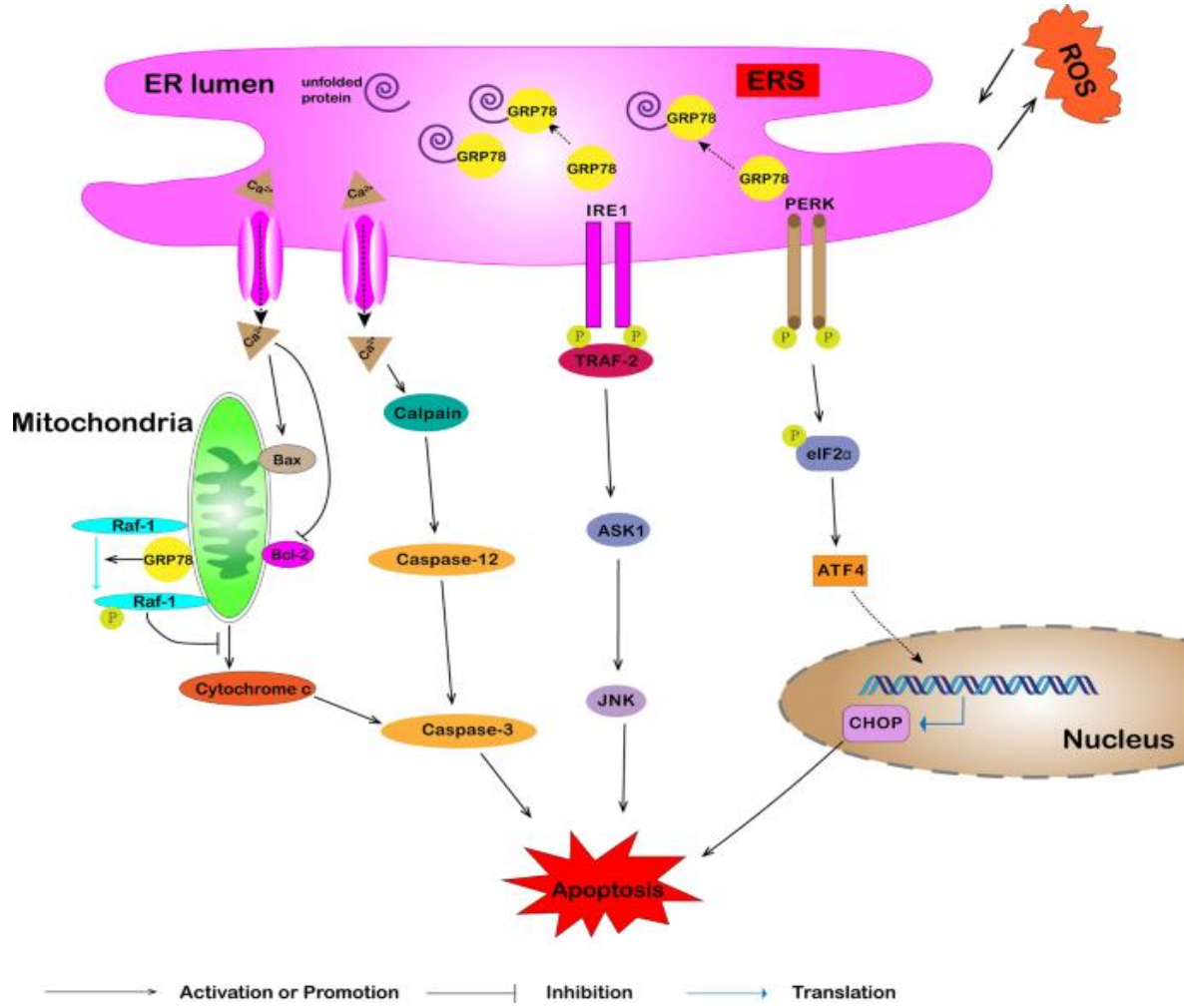
Literatürde farklı kanserlerde oksidatif stresin, ER stresi indüklenmesinde rol oynadığı ve hücre içi yaşamsal öneme sahip olan ER'nin bu stres koşullarında hücreyi apoptozisden korumak için antiapoptotik yolları aktive ederek hücre kurtuluşunu sağladığı gösterilmiştir (Siwecka ve ark., 2019). Diğer taraftan, onkojenik süreçlerde yer alan ve selüler sinyal yollarının merkezinde konumlanmış transkripsiyon faktörleri olan NF- κ B ve STAT-3'ün, ER stresi-KPY ile çift taraflı güçlü bir etkileşim ve iyi tanımlanmış iletişim ağıyla ortak hareket ettikleri bilinmektedir (Sullivan et al., 2020; Yakin et al., 2019). Enflamatuar uyarı NF- κ B'yi direkt şekilde indükleyebildiği gibi ER stres üzerinden de NF- κ B uyarımını gerçekleştirebildiği gösterilmiştir. Bilindiği üzere NF- κ B DNA üzerinde yüzlerce genin transkripsiyonel aktivitesini etkileyen, karsinogenez ile ilişkili bir transkripsiyon faktörüdür (Duvigneau et al., 2019; Hayes et al., 2020; Montanari et al., 2017) (Çizim VI). Yine prostat kanseri için önemli bir onkogen olan c-myc, ER stresi ve KPY transdüser proteinleriyle (IRE1 α ve PERK) birbirini destekleyen farklı çalışmalarda da belirtilen şekilde pozitif anlamda ilişki içerisindedir (Jayasooriya et al., 2018; Robinson et al., 2015; Rubin & Demichelis, 2018; Sheng et al., 2019).

Hemoksijenaz-1 (HMOX-1, HO-1), memeli hücrelerinde ferröz demir Fe^{++} , karbon monoksit (CO) ve biliverdinin üretildiği, hem molekülünün oksidatif bozunması reaksiyonun hız kısıtlayıcı basamağını katalize eden enzimdir. Hem katabolizmasındaki birincil rolüne ek olarak, HO-1, sırasıyla biliverdin ve CO'nun etkisi üzerinden anti-oksidatif ve anti-enflamatuar fonksiyonlar sergilemekte ve selüler farklılaşma süreçlerinde rol almaktadır (Chiang ve ark., 2018). HO-1, kanserinogenez ve tümör progresyonunda

sorumlu olduğu düşünölen, intraselöler stres yanıt yollaklarıyla etkileşim içerisinde ve yukarı yönde düzenlenmiş sinyal yollaklarından biridir. Oksidatif stres, sitokinler ve prostaglandinleri de içine alan birçok uyarıcıya yanıt olarak HO-1 selöler konsantrasyonlarında artış gerçekleşmektedir.



Şekil 1.22. Enflamasyon ve oksidatif stresle indöklönen ER stres ve apoptotik hücre yanıtı



Şekil 1.23. Enflamasyon ve oksidatif stresle indüklenen ER stres ve apoptotik hücre yanıtı

Nrf2 (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2), NFE2L2 (NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2) geni tarafından kodlanan küçük bir protein ailesi olan bZIP (basic leucine zipper) üyesi transkripsiyon faktörü olup, çok sayıdaki genin özellikle de promoter gen bölgelerinde antioksidan yanıt elementleri (ARE) içeren genlerin düzenlenmesinde görev almaktadır. Promoter gen bölgelerinde ARE içeren bu genlerin protein ürünleri serbest radikal üretimiyle neticelenen selüler hasar ve enflamasyona karşı verilen adaptif yanıtta rol almaktadır (Tascioglu Aliyev ve ark., 2021). Nrf2 selüler redoks homeostazisini düzenleyici, antioksidan özelliklerinin yanı sıra hem protümöral hem de antitümöral etkilere yol açabildiği bilinmektedir (Wu ve ark., 2019).

Oksidatif stres yanıtlarının ana düzenleyicisi olan Nrf2 ATF4 ile etkileşime girmekte, mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesi ve kontrolünde rol oynamaktadır (Kasai ve ark., 2019). Dahası, aktif PERK'in Nrf2'yi fosforile ederek aktifleştirdiği birçok çalışmayla gösterilmiştir (Cullinan ve Diehl, 2004; Cullinan ve ark., 2003; Del Vecchio ve

ark., 2014). Ayrıca Nrf2 ve ATF4'ün mitokondriyal katlanmamış protein yanıtını (mtKPY) da kapsayan mitokondriyal retrograd sinyal yolağı ile çaprışık şekilde etkileşimde oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Mitokondriyal ROS üretiminin artması Keap1'i ve Nrf2'yi baskılarken, ATF4 indüksiyonuna neden olarak ATF4 üzerinden Nrf'nin dolaylı artışını uyarmaktadır. ATF4 ve Nrf2 antioksidan savunma mekanizmalar yanı sıra mitokondriyal biyogenezi uyarmaktadır. Mitokondriyal solunum intrensek ROT üretimine neden olmakta, selüler antioksidanlar tarafından nötrale edilmektedir. Çok sayıda stres ROT üretimini tetiklemekte ve bu şekilde mitokondriyal disfonksiyona neden olarak ATP üretiminin ve mitokondriyal metabolitlerin azalması, mitokondri membran potansiyelinde azalma ve Ca^{++} serbestlenmesi, katlanmamış proteinlerin birikimi ve kısır döngü olarak daha fazla ROT birikimine yol açmaktadır. Enerjitik stres, AMPK (AMP activated protein kinase) sinyal yolağı üzerinden FOXO genlerin aktivasyonuna ve mitokondriyal biyogenezi ve mtDNA sentezinin uyarılmasıyla hücre kurtuluğu yönünde adaptif yanıtların oluşmasına neden olur. AMPK sinyal yolağı NF- κ B sinyal yolağını destekler. Farklı birtakım yanıtlar ile mtKPY ER stres ilişkili KPY ile birlikte selüler şaperon protein düzeylerinde artışa neden olurken, aminoasit üretimini ve antioksidan sentezini de uyarmaktadır.

1.13. Entegre Stres Yanıtı

Ökaryotik hücrelerde, evrimsel olarak korunmuş intraselüler sinyal ağı olan entegre stres yanıtı, hücre, doku ve organizmanın farklı türdeki zorlayıcı koşullara uyumun sağlanması ve sağlık durumunun devamını sağlayan düzenleyici ve yürütücü sistemdir (Costa-Mattioli ve Walter, 2020). Selüler stres yaratan farklı çevresel ve patolojik koşullar ve sayısız türdeki zedeleyici etmen adaptif bir hücre yanıtı olan entegre stres yanıtını tetiklemektedir (Pakos-Zebrucka ve ark., 2016). Yolak temel olarak, hücre stresıyla katlanmamış, yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmesi ile PERK enziminin BiP'den ayrılması neticesinde fosforilasyonu, p-PERK'in kinaz aktivitesi ile eIF2 α 'yı fosforile etmesi ve sonrasında aşağı akış düzenleme yolağı ile aktive olan ATF4 transkripsiyon faktörü aracılığıyla birtakım genler dışında global protein translayon süreçlerinin baskılanmasına şeklinde özetlenebilir ise de çok daha komplike yönleriyle selüler sinyal yolaklarının bütünüyle entegre hareket ettiği bir sistem olarak tanımlanması daha doğru olacaktır. PERK dışın stresin algılanmasında görev alan diğer özelleşmiş kinazlar GCN2, PKR ve HRI tek bir molekülün -eIF2 (eukaryotic translation initiation factor)- serin aa rezidüsünün fosforilasyonuna odaklanmakta ve stresin selüler

duyumsanması bu şekilde gerçekleştirilmektedir (Costa-Mattioli ve Walter, 2020; Harding ve ark., 2003; Hipp ve ark., 2019; Labbadia ve Morimoto, 2015; Walter ve Ron, 2011). Entegre stres yanıtları sisteminin merkezinde yer alan eIF2 α 'nın fosforile olarak aktif hale geçmesi PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) tarafından düzenlenmektedir (üst akış düzenleyici) (Cullinan ve Diehl, 2006; Gorman ve ark., 2012).

Selüler entegre stres yanıtları (ISR, integrated stress response) kanser hücre sağkalımında kilit konumdaki bir yolak olarak ISR'yi hedef alan antitümöral ajanlar tümör progresyonun önlenmesinde ümit vadetmektedir (Dey ve ark., 2015). ER stresin 3 transmembran sensör protein kolundan biri olan PERK'in uyarılması ve fosforilasyonu aşağı akış düzenleyici yolağının bir üyesi olan ATF4 (activating transcription factor 4) ISR'nin primer transkripsiyonel efektörüdür. ATF4 aktivasyonu, transforme hücrede ekstraselüler matriks ilişkili bir apoptoz şekli olan anoikisten koruyarak hücre sağkalımını desteklemektedir. Ayrıca matriks bütünlüğüne olan metastatik özelliklerin ediniminde protümöral etkide bulunmaktadır. Sitoprotektif otofajiyi ve antioksidan yanıtları aktive ettiği, majör antioksidan enzimlerden olan HO-1'in gen ifade düzeylerini arttırmaktadır. HO-1 gen ifadelerindeki artış, ATF4 ve Nrf2 transkripsiyon faktöründe eş zamanlı indüklenmesiyle HO-1 gen promoter bölgesinde birlikte sergiledikleri ortak etki neticesinde gerçekleşmektedir. HO-1'in aşırı ifadelenmesi selüler oksidatif stresi azaltmakta, hücre ölümü yönündeki karar verici sinyalleri baskılamaktadır. Yüksek HO-1 ifadesi kanser olgularında kötü prognozla ortalama sağkalımda azalmayla ilişkilidir.

eIF2, α , β ve γ subunitlerden oluşan heterotrimerik bir proteindir (Spilka ve ark., 2013). eIF2, inisiyasyonun başlangıç aşamasında met-tRNAi'nin [ökaryotik mRNA'nın translasyonunun başlatılmasında biricik aminoasit tRNA olup, inisiyasyon süreci boyunca translasyon aparatının komponentleri ile yüksek özgüllük gösteren seri birtakım karşılıklı etkileşimler kurmaktadır (Cigan ve ark., 1988)] 40S ribozomal P konumuna gönderimini sağlayan üçlü kompleksin esansiyel elementidir (Sharma ve ark., 2016). Translasyonun inisiyasyon süreci boyunca eIF2-GTP ile bağlı haldedir, eIF5 tarafından indüklenen hidroliz sonrasında eIF2'nin inaktif formu olan eIF2-GDP dönüşümü gerçekleşir. Bu aşama özellikle stres koşullarındaki hücrenin translasyon inisiyasyonunu kontrolünde son derece önemlidir (Holcik, 2015).

Sitoplazmik organller ve sitozolik hücre bileşenlerinin lizozomal degradasyon sürecini içeren sıkı bir denetime tabi tutulan yolak olarak tanımlanan otofaji, çok farklı selüler stres formlarıyla stimüle edilebilmektedir. Otofaji yolağını harekete geçiren başlıca selüler stres türleri: nütriyent veya büyüme faktör deprivasyonu, hipoksi, ROT, DNA hasarı, ER stresi

oluşturan katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlerin neden olduğu protein agregatları, hasar gören organeller, intraselüler patojenler şeklinde ifade edilebilir (Kroemer ve ark., 2010). KPY, otofaji için potent bir stimulustur. Dahası, entegre stres yanıtının merkezindeki bir komponenti olan otofaji, diğer selüler stres yanıtları ile birlikte hareket edebilmektedir. Diğer taraftan immün uyarılar, pro-enflamatuar sitokinler, IFN- γ ile NF-kB sinyal yolağı otofajinin düzenlenmesinde fonksiyon göstermektedir (Baud ve Karin, 2009; Criollo ve ark., 2010; Herrero-Martin ve ark., 2009).

1.14. Prostat Kanserinde Agresif Tümör Karakter Özellikleri

NEPCs (neuroendocrine prostate cancers) ve AVPCs (Aggressive variant prostate cancers) mevcut terapötik yaklaşımlarla ancak kısa süreli yanıtların alınabildiği PK'ye bağlı ölümlerin 1/3'ünden sorumlu tutulan ölümcül PK varyantlarıdır (Alanee ve ark., 2015). ABD'de son 20 yılda NEPCs ve AVPCs tümör varyantlarının yaş değişkenine göre düzeltilmiş insidans hızında kararlı bir artış gözlemlenmektedir. Bu PK tümör alt tipleriyle ilişkili hasta mortalite hızında ise azalma ile hasta sağkalımında artış sağlanamamıştır.

Bu varyantlar çoğunlukla zayıf olarak AR ifade eden, bu nedenle de ADT'ye doğal dirençlidirler. Tümör plastisitesi, kanser evrimi süresince nöroendokrin diferansiasyonu güçlendirirken, başlangıç aşamasından tümör ilerleme süreçlerine karsinogenezi, tümör hücre sağkalımını destekleyici niteliktedir. Prostat tümör hücrelerinde, EMT/kök hücre sinyal yolları selüler plastisiteyi desteklemekte, terapi direnci ve metastatik kompetansta pivot özelliği sergilemektedir. EMT/kök hücre sinyal yollarını seçici şekilde inhibe eden ajanların geliştirilmesi agresif tabiata sahip letal PK türlerine sahip olgularda hedefe yönelik uygulanan akıllı ilaç tedavi imkanı sunabilecektir (Soundararajan ve ark., 2018).

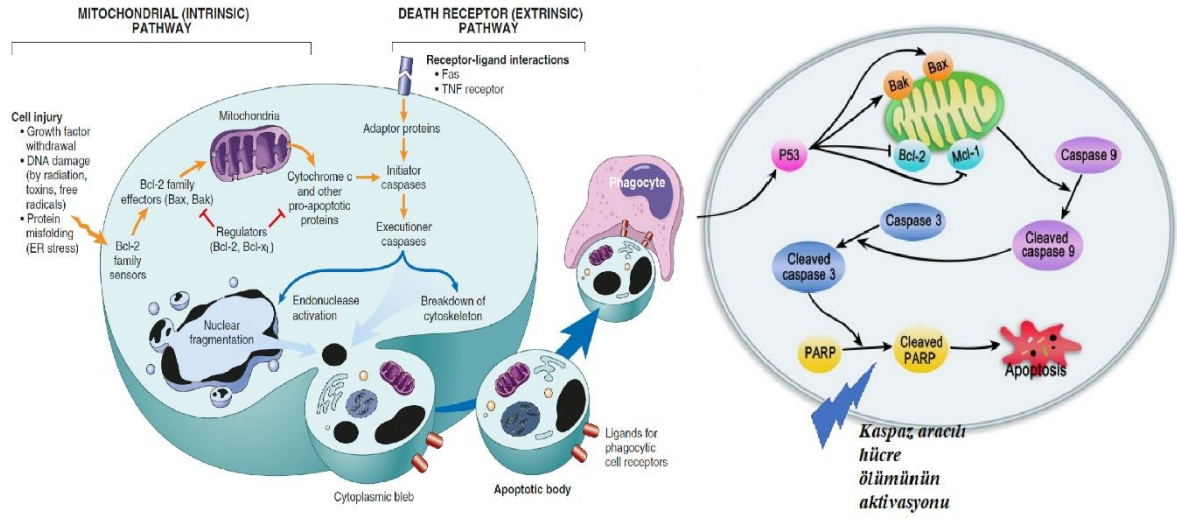
1.15. Apoptozis ve Hüce Ölümü

Hücre ölümü, temelde nekroz (geri dönüşümsüz, "istenmeyen" hücre ölümü) ve düzenlenmiş olarak iki tipte sınıflandırılmaktadır. Nekroz, hücrelerin geri dönüşmez şekilde hasar görmesi sonucu görülen patolojik ölüm şeklidir. Düzenlenmiş hücre ölümünün ise apoptozis (programlı hücre ölümü, hücre intiharı), düzenlenmiş nekroz (nekropitoz), otofaji bağımlı hücre ölümü (otozis), piropitozis, ferropitozis, NETozis, partanatos, entotik hücre ölümü, anoikiz, lizozom bağımlı hücre ölümü ve mitotik hücre ölümü olarak çeşitli şekilleri bulunmaktadır. Apoptotik veya nekrotik hücre ölümünün in vitro olarak tespit edilmesi ve ayrımının net şekilde gerçekleştirilmesi önemli olup, analitik

birtakım zorluklar barındırmaktadır. İmmünohistokimyasal ve biyokimyasal deneylerle hücre ölüm yollarının monitörizasyonu günümüzde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanında raman spektroskopisi yöntemiyle hücre ölümünün kültür devam ederken sürekli şekilde non-invazif şekilde takibinin gerçekleştirilmesini mümkün kılabilir. Akım sitometri ve floresan mikroskopi heteojen hücre popülasyonlarının incelenmesinde alternatif yöntemlerdir. Propidyum iyodid (PI, propidium iodide) ve floresan izotiyosiyanatla konjuge Annexin V [FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated Annexin V (Annexin V-FITC)] apoptotik süreçlerin monitörizasyonunda standart kabul edilen analizdir (Brauchle ve ark., 2014). Özetle, apoptozis ve nekroz hücre ölümünün bütünüyle farklı şekilleridir (Hu ve ark., 2021).

Bcl-2 (B Cell Leukemia-2) ailesinde yer alan proteinler mitokondriyal (intrensek) apoptozisin kontrolünde anahtar role sahiptir (Akl ve ark., 2014). Dahası karsinogenez ve tümör progresyonuna sunduğu katkı ile tümör hücre sağkalımında önemli fonksiyonlar üstlenmektedir. Tümör hücrelerinde büyüme sinyallerini oluşturan RTK'ler Bcl-2 fosforilasyonuna yol açarak antiapoptotik-protümöral etkinlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar MAPK/ERK1/2 inhibitörlerinin veya siRNA (short interfering RNA) aracılı ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) geninin susturulmasının Bcl-2 fosforilasyonunu önemli oranda azalttığı, tümör hücre canlılığı ve kemorezistans azalma sağladığı gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2017).

Apoptotik hücre ölümü, selüler mimaride stereotipik morfolojik değişimlerle karakterize ve oldukça sıkı şekilde kontrol edilmekte olan bir süreçtir. Apoptozis, hücre büzüşmesi, plazma membranında tomurcuklanma, hücrelerin ayrılması, fosfatidilserinin eksternalizasyonu, nükleer kondensasyon ve nihayetinde DNA fragmentasyonu ile iyi tanımlanmış özelliklere sahiptir. Fosfatidilserin normal bir hücrede, membranın iç yüzünde bulunmakta ve hücre membranı iç yüzünün (-) elektrik yüklü olmasını sağlamak ve intraselüler proteinlerle iletişim içerisindedir. Flip-flop hareketiyle membran dış yüzüne geçişi, hücrenin programlı hücre ölümü sürecine girdiğini işaret etmektedir. Membran dış yüzündeki fosfatidilserin, fagositer hücreler için “ye beni” sinyali özelliği sergilemektedir. Mitokondriyal (intrensek) ve ekstrensek (cell death signal) olarak ikiye ayrılan apoptozisin ortak şekilde anahtar konumundaki enzimleri olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu yukarıda sayılan apoptotik hücre morfolojisinden sorumlu moleküllerdir (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. Kaspaz aracılı apoptozisin şematik gösterimi.

2. AMAÇ

Bu tez projesinde, prostat kanseri tümör mikroçevresinde yoğun şekilde yer alan TAM'lerden kaynaklanan enflamatuar çevresel stresin metastatik hormon duyarlı prostat kanser hücresi (LNCaP) tümör biyolojisi üzerinde oluşturduğu etkiler farklı boyutlarıyla ele alınarak incelendi. M1 polarize TAM kaynaklı enflamatuar stres uyarısının tümör hücrelerinde ER stres, katlanmamış protein yanıtı (KPY) ve entegre stres yanıtı aktivasyonu sonucu hücre sağkalımı ile tümör progresyonu üzerine olan etkileri, stres uyaranlarına adaptif selüler yanıtı oluşturan sinyal yollarındaki aktivasyonun kanser hücresi ölüm ve kurtuluşu kararında önemli olan apoptotik yolak aktivitesi üzerindeki etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanında, enflamasyonun antiandrojen ilaç direnci gelişimindeki etkisinin *in vitro* olarak araştırılması ve tümör biyolojisinde meydana gelen değişimlerin yeni nesil antiandrojen bir ilaç olan apalutamid terapötik yanıtlarındaki değişimle olası ilişkilerin ortaya konması amaçlanmıştır.

Prostat kanseri mikroçevresinin önemli immün hücrelerinden olan TAM'ların tümör hücre biyolojisi ve antiandrojen ilaç (apalutamid) terapötik yanıtları üzerinde oluşturduğu etkiler *in vitro* desende araştırılmıştır. M1 polarize TAM'ların oluşturduğu enflamatuar çevresel stresin, PK tümör biyolojisi üzerine olan etkileri (AR sinyalizasyonu, ER stresi, KPY ve entegre stres yanıtları, neovaskülarizasyon, karsinogenez, tümör hücre invazyon migrasyon ve metastatik potansiyeline işaret eden EMT, tümör hücre köklülük ve intraselüler redoks dengesindeki değişim ile DNA hasarı, hasar tamir yanıtı ve apoptozis) araştırma hedefleri olarak belirlenmiştir.

Bu tez projesinde, M1 polarize TAM kaynaklı enflamatuar çevresel stresin, LNCaP hücresinde indüklediği ER stres, KPY ve selüler entegre stres yanıtı ile birlikte tümör biyolojisinde oluşturdukları farklı etkilerle birlikte AR sinyal yolağı aktivitesinde oluşturduğu değişim ve apalutamid terapötik yanıtlarında azalma ile birlikte antiandrojen ilaç direnci gelişiminde rol oynayabileceği hipotezi test edilmiştir.

“TAM kaynaklı enflamatuar çevresel stres, hormon duyarlı prostat kanser hücresinde ER stres, KPY ve entegre stres yanıtı ile birlikte tümör biyolojisinde oluşturacakları farklı etkilerle androjen reseptör sinyal yolağı aktivitesinde artış ve apalutamid terapötik yanıtlarında azalma ile birlikte antiandrojen ilaç direnci gelişiminde rol oynayabilir mi?” araştırma sorusu olarak belirlenmiştir.

U937 hücreleri M1 ve M2 polarize makrofajlara farklılaştırılmaları sonrasında, sekrete edilen substansların [pro-enflamatuar/anti-enflamatuar sitokin ve reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin] kantitatif analizleri ile metabolik karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. AR antagonistlerine karşı gelişen ilaç direnci, WST-1 sitotoksisite deneyleri ile, DNA hasarı, hasar tamir mekanizmaları ve kaspaz aracılı apoptotik hücre ölümü sırasıyla p-H2A.X, kırılmış PARP proteinlerinin WB deneyi ve kaspaz-3 aktivitesinin immünfloresan yöntemle araştırılması gerçekleştirilmiştir. Tümör biyolojisindeki etkinin [yeni nesil AR antagonisti ilaçlara karşı gelişen dirençte ER stresi, KYP ve entegre stres yanıtlarının rolü ve bu selüler adaptif yanıtların karsinogenezde etkili olan sinyal yollarıyla ilişkisi ve prostat kanserinde AR sinyal yolağının blokajını hedefleyen terapilere karşı gelişen dirençte sorumlu tutulan faktörlerden başlıcaları olan tümör hücre transdiferansiasyonu (nöroendokrin transformasyon), köklülük ve epitelyal mezenkimal transizyon], seçilen hedef gen ifadelerindeki değişimlerin qRT-PCR analiziyle belirlenerek çevresel enflamatuar stresin tümörögenezdeki rolünün ortaya konması hedeflenmiştir.

3. YÖNTEM

Bu tez projesinde araştırma deseni, *in vitro* yöntem esas alınarak oluşturulmuştur. Ulaşılmak istenen araştırma hedefleri ve hipotez sorusuna yanıt vermesi beklenen çıktılar doğrultusunda hormon duyarlı prostat adenokarsinom hücresi LNCaP kanser hücre hattı ve tümör ilişkili makrofajların oluşturduğu enflamatuar tümör mikroçevresinin *in vitro* modelinin oluşturulmasında U937 promyelositik hücre hattı monositler hücre serisi olarak tercih edilmiştir. Deney aşamaları, KOÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi ve KOÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hücre Kültürü

Tez çalışmasının hücre kültürü deneyleri 2 aşamada gerçekleştirilmiş olup, deney aşamalarının bütünü Tablo 3.2 ve Şekil 3.1-3.2'de özet olarak sunulmaktadır.

1. Aşama: *In vitro* enflamasyon modelinin oluşturulması. U937 monosit hücreleri, 48 saat 160 nM Forbol-12-miristat-13-asetat (PMA) ile uyarılarak M0 matür makrofaj farklılaşması uyarıldı (Yang ve ark., 2017). Devamında 24 saat 10 ng/ml LPS ve 20 ng/ml IFN- γ uyarımı ile M1 polarize TAMs farklılaşması gerçekleştirildi (Abdulhadi, 2014; Sezikli, 2016; Sharp, 2013). M1 polarize TAM kültür medyumunu hücresel içerikten arındırıldıktan sonra medyum aktif substans içeriğinin kantitasyonu [sitokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-10 ve IL-12) ve nitrojen oksit ve hidrojen peroksit miktarlarının biyokimyasal analizleri] ile metabolik karakterizasyonu gerçekleştirilerek değerlendirildi. Son olarak içerik analizi gerçekleştirilen koşullu besiyerinin (KB) LNCaP hücrelerine tatbiki ile *in vitro* TAM kaynaklı enflamatuar tümör mikroçevresi modeli oluşturuldu (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).

2. Aşama: Normal kültür koşullarında çoğalmaları sağlanan LNCaP hücreleri, dekstran 70 kaplı aktif kömür ile muamele edilerek steroidden arındırılan serum ile kültüre edilerek hormondan arındırma işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında DHT uygulaması ile AR sinyal yolağı uyarımı gerçekleştirildi. Enflamatuar stresin modellendiği hücre gruplarında KB, LNCaP kültür ortamı olarak uygulanmasıyla gerçekleştirildi. M1 polarize TAM kaynaklı enflamatuar uyarımla ER stresi ve KPY'ı ile entegre stres yanıtları aktive edilen LNCaP hücrelerinde tümör biyolojisindeki değişimle birlikte, antiandrojen apalutamid terapötik

U937 monosit hücre hattı (ATCC® CRL-1593.2), 37 yaşındaki histiyositik lenfomalı bir erkek hastanın plevral efüzyonundan elde edilmiş insan hematopoietik hücre hattıdır. U937 hücreleri pro-monositik özellikler sergilemektedir (Chanput ve ark., 2015). LNCaP hücre hattı (ATCC® CRL1740), primer tümörden türevlenen iyi farklılaşmış, prostat adenokarsinomu olan hastanın lenf nodu metastazından elde edilmiş yüzeye bağımlı gelişim gösteren hücrelerdir. Prostat kanserinde AR sinyal mekanizmaları ve hormon duyarlı prostat tümör biyolojisi üzerine yapılan araştırmalarda sıklıkla tercih edilen, uzun yıllardır çalışılmakta olan hücre hattıdır (Horoszewicz ve ark., 1980; Horoszewicz ve ark., 1983). Fonksiyonel AR ile androjen uyarısına duyarlı olup prostat spesifik antijen (PSA) salgılamaktadır. p53 tümör baskılayıcı gen ifadesi durumu, doğal tip şeklinde tanımlanmaktadır. (Sampson ve ark., 2013). LNCaP hücreleri, AR geninde T877A nokta mutasyonuna sahiptir. Bu mutasyon, birinci jenerasyon antiandrojen olan bikalutamidin AR genomik aktivitesini inhibe etmesi şeklindeki beklenen etki yerine artışa neden olarak parsiyel agonist etkinlik sergilemesine neden olmaktadır (Gao ve ark., 2005). Ayrıca AR LBD stereokimyasında meydana getirdiği değişimin ligand özgüllüğünde azalmaya neden olması dolayısıyla, AR'nin farklı moleküller (flutamid, östradiol, progestin ve kortikosteroidler) tarafından uyarılabilir duruma gelmesinde rol oynamaktadır (Marques ve ark., 2011; Navone ve ark., 1997). LNCaP hücre hattı Prof. Dr. Suat ERDOĞAN, U937 hücre hattı Prof. Dr. Devrim ARSLAN tarafından Fatih HUNÇ'a bağışlanmıştır.

Tablo 3.2. Çalışmanın hücre kültürü deneyleri aşamasında kullanılan kimyasal maddeler, sarf malzemeler ve kitler.

Kimyasallar	Katalog Numarası	Marka
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 1 mg	sc-3576	SANTA CRUZ
Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4	L2630-10MG	SİGMA
2',7'-Dichlorofluorescein diacetate	D6883-50MG	SİGMA
WST-1 Cell Proliferation Assay Kit	10008883	CAYMAN
2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine	T1253-10G	SİGMA
Dihidrotestosteron 1 g (4,5 α -Dihydrotestosterone, 10300-1G-F Sigma)	10300	SİGMA
Activated charcoal	C9157-500G	SİGMA
Apalutamide 5 mg	A11923	ADOOQ

Fosfataz inhibitör kokteyli PhosSTOP	04906845001	ROCHE
Phenylmethylsulfonyl Fluoride 1x250MG	P7626-250MG	Sigma-Aldrich
DL-DITHIOTHREITOL 1x1G;	D0632-1G DL	Sigma-Aldrich
Hepes Free Acid, Biotechnology Performance Certified 1x25G	H4034-25G	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 with L-Glutamine	E0500-330	CEGROGEN
S. American-Origin Fetal Bovine Serum 500 ml	BI04-007-1A	BIO IND.
Penicilin-Streptomycin Solution	P0100-790	CEGROGEN
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix UNG	08-36-00001	Solis Bio Dyne
One-Run RT Q-PCR Sistemi 2X	18R-01-100	SNP
GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Kit for purification of total RNA)	E3598-02	EURx
0,04 µmol (40 nmol) Primer Standart	BM-Prmr004	METABION
200 nmol Primer Desalting Katalog No: Primer 200	BM-Prmr004	METABION
Trypsin EDTA Solution B (%0.25), EDTA (%0.05)	BI03-052-1B	BIO IND.
Dulbecco's PBS without Calcium and Magnesium	BI02-023-1A	BIO IND.
N-Acetyl-L-cysteine Sigma Grade, ≥99% (TLC), powder 5g	A7250-5G	Sigma-Aldrich
Recombinant Human IL-4, 20µg	200-04	PeproTech
Ammonium Monovanadate 100 Gr For Analysis	S-101226.0100	MERCK
N-Acetyl-L-cysteine 5G	A7250-5G	SIGMA
6-Aminonicotinamide, 1 g	sc-278446	Santa Cruz
Sarf Malzeme ve Kitler	Katalog Numarası	Marka
Cell Culture Flask with Filter Cap, PS, 75 cm ² TC treated Sterile to SAL10	SPL70075	SPL
1000 µL Universal pipette tips, Steril, Filter	PPT151000	JET BIOFIL

Filtreli Pipet ucu 1000 ul 96 lık	PX1000-H-ST	DPLASTIC
50 ml centrifuge tube, conical bottom, screw cap, loose (sterile) clear-green	E1450-0100-1	Starlab
Syringe Driven Filters 25 mm, 0.22 µm PER, Green, Sterilized	FPE204025	JET BIOFIL
96-Well PCR Plate, Semi-Skirted, Low-Profile (for Roche Systems)	I1402-9909	Starlab
Optical Sealing Membrane qPCR 96 Well Plate (ABI 4131971)	NB-QSM	New Bioscience
Sigma-Aldrich Anti-Caspase 3 Antibody, active (cleaved) form	AB3623	Millipore
4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI, 10 mg	sc-3598	Santa Cruz
m-IgG1 BP-HRP	sc-525408	Santa Cruz
Apoptosis and DNA Damage (H2A.X(S139) + cleaved PARP1 + Anti-GAPDH) Western Blot Cocktail	ab131385	ABCAM
Human IL-1β (Interleukin 1 Beta) ELISA Kit	E0143Hu	BT-LAB
Human IL-6 (Interleukin 6) ELISA Kit	E0090Hu	BT-LAB
Human TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit	E0082Hu	BT-LAB
Human Interleukin 12 (IL-12/P70) ELISA Kit 96 lık	E0099Hu	BT-LAB
Human Interleukin 10 (IL-10) ELISA Kit	E0102Hu	BT-LAB
Human transforming growth factor beta ELISA	E3051Hu	BT-LAB

3.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

Kriyo tüplerde 1×10^6 hücre içerecek şekilde kriyoprotektan ile birlikte alikvatlanarak dondurulan ve $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan U937 (pasaj 7) ve LNCaP (pasaj 24) hücreleri, deney günü dondurucudan alındı. Hemen akabinde önceden $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılmış su banyosunda çözülene kadar bekletildi. Sonrasında hücreler bir falkon tüpe aktarıldı. Ardışık olarak 1600 rpm de 5 dk'da 2 kez santrifüj edilerek dondurma solüsyonundaki DMSO'nun ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı. Süre bitimiyle 20 µl hücre süspansiyonu 20 µl tripan mavisile boyandı, karışması sağlandıktan sonra hücre sayım slaytının haznesine 10 µl

kadar pipetlenerek otomatik hücre sayım cihazında (TC20™ Automated Cell Counter #1450102-Bio-Rad; California, ABD) canlı hücre sayımı gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler, kültür kabındaki 37 °C'ye kadar ısıtılmış 8 ml ortam üzerine ilave edilerek T75 flaskları içerisinde hücre ekimi gerçekleştirildi.

3.1.2. Hücre Pasajı

LNCaP ve U937 hücreleri önerilen besiyerlerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş 37 °C'lik etüvde 2 mM L-Glutamin içeren RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institution) besiyerine %10 FBS (fetal sıgır serumu; ısıl işlem görmüş) ve %1 penisilin/streptomisin (100 U/ml) eklenmesi ile elde edilen tam besiyerinde büyütüldü. Adeziv hücre hattı olan LNCaP hücreleri, yüzeyin %80'nini doldurma (yoğunluk, konflüent) durumlarına göre 2-3 günde bir pasajlandı. Non-adeziv hücre hattı olan U937 hücreleri de benzer periyotlarda hücre yoğunluk miktarları ve besin tüketimi durumları gözetilerek pasajlandı. Pasaj işleminde hücrelerin logaritmik proliferasyon fazında tutulmasına özen gösterildi. Kimyasal uygulama aşamalarında deney planına bağlı olarak pasajları gerçekleştirdi. Hücrelerin yetiştirilmesi ve pasajlamalar hücre kültür laboratuvarımızdaki optimize protokoller çerçevesinde gerçekleştirildi.

İlk olarak ortam cam pastör pipeti yardımıyla vakum etkisiyle uzaklaştırıldı. Rezidü serum ve ortamın da tam olarak uzaklaştırıldığından emin olunması ile steril PBS ile bir kez yıkandı (Trypsin-EDTA uygulamasının etkinliğini azaltacağından PBS'in Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermemesine dikkat edildi). PBS uzaklaştırılması sonrasında 0,5 ml %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde 2-3 dakika hücreler kalkana kadar bekletildi. Hücreler kaldırıldıktan sonra içerisinde 10 ml kadar PBS solüsyonu konulan 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Hücrelerin tekrar ekimi için pellet eldesi gerçekleştirildi. Bu amaçla kaldırıldıktan sonra falkon tüplere alınan hücreler 10 dakika kadar 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve alttaki hücre pelleti taze olarak hazırlanmış besiyeri ile süspanse edilerek çözüldü. Falkon tüplerde çözündürülme işlemi gerçekleştirilen hücreler yeni kültür kaplarındaki ortamın üzerine aktarılacak %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş 37 °C sıcaklığındaki etüvde inkübe edildi. Süspansiyon hücre kültürü özelliği gösteren U937 hücrelerinin M1 polarize makrofaj farklılaştırma süreçleri T25 ve T75 kültür flasklarında iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Bir sonraki aşamaya geçiş öncesinde hücreler hemositometrede sayılıp uygun miktarda hücre sayısı ile pasajlama gerçekleştirildi. Hücreler yoğunluk miktarlarına göre büyütüldü.

3.1.3. Hücrelerin Dondurulması

Hücre pasajı sonrasında %80 konfluent olan hücrelerin bir kısmı ileride gerçekleştirilecek çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Diğer tüm hücre hatlarında uzun süreli kültüre (belli bir pasaj numarasını aşılmasıyla yaşa bağımlı bozulmalar) bağlı olarak gözlemlenen değişimler U937 hücrelerinde 20 pasaj sonrasında hücrelerin kullanılmaması önerisini beraberinde getirecek boyutlarda hızlı meydana gelmektedir ("Amara® Cell Line Nucleofector® Kit C," 2009). İleri pasaj U937 hücreleri, büyüme ve morfolojik özellikleri yanı sıra fonksiyonel ve karyotipik değişimlerle spontan transformasyona uğramaktadırlar. Hücrelerin dondurularak çok daha uzun süre özelliklerinde değişim yaşanmadan saklanabilmesi dolayısıyla kültür çalışmalarında hücre dondurma gerçekleştirilmektedir. Çalışma süresince, hücreler belirli pasaj numaralarında dondurulmaları önerilir. Steril kriyoprotektan solüsyonu %40 FBS'nin %10 DMSO ile karıştırılması sonrasında %50 RPMI 1640'ın ilavesi ile oluşturuldu. Hücre pasajı kısmında anlatıldığı şekliyle pasajlama bitiminde hücrelerin Tripsin/EDTA ile kaldırılması aşamaları gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası falkon tüpte pellet halindeki hücrelerin üzerine 1 ml kriyoprotektan eklenerek hücre süspansiyonu elde edildi. Kriyo solüsyonu içerisinde çözölen hücreler, dondurulacak hücre bilgilerinin uygun şekilde etiketlendiği kriyoviallere aktarıldı ve -86 °C'de 1 gece boyunca donmaları sağlandıktan sonra -152 °C'deki dondurucuya alındı.

3.1.4. İlaçların Hazırlanması

Deneylerde kullanılan forbol 12-miristat 13-asetat (PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate), lipopolisakkarit (LPS), interferon gama (IFN- γ), dihidrotestosteron (DHT), apalutamid (APA) ilaçlarının tümü dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldü. Tüm ilaçlar uygulamaları, herbir uygulama için eş deney tasarımına sahip çalışmalarda belirtilen optimum konsantrasyon ve sürede gerçekleştirildi. PMA U937 hücrelerinin M0 nonpolarize matür makrofaj hücrelerine farklılaşmasında kullanıldı. 24 saat dinlendirilmeleri sağlandıktan sonra LPS ve IFN- γ M1 polarize makrofajlara farklılaştırılması deneylerinde kullanıldı. Dekstran 70, aktif kömürün kaplanması kullanıldı. Dekstran 70 ile kaplanmış aktif kömür FBS'nin steroidden arındırılması işlemi için gerekmektedir. DHT, LNCaP hücrelerinde androjen reseptör sinyalizasyonunu sağlanmasında kullanılırken, APA, LNCaP hücrelerinde antiandrojen etkinlik oluşturan antikanser ajan olarak terapötik etkinliğinin, M1 polarize tümör ilişkili makrofaj kaynaklı enflamatuar mikroçevrede

indüklenen ER stres, katlanamış protein yanıtı özelinde entegre stres yanıtları ile tümör biyolojisinde meydana gelen değişimle birlikte ne şekilde değişkenlik göstereceğinin araştırılmasında kullanıldı. DMSO ile çözülen tüm ilaçlar ileride kullanılmak üzere kimyasallarda aktivite kaybına sebebiyet verebilecek olan dondur-çöz siklusuna girmeyecekleri hacimlerde mikrosantrifüj (ependorf) tüpler içerisinde alikuatlanarak -20 °C sıcaklığındaki dondurucuda saklandı. İlaçların uygulama dozları aşağıdaki formülde verildiği şekilde hesaplanarak uygulamalar gerçekleştirildi. LNCaP hücre kültür deneylerinde kontrol grupları DMSO ile oluşturuldu.

$$\frac{C_{stok}}{C_{uygulama}} = \frac{V_{uygulama}}{V_{stok}}$$

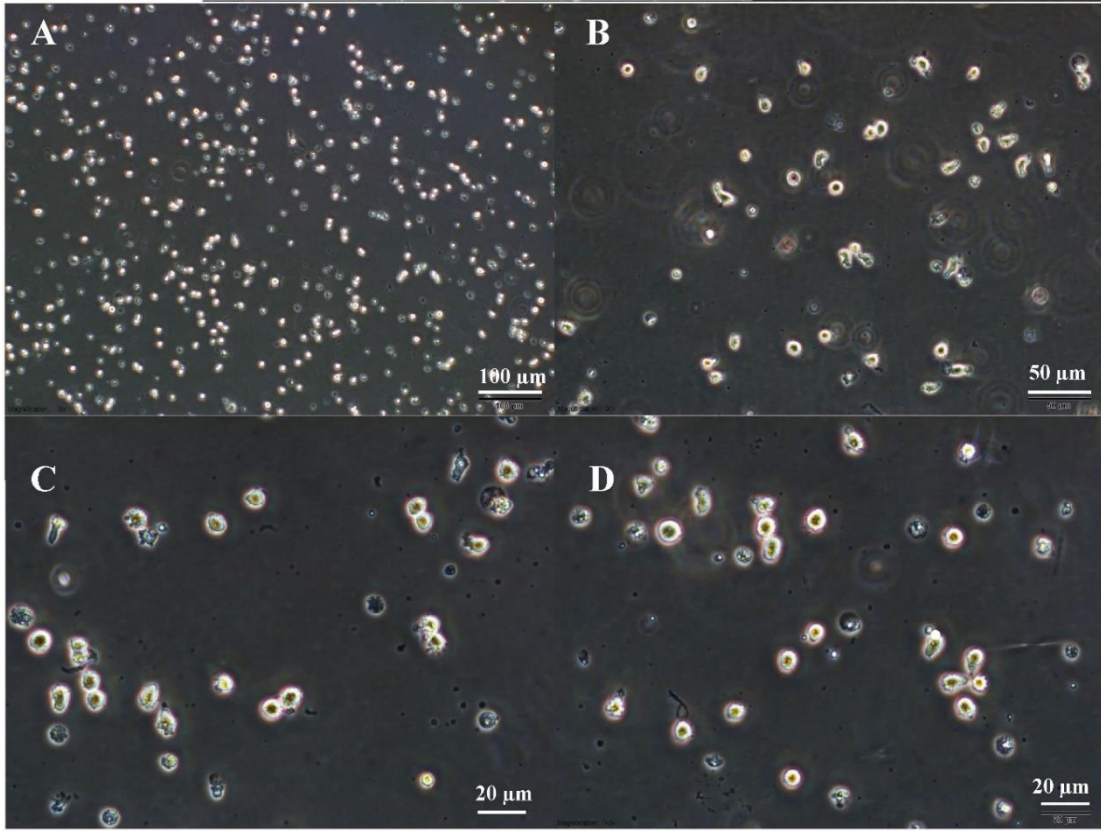
C_{uygulama}: Kültür ortamında uygulanacak ilaç konsantrasyonu
C_{stok}: DMSO ile hazırlanan stok çözeltideki ilacın konsantrasyonu
V_{uygulama}: İlacın ekleneceği kültür ortamı toplam hacmi
V_{stok}: DMSO ile hazırlanan ilaç çözeltisinden alınacak hacim

Şekil 3.3. İlaçların uygulama dozlarının hesaplanması.

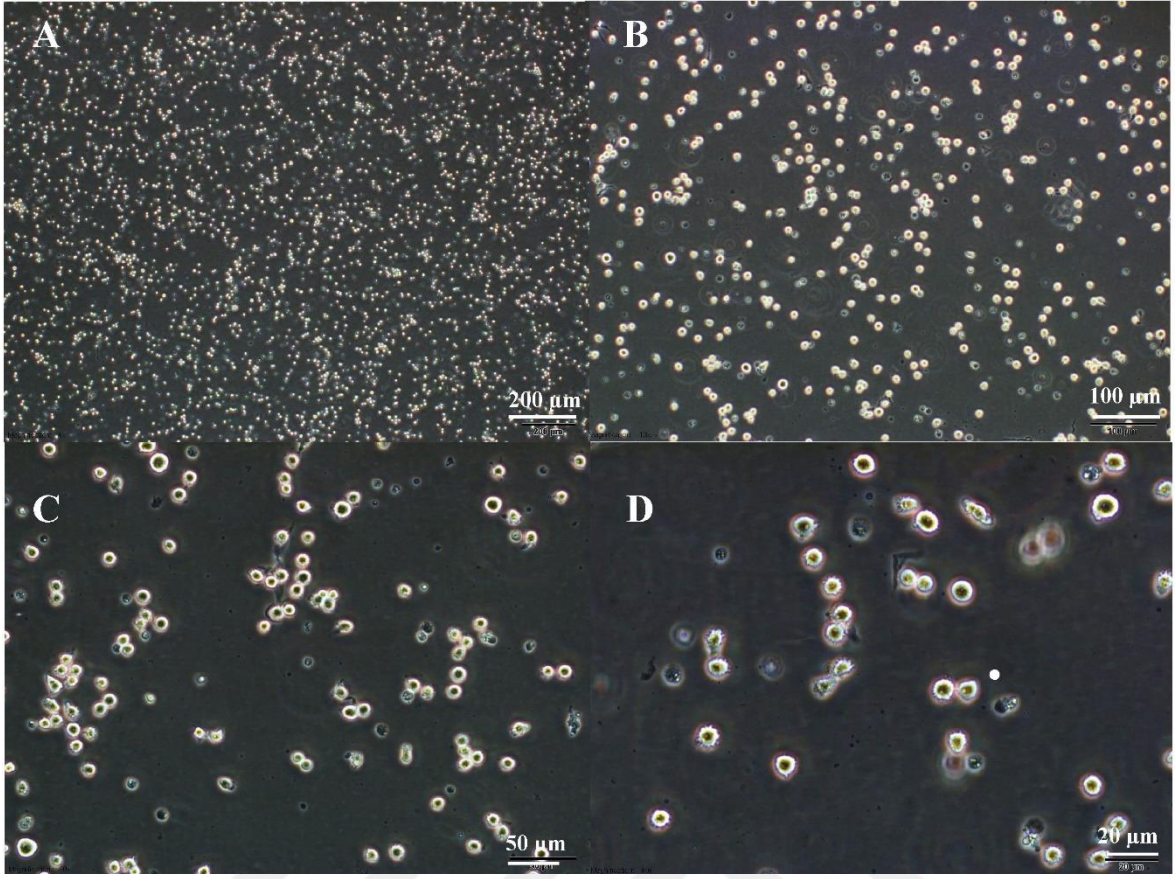
3.1.5. Makrofaj Hücre Farklılaşması

U937 hücrelerinin kimyasal uyarımla sırasıyla M0 nonpolarize matür makrofaj ve M1 polarize makrofaj hücrelerine farklılaştırılması gerçekleştirildi. Hedeflenen M1 polarize makrofaj farklılaşmasının sağlanması sonrası koşullu besiyerinin eldesi için yeter sayıda hücrenin (75 cm² kültür flaskı için 8 × 10⁶ hücre) ekimi gerçekleştirildi. Bu doğrultuda U937 hücreleri %10 FBS içeren RPMI-1640 besi ortamı içerisinde 37 °C’de, %5 CO₂’li inkübatörde çoğaltıldı. Yeterli sayıda hücrenin çoğalması sonrasında farklılaşma deneylerinin gerçekleştirileceği T75 flaskına 8 × 10⁶ hücrenin ekimi gerçekleştirildi. 2 saat kadar beklenildikten sonra U937 hücreleri 160 nM PMA ile 48 saat süresince M0 nonpolarize matür makrofaj hücrelerine farklılaştırıldı. U937 monosit hücrelerinin makrofaj hücrelerine farklılaşması hücrelerde yapışma ve fenotipik değişiklikler açısından invert doku kültürü mikroskopunda gözlemlenerek doğrulaması gerçekleştirildi. T75 flaskı kültür ortamı bir falkon tüp içerisinde toplandı, 200 g 5 dakika santrifüj edildi. Üstte yer alan süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile 2 kez yıkandı (Cordier ve ark., 2013). 8 ml kadar taze kültür ortamı ile ayrı bir flask içerisine ekimi gerçekleştirildi. M0 matür makrofaj hücrelerine uyarılan hücrelerin M1 polarize makrofaj hücrelerine farklılaştırılmasından önce 24 saat kadar normal kültür ortamında dinlenmeleri sağlandı. Daha sonra 10 ng/ml LPS ve 20 ng/ml IFN-γ uygulaması gerçekleştirildi. Hücreler bu

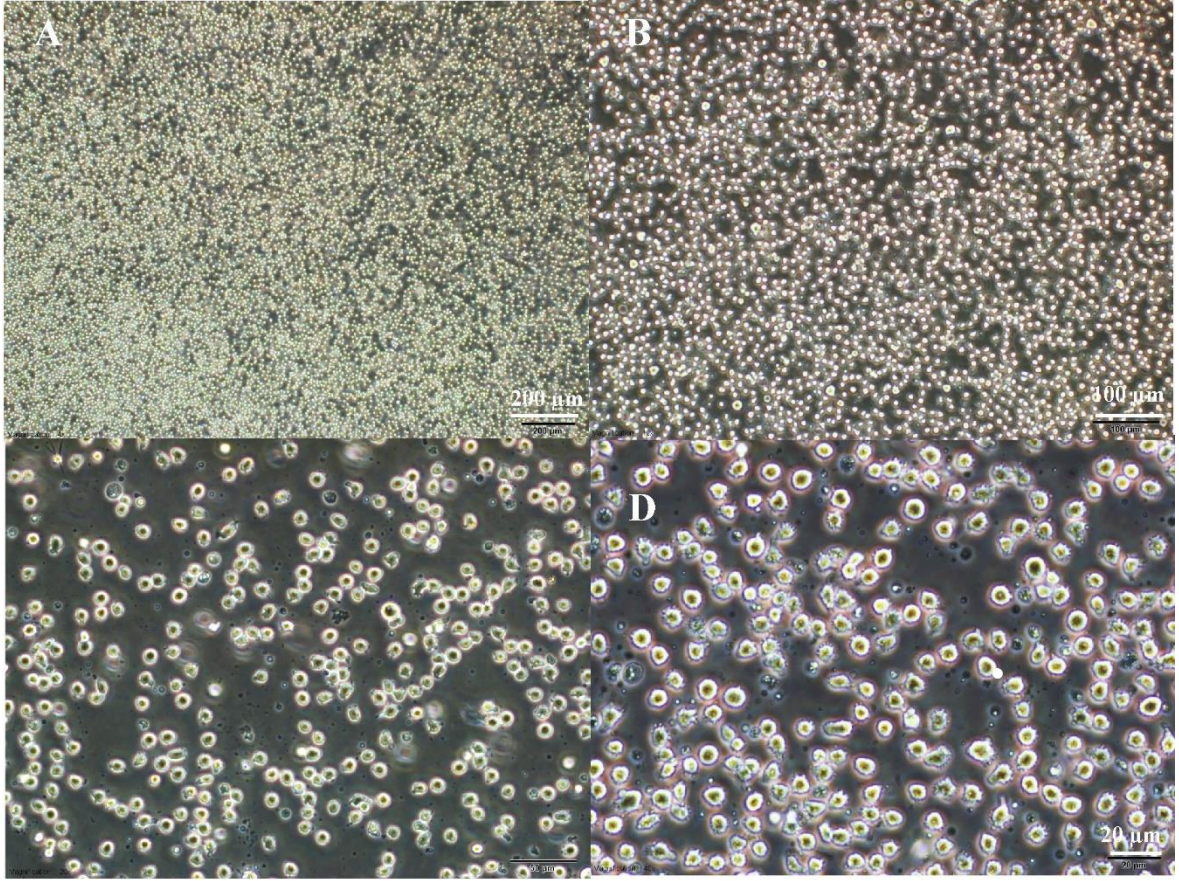
şekilde 24 saat kültüre edilerek M1 polarize makrofaj farklılaşmasının indüksiyonu gerçekleştirildi. Makrofaj hücre kültürü süresince kullanılan FBS içeriğinin AR sinyalizasyon süreçlerini içeren araştırmanın LNCaP hücre kültürü çalışmalarını interfere edeceği öngörüldü. FBS içeriğinin oluşturması muhtemel interferansın azaltılması adına taze kültür ortamında iki paralel deney planlandı. 24 saat ve 48 saat FBS içermeyen kültür ortamında inkübe edilen M1 polarize makrofajların metabolik aktiviteleri (NO_x ve H_2O_2 düzeyleri ile sekrete ettikleri sitokin miktar ve profilleri belirlendi) ve LNCaP hücre canlılıkları üzerine olan etkilerinin karşılaştırıldığı ön çalışmada 24 saatlik FBS içermeyen kültür ortamının araştırma planına daha uygun olduğuna karar verilmesiyle deney süreçleri bu şekilde planlandı. Ayrıca FBS içermeyen taze besi ortamı öncesi M1 polarize makrofaj hücreleri 2 kez PBS ile yıkanarak indüksiyonda kullanılan ortamdaki PMA, LPS ve IFN- γ kimyasalların uzaklaştırılması sağlandı (Şekil 3.4-Şekil 3.10).



Şekil 3.4. Normal hücre kültür ortamında 24 saat boyunca yetiştirilen pasaj 8 U937 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.

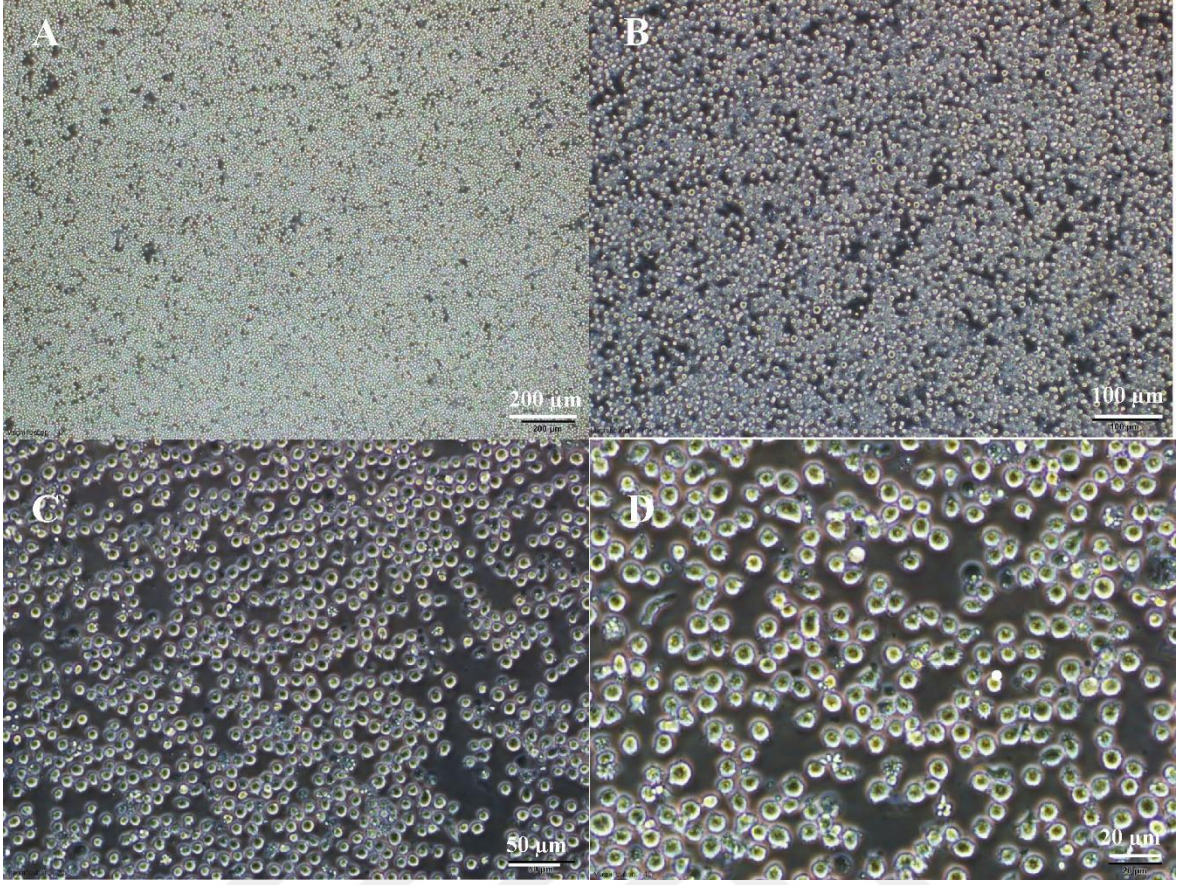


Şekil 3.5. Normal hücre kültür ortamında 24 saat boyunca yetiştirilen U937 (pasaj 9) hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.

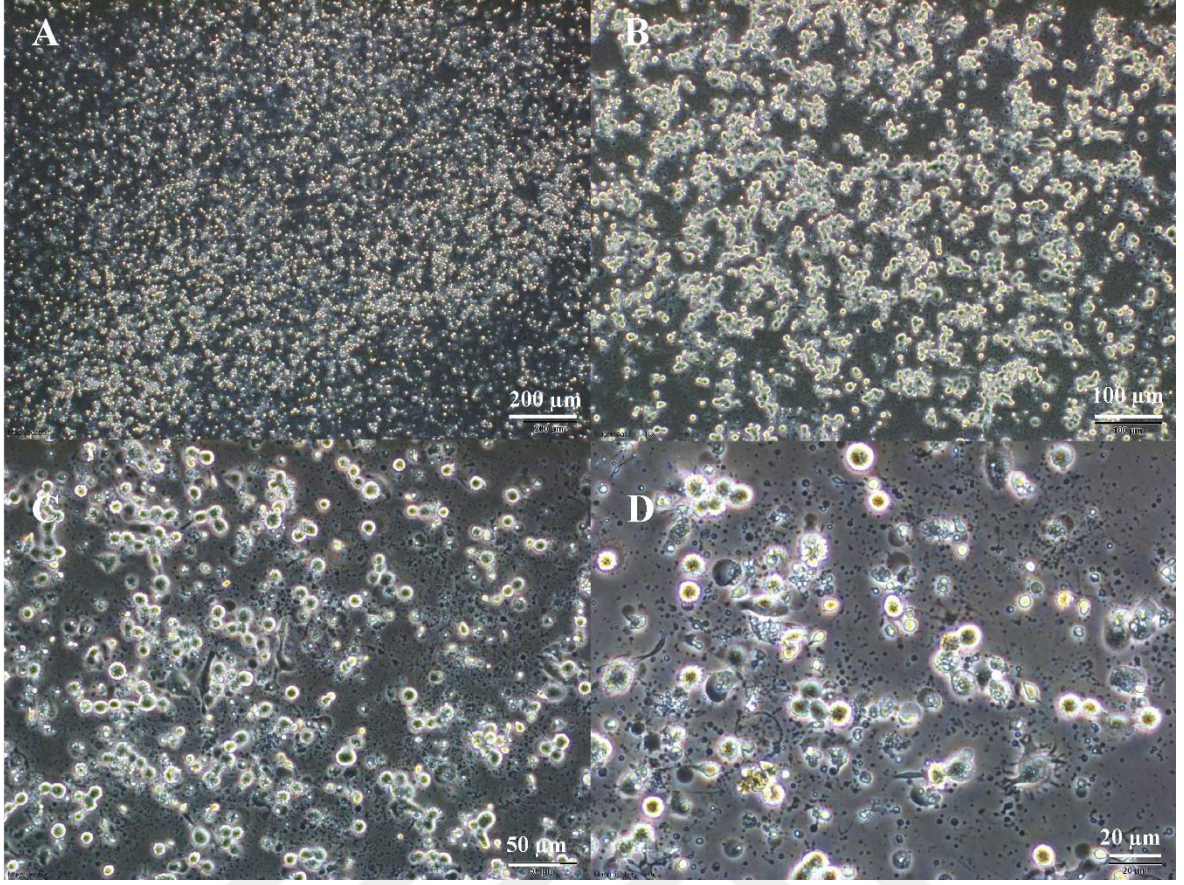


Pasaj 9 U937 hücreleri 160 nM PMA ile 48 saat normal kültür ortamında uyarılmıştır.

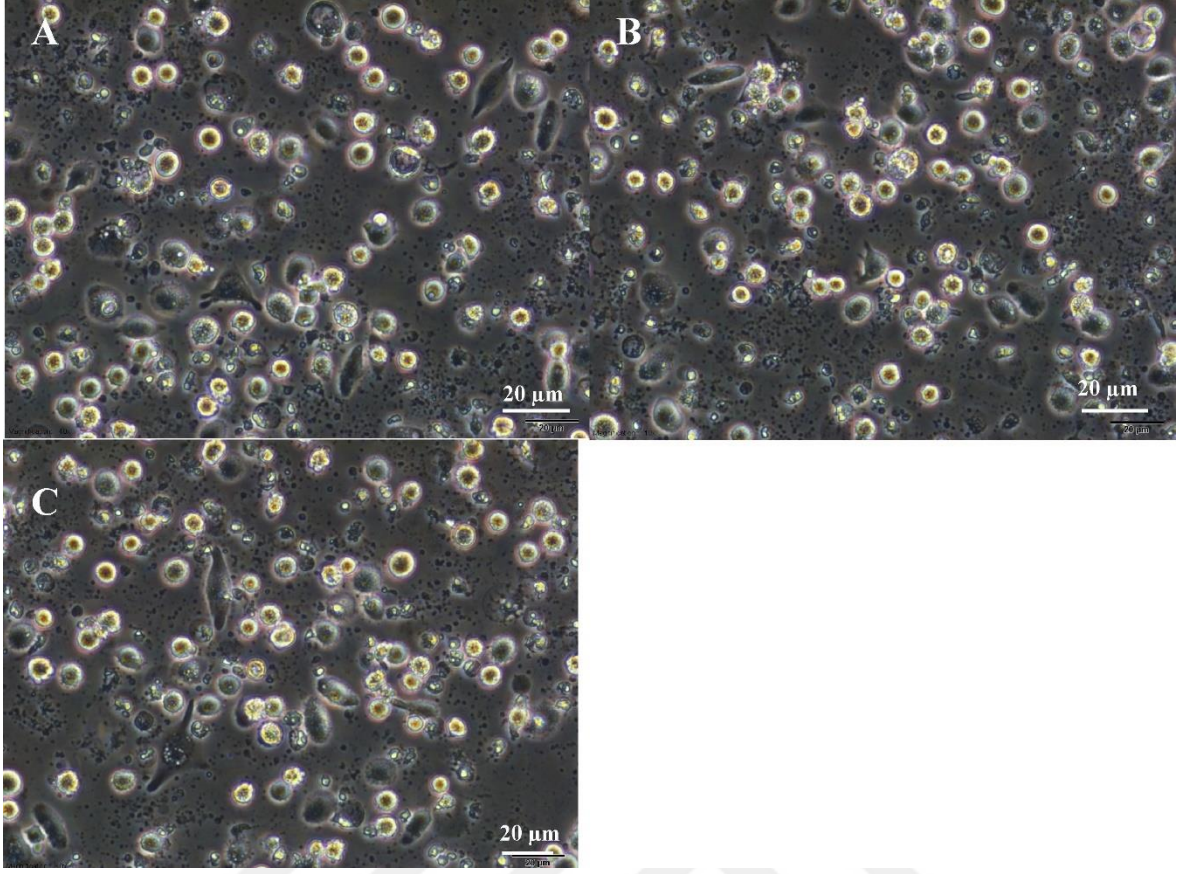
Şekil 3.6. M0 nonpolarize matür makrofaj hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.



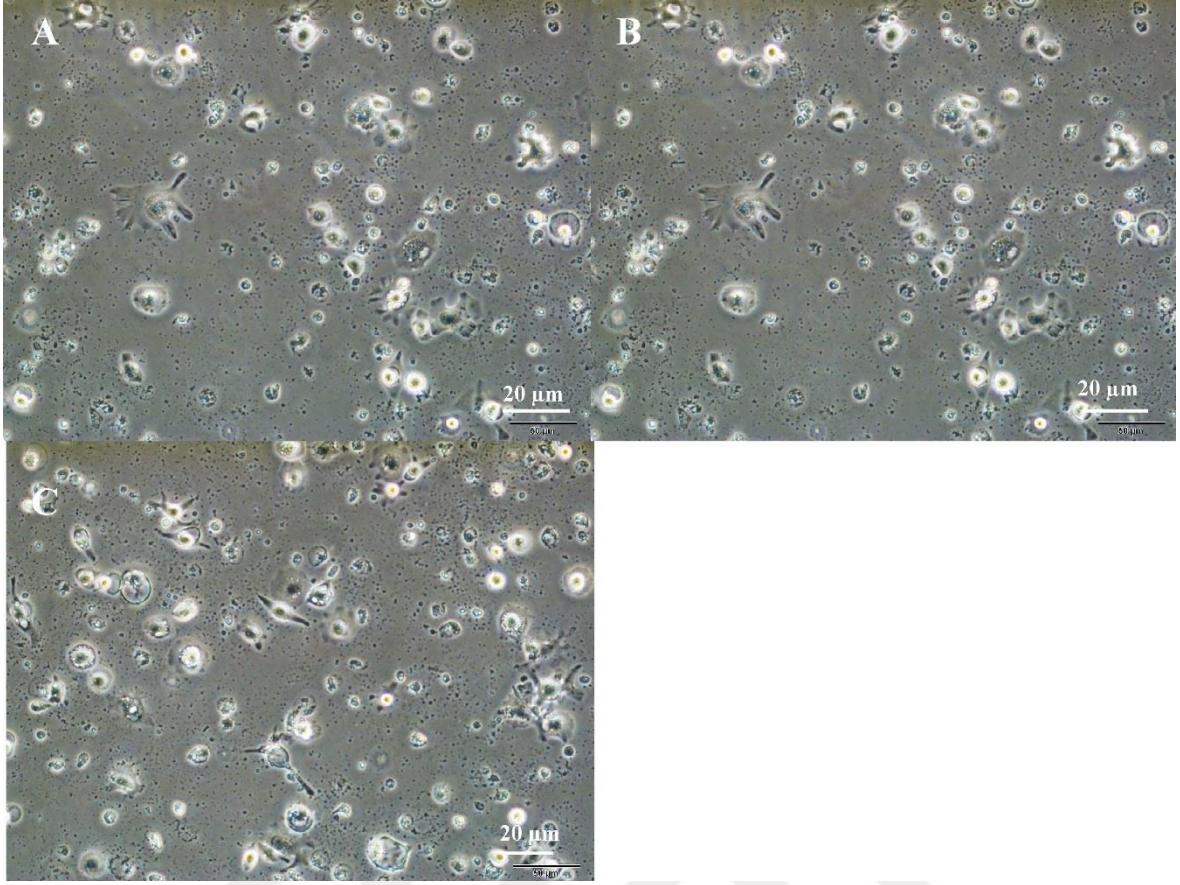
Şekil 3.7. LPS ve IFN- γ uygulaması ile M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyonun hemen sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 3.8. M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyon sonrası FBS içermeyen taze kültür ortamında 24 saat kültürü sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 3.9. M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyon sonrası FBS içermeyen taze kültür ortamında 48 saat kültürü sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 3.10. M1 polarize makrofajlara farklılaştırılan hücrelerin indüksiyon sonrası FBS içermeyen taze kültür ortamında 48 saat kültürü ve ikinci defa tazelenen kültür ortamında 48 saatlik kültürü sonrasındaki ışık mikroskobu görüntüleri.

3.1.6. Koşullu Besiyerinin Eldesi

M1 polarize makrofaj farklılaşması sağlandıktan sonra makrofaj hücre kültür ortamı steril falkon tüpü içerisine toplandı. Falkon tüplerde toplanan kültür ortamı, hücresel bileşenlerden arındırılması için ilk olarak 350 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 0,2 μm 'lik filtreden geçirildi. Bu işlemlerin tamamlanmasıyla hücre içermeyen koşullu besiyeri (KB, conditioned medium) eldesi gerçekleştirildi. Falkon tüplerde uygun şekilde etiketlenen KB, *in vitro* enflamatuar tümör mikroçevresi modelinin gerçekleştirileceği LNCaP hücre kültür ortamına tatbik edileceği deney aşamasına kadar -86 °C'de saklandı.

3.1.7. Koşullu Besiyerinin Aktif Substans İçeriğinin Belirlenmesi

Dondurucu içerisinde saklanan hücre içermeyen koşullu besiyeri (KB) LNCaP hücre kültür ortamı olarak uygulanacağı deney günü çözündürüldü. Hemen akabinde KB içeriğindeki IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, TGF- β , IL-10 sitokinlerinin ELİSA ile

kantitatasyonu gerçekleştirdi. Ayrıca H₂O₂ ve nitrojen oksitler (nitrik oksit metabolitleri, nitrit/nitrat, NO_x) düzeyleri kolorimetrik biyokimyasal analizlerle gerçekleştirilerek çeşitli bioaktif moleküllerin belirlenmesi ile M1 polarize makrofaj hücrelerin metabolik karakterizasyonları gerçekleştirildi (Van den Bossche vd., 2015).

3.1.8. FBS'nin Steroidden Arındırılması

FBS dekstran 70 ile kaplanmış aktif kömürle muamele edilerek steroidden arındırılmış FBS (CS-FBS; charcoal stripped-FBS) elde edilmiştir. Bu işlem, ısıl işleme tabi tutularak steroid dışındaki büyüme faktörleri inaktive fetal sığır serumunun dekstran kaplı aktif kömür ile muamelesi yoluyla gerçekleştirildi (Oakey, 1988). Bu şekilde serumdaki östrojen hormon seviyelerinin 10 pM seviyelerinin altına indirildiği bildirilmektedir. Bu doğrultuda 250 mg (final konsantrasyonu %0,25) aktif kömür (53663, Activated Charcoal Norit®, Sigma-Aldrich, ABD) ve 2,5 mg (final konsantrasyonu %0,0025) Dekstran 70 (D882, Sigma) 0,25 M sükröz/1,5 mM MgCl₂/10 mM HEPES (Hepes Free Acid, H4034-25G, Sigma-Aldrich) pH 7,4'de bir falkon tüpü içerisinde içerisinde çözöldü. 500 g 10 dakika santrifüj edilerek kömürlerin pellet halinde çökmesi sağlandı. Süpernatant kısmı atıldı, tüpün dibindeki aktif kömür steril deiyonize su ile tekrardan solösyon halinde getirildi. İkinci defa 500 g 10 dakika santrifüj edilerek kömürlerin pellet halinde çökmesi sağlanarak süpernatant atıldı. Dipteki dekstran 70 ile işlenmiş pellet halindeki aktif kömürün 253 mg'ı 100 ml FBS'nin steroidden arındırılması için kullanılabilir. Bu şekilde 5 ml serumun steroidden arındırılması için aktif kömür pelletinden 12,65 mg tartıldı ve falkon tüpte serum ile karıştırdı. 12 saat süresince 4 °C'de vorteksle karışması sağlandığı halde inkübe edildi. Dekstran T-70 ile kaplanmış aktif kömürle muamele edilerek steroidden arındırılan falkon tüp içerisindeki FBS 2000 rpm'de 30 dk. santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında toplanan kömür moleküllerinin tamamının uzaklaştırılması adına iki kez 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. Bu şekilde kullanıma hazır steroid hormonlardan arındırılmış CS-FBS elde edildi. Taze kullanılmayacaksa alikotlandıktan sonra kullanılacağı deney gününe kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Ayrıca, CS-FBS'nin steroid hormonda arındırma işleminin doğrulaması için testosteron, östradiol, serbest T3 ve T4 ile büyüme hormonu, total protein, albumin ve total lipid düzeylerinin analizi gerçekleştirildi.

3.1.9. LNCaP Hücrelerinin Hormondan Arındırılması

LNCaP hücreleri 24 saat süresince %2 CS-FBS (charcoal stripped-FBS) ve akabinde 2

saat kadar %0,5 CS-FBS, 2 mM L-glutamin içeren, fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640 hücre kültür besisi ortamında %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş 37 °C’lik etüvde kültüre edilerek LNCaP hücrelerinin hormondan arındırılma işlemi gerçekleştirildi (Oakey, 1988).

3.1.10. LNCaP Hücrelerinde AR Sinyalizasyonun DHT ile Uyarılması

DMSO ile çözülerek 10 nM konsantrasyonda dihidrotestosteron tüm LNCaP hücre gruplarına 24 saat süresince uygulandı (Song ve Khera, 2014). Uygulama öncesinde hormondan yoksun bırakma/arındırma (starvation) işlemi uygulanan LNCaP hücreleri DHT uyarımı için hazır hale getirilerek LNCaP hücrelerinde AR sinyalizasyonu uyarıldı.

AR sinyal uyarımı kültür ortamında prostat spesifik antijen (PSA) protein düzeylerinin elektrokemilüminesans immün ölçümü ve hücre kültür deneylerinin tamamlanması sonrasında elde edilen hücre pelletinden izole eden RNA’da PSA’yı kodlayan kallikrein 3 (KLK3) gen ifade düzeylerinin ölçümü ile belirlendi.

3.1.11. Koşullu Besiyerinin LNCaP Hücre Kültür Ortamı Olarak Kullanılması: Prostat Kanseri İn vitro Enflamatuar Tümör Mikroçevresi Modelinin Oluşturulması

24 saat süresince DHT ile AR sinyal yolağı uyarılan LNCaP hücre kültür ortamı cam pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. M1 polarize tümör ilişkili makrofajlardan kaynaklanan enflamatuar tümör mikroçevresinin modellendiği hücre gruplarında (Grup 3: M1; Grup 4: KB1+APA) kültür ortamı hücre içeriğinden arındırılmış halde -86 °C’de dondurulan, deney günü çözülmesinin akabinde biyoaktif moleküller açısından içerik analizi gerçekleştirilen koşullu besiyeri ile oluşturuldu. Hücreler 24 saat süresince *in vitro* enflamatuar çevresel stresin modellendiği kültür ortamında inkübe edildi.

3.1.12. LNCaP Hücrelerine Antiandrojen Apalutamid İlacının Uygulanması

Apalutamid uygulaması, antiandrojen ilaç terapötik yanıtlarının araştırıldığı hücre gruplarında (Grup 2: LNCaP+APA; Grup 4: KB1+APA) LNCaP hücreleri için optimum ilaç dozu olan 50 µM konsantrasyonda 24 saat süresince gerçekleştirildi.

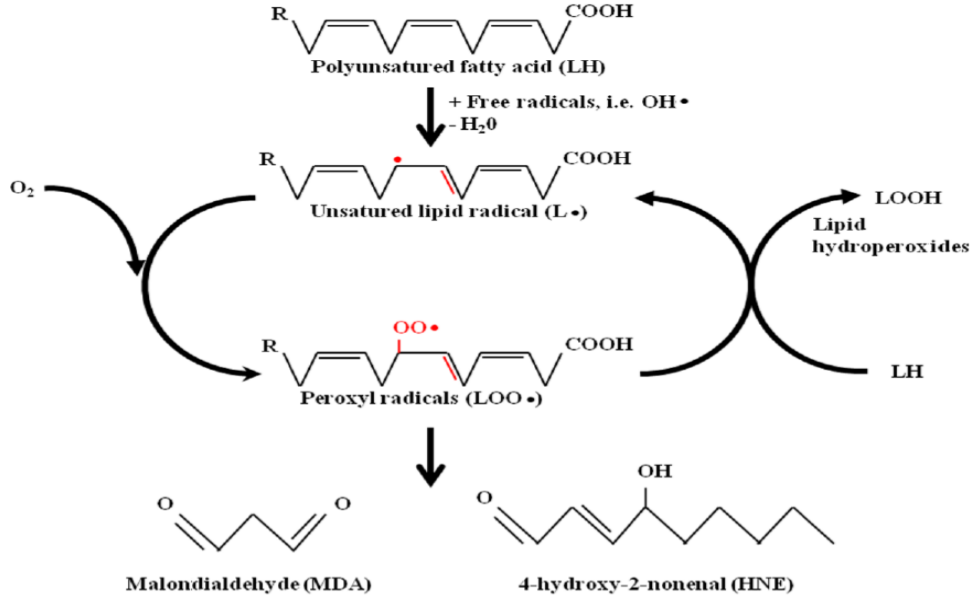
3.2. Hücre Lizatının Hazırlanması ve Gerçekleştirilen Biyokimyasal Analizler

Çalışmada yer alan biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere hücre lizatları M-PER

memeli ekstraksiyon tampon kiti (M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent, katalog no: 78501; Thermo Scientific) kullanılarak hazırlanmıştır. Hücre lizisi aşamasında proteaz ve fosfataz inhibitörleri (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit (Product No. 78410); PhosSTOP™ PHOSS-RO Roche) kullanılarak proteinlerin proteolitik yıkımı ve fosfatazların aktiviteleri bloke edilmiştir. Daha önce 4 farklı grup için mikrosantrifüj tüplere alınmış olan 250'şer µg hücre pelleti buz üstüne alındı. Toplamda 15 µL proteaz inhibitör kokteyli, 150 µL fosfataz inhibitörü ve 2 ml M-PER® iyice karışması sağlandıktan sonra, deney gruplarına ait hücre lizatlarının bulunduğu mikrotüplere eşit hacimde pipetlendi. Lizis buffer içerisindeki hücre süspansiyonları 4 °C'de 14 000 g'de 15 dakika kadar santrifüj edildi. Çalışmanın farklı gruplarına ait ependorf tüpleri içerisindeki örneklerdeki protein içeriklerinin kantitasyonu aşamasına geçildi.

3.2.1. Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçüm Yöntemi

Organizmanın antioksidan savunma mekanizmalarının kapasitesini aşan oksidatif stres, pro-oksidan ve anti-oksidan seviyeleri arasındaki dengeyi bozarak hücre, doku ve organlarda oksidatif hasar meydana getirmektedir. Serbest radikaller veya reaktif oksijen türleri (ROT) membran lipidlerinde peroksidasyona neden olmakta, bir takım reaktif aldehitlerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu neticesinde açığa çıkan aldehit yapılar, biyolojik makromoleküllere (DNA, lipid, protein vd.) atak etmeleri sonucu molekülerde yapısal değişimlere sebep olmaktadır. Oksidatif hasar olarak tanımlanan uzunca bir süredir bilinen bu durum ROT'ların lipid yapılarında direkt oluşturdukları etkiyle ilişkilidir. Endojen ROT'ların primer kaynakları: mitokondri, plazma membranı, endoplazmik retikulum ve peroksizomdur. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller gibi oksidanların karbon-karbon çift bağların yoğun olduğu lipitlere atak etmesi (çoklu doymamış yağ asitleri) şeklinde tanımlanmaktadır (Ayala ve ark., 2014). Lipid peroksidasyonu ile oluşan temel aldehit yapılar malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE) oksidatif stresin güvenilir göstergeleri olarak kullanılmaktadır.



(Barrera et al., 2018)

Şekil 3.11. Malondialdehit ve 4-hidroksinonenal (HNE) poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır.

Tiyobarbitürik asitidin (TBA) asidik pH'da yüksek sıcaklık altında (95 °C) MDA ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli bileşiğin 532 nm dalga boyundaki absorbansının ölçümü prensibine dayanan metod kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir (Buege ve Aust, 1978; Dahle ve ark., 1962). Bu yöntemde TBA, MDA'nın haricinde başka lipid peroksit derive ürünlerle de reaksiyona verdiğiinden, yöntem TBA ile reaksiyona giren maddeler anlamına gelen TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) olarak da adlandırılmaktadır (Fruhbeck ve ark., 2017).

3.2.1.1. Kimyasallar

1,1,3,3 tetraetoksipropan (TEP, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, T-9889, Sigma-Aldrich, ABD)

Tiyobarbitürik asit (TBA, Thiobarbituric acid, T5500, Sigma-Aldrich, ABD)

Trikloroasetik asit (TCA, ma: 163,39, trichloroacetic acid, T9159, Sigma-Aldrich, ABD)

Hidroklorik asit (HCl, hydrochloric acid, 320331, Sigma-Aldrich, ABD)

Etil alkol %99 (EthOH, V0T0041, Merck, Almanya)

Fosfat tamponu (Phosphate buffered saline, P4417, Sigma-Aldrich, ABD)

3.2.1.2. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

TCA-TBA-HCI reaktifi: %0,375 (w/v) TBA (Thiobarbituric acid), %15 (w/v) TCA, 0,25 N HCl içeren reaktif solüsyonu hazırlanır. Öncelikle TCA (TCA çözülürken ısıtıcı kullanılır) çözülür.

Etanol-distile su çözeltisi (EtOH-dH₂O): Eşit hacimde %99'luk etanol ve dH₂O kullanılarak hazırlandı.

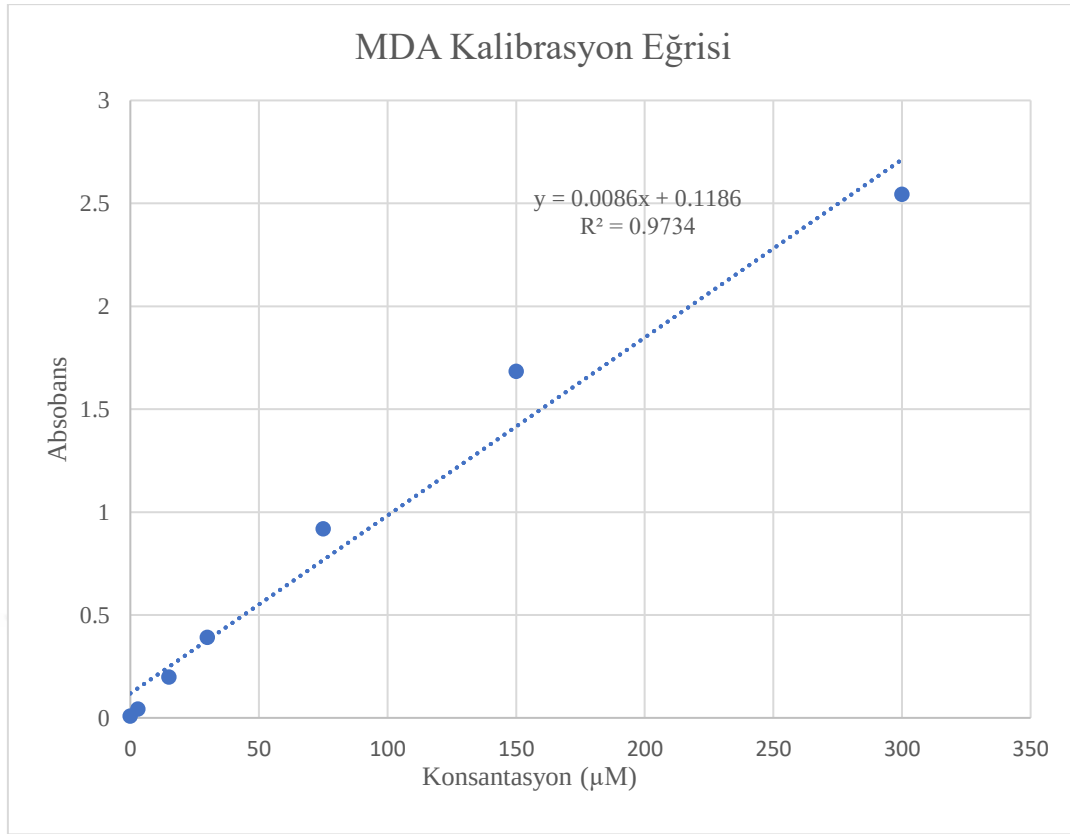
Standart Çözeltisi: 1,1,3,3 tetraetoksipropan (TEP) kimyasalıyla hazırlandı. Stok standart 10 mM konsantrasyonda deney gününde hazırlandıktan sonra 2 – 100 μ M'lık konsantrasyon aralığında olacak şekilde TEP çalışma standartları EtOH-dH₂O karışımıyla dilüe edilerek hazırlandı.

Fosfat tamponu (pH 7,4): 1 adet PBS tablet 200 ml dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Ölçüm yönteminde aşağıdaki protokol uygulandı:

Tablo 3.3. MDA ölçüm yöntemi protokolü.

	Kör (μ L)	Standart (μ L)	Örnek (μ L)
Fosfat tamponu	400	400	400
Etanol-distile su çözeltisi	100	-	-
Standart	-	100	-
Örnek	-	-	100
TCA-TBA-HCI reaktifi	1000	1000	1000
Cam viallerde hazırlanan çözelti 15 dakika kadar kaynar su banyosunda inkübe edildi.			
2500 g'de 15 dakika santrifüj edildi.			
Distile su körüne karşı sıfır ayarı yapıldı. 532 nm dalga boyunda OD değerleri okutuldu.			



Şekil 3.12. Malondialdehit kalibrasyon eğrisi ve denklemi.

Santrifüj sonrasında Kör, standart ve numune tüpleri içerisindeki çözeltilerden 300 µL alınarak 96 kuyucuklu plakalara pipetlenerek absorbanslar 532 nm dalga boyunda distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri standart eğri denklemi kullanılarak deney hücre gruplarına ait MDA konsantrasyonları tayin edildi. MDA konsantrasyonu nmol/mg protein şeklinde ifade edildi.

3.2.2. Hidrojen Peroksit Konsantrasyonun Ölçümü

Amonyum vadanadat-piridilazorezorsinol-hidrojen peroksit üçlü kompleksi (V-H₂O₂-PAR) ile H₂O₂ konsantrasyonlarının kolorimetrik yöntemle tayini gerçekleştirilmiştir (Ersoy, 2005).

3.2.2.1. Kimyasallar

Hidrojen peroksit (H₂O₂, H-6520, Sigma-Aldrich, ABD)

Amonyum monovanadat (NH₄VO₃, A1507426-Merck, Almanya)

Piridilazorezorsinol (PAR) [4-(2-Pyridylazo)resorcinol, ma: 215,21 g/mol, 82970, Fluka, Japonya]

Sülfürik asit (H_2SO_4 , 7664-93-9, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum hidroksit (NaOH , 06203, Sigma-Aldrich, ABD)

Etanol %96 (1.59010, Merck, Almanya)

3.2.2.1. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

Çalışma günü hazırlanan $1,0 \times 10^{-3}$ M H_2O_2 , $8,0 \times 10^{-3}$ M NH_4VO_3 , $1,0 \times 10^{-2}$ M PAR, 1,0 M H_2SO_4 (2 N) stok çözelti konsantrasyonlardaki solüsyonlar çalışma konsantrasyonu için gereken seyreltmeler yapılarak kullanıldı.

H_2O_2 standart çözeltisi ($2,5 \times 10^{-4}$ M): dH_2O ile gerçekleştirilen seri dilüsyonlarla 1-25 μM konsantrasyonlarda hazırlandı.

Amonyum monovanadat reaktifi ($4,0 \times 10^{-3}$ M): 93,576 mg (0,8 mmol) NH_4VO_3 tartılır, az miktar derişik NaOH ile beherde çözüldü, dH_2O ile 100 ml'ye tamamlandı. Elde edilen 8×10^{-3} M konsantrasyondaki stok NH_4VO_3 çözeltisi dH_2O 1/2 dilüe edilerek çalışma konsantrasyonuna ulaşıldı.

PAR reaktifi (5 mM): 215,2 mg PAR (1 mmol) tartılır ve %96'lık etanol ile 100 ml hacim içerisinde çözümlenerek 10 mM stok PAR çözeltisi elde edildi. Son olarak %96'lık etanol ile 1/2 dilüsyon gerçekleştirilerek 200 ml 5 mM konsantrasyonda çalışma konsantrasyonunda reaktif çözeltisi elde edildi.

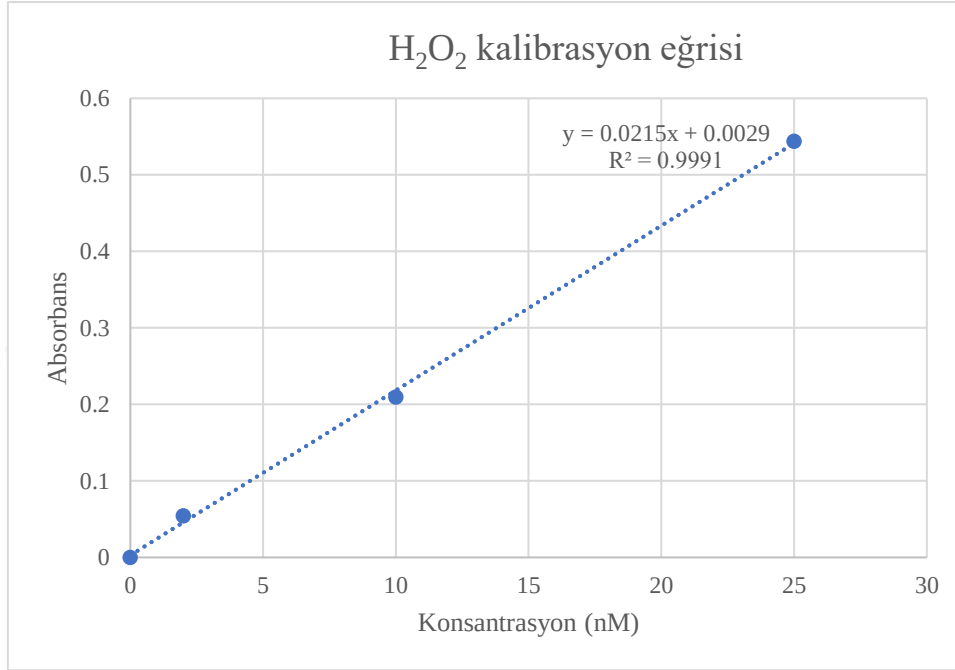
Sülfürik asit çözeltisi (2 N): 25 °C'de dansitesi 1,840 g/mL olan %96'lık solüsyondan 1,6 ml alınır, içerisinde 29,4 ml dH_2O bulunan erlen içerisinde konarak 2 N H_2SO_4 çözeltisi hazırlandı.

Standart tüplere 0,25-2,0 ml aralığında değişen hacimlerde H_2O_2 çözeltisi üzerine 0,25 ml NH_4VO_3 çözeltisi, 1 ml PAR ve 1,5 ml H_2SO_4 çözeltisi ilave edildikten sonra toplam hacim 5 ml olacak şekilde dH_2O ile seyreltme yapıldı. Deney süresince çözeltiler ışıktan korunmuştur.

Tablo 3.4. H_2O_2 ölçüm yöntemi protokolü.

	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Amonyum monovanadat ($4,0 \times 10^{-3}$ M)	0,25	0,25	0,25
PAR reaktifi (5 mM)	1,00	1,00	1,00
Sülfürik asit çözeltisi (2 N)	1,50	1,50	1,50
dH_2O	0,25	2,25	0,25
H_2O_2 standart çözeltisi (μM)	-	2,00	-

Örnek	-	-	2,00
Hazırlanan karışımlar kaynar su banyosunda 2 dakika bekletilir.			
Devamında oda sıcaklığına soğumaya bırakılır. 30 dakika içerisinde cihaz distile su ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra 542 nm dalga boyundaki absorbens değerleri okutuldu.			



Şekil 3.13. Hidrojen peroksit kalibrasyon eğrisi ve denklemi.

Elde edilen örnek absorbens değerleri, kalibrasyon (standart) eğri denklemi kullanılarak deney gruplarına ait H₂O₂ konsantrasyonları tayin edildi. H₂O₂ konsantrasyonları µM derişim şeklinde ifade edildi.

3.2.3. Nitrik Oksit (NO) Ölçüm Yöntemi

Nitrik oksid sentaz (NOS) enzimleri tarafından sentezlenen NO, aerobik sulu ortamda kendiliğinden hızla oksitlenerek nitrat oluşturur. NO, üretildikten sonra saniyeler içerisinde nitrit (NO⁻²) ve daha sonra da nitrata (NO⁻³) oksitlenir. Nitrat formu, nitrik oksid türevlerinin en kararlı yapısıdır. Nitrik oksid stabil yapıda olmaması nedeniyle direkt ölçümü oldukça zordur. Bu sebeple nitratı kadmiyum ile nitrite indirgenmesi ve nitrit miktarının kantitasyonunu ve NO düzeylerini nitrojen oksitler (NO_x, nitrit+nitrat toplamı) şeklinde belirtildiği kolorimetrik yöntem esas alınarak olarak ölçüldü (Bucala ve ark., 1991; Cortas ve Wakid, 1990; Durak ve ark., 2001). NO, nitrit (NO⁻²) ve NO''in diğer oksidasyon ürünlerine (nitrat reaksiyon verememektedir) spesifik ve sensitif olarak asidik

pH'da sülfanilik asidi diazotize etmesi, devamında N-(1-naftil)etilendiamin ile reaksiyona girerek yoğun pembe renkli 540 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren ürüne dönüşmesi, çözeltideki nitrit miktarıyla direkt orantılı değişen bu OD'nin kullanılması ile kantiyasyon gerçekleştirilir.

Ortamdaki NOS aktivitesi ile oluşan NO, nitrit üzerinden Griess reaktifi ile tepkimeye girdiğinde oluşan renkli bileşiğin 540 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.3.1. Kimyasallar

Sodyum nitrat (NaNO_3 , ma: 84,99 g/mol, Sodium nitrate, S8170, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum borat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, ma: 381,37 g/mol, Sodium tetraborate decahydrate, S9640, Sigma-Aldrich, ABD)

Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ma: 249,69 g/mol, Copper(II) sulfate pentahydrate, C6283, Sigma-Aldrich, ABD)

Çinko sülfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ma: 287,56 g/mol, Zinc sulfate heptahydrate, Z0251, Sigma-Aldrich, ABD)

Sülfanilamid (Sulfanilamide, S9251, ma: 172,20 g/mol, Sigma-Aldrich, ABD)

Kadmiyum (Cd, Cadmium, 20890, ma: 112,41 g/mol, Sigma-Aldrich, ABD)

N-(1-naftil)etilendiamin (NNDA, ma: 259,17 g/mol, N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, N9125, Sigma-Aldrich, ABD)

Glisin (Glycin, G7403, ma: 75,07 g/mol, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum hidroksit (NaOH , Sodium hydroxide, 06203, ma: 40 g/mol, Sigma-Aldrich, ABD)

Sülfirik asit (H_2SO_4 , 7664-93-9, ma: 98,08 g/mol, Sigma-Aldrich, ABD)

3.2.3.1. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

Hidroklorik asit (HCl, 3 M): %36,5 d: 1,2 g/L olan HCl solüsyonundan 1,25 ml alınarak içerisinde 5 ml dH_2O bulunan erleninde çözülerek hazırlandı.

Sülfanilamid çözeltisi (%2): Sülfanilamid 2 g tartıldı. Sülfanilamidi çözecek miktarda 3 M HCl'de çözülmesi sağlandıktan sonra hacim dH_2O ile 100 ml'ye tamamlandı. 1 yıl kadar oda sıcaklığında stabildir.

Sülfirik asit çözeltisi (0,1 M): %98'lik H_2SO_4 'ten 1,82 ml alındı, 100 ml'ye dH_2O ile tamamlanarak 0,1 mol/L H_2SO_4 elde edildi.

Sodyum borat dekahidrat (10 mM): 381,7 mg tartıldı, 100 ml dH₂O ile balon joje içerisinde hazırlandı.

Nitrat Çözeltisi (Stok, 100 mM): 850 mg NaNO₃ tartıldı, balon joje içerisinde 100 ml 10 mM sodyum borat dekahidrat ile çözülerek 100 mM stok standart hazırlandı. Stok standart oda sıcaklığında en az 9 ay süresince stabildir.

Nitrat standart çözeltisi: Seri dilüsyonlar ile 1-50 µM konsantrasyon aralığında çalışma standart çözeltileri elde edildi. Çalışma standartları oda sıcaklığında 3 gün stabil kalabilmektedir.

Kadmiyum granüllerinin hazırlanması: Kadmiyum ilk olarak 20-40 mg'lık ufak parçalara ayrıldı. Erlenmayer içerisinde 0,1 M H₂SO₄ çözeltisinde saklandı. Bu şekilde 9 ay stabil saklanabilir.

Glisin (0,2 M)-NaOH tampon çözeltisi: 15 gr glisin beher içerisinde bir miktar 2 M NaOH ile çözülür. Devamında çözelti son hacmi 1 litre olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak pH 9,7'ye ayarlandı. Çözelti 1 ay kadar 0-8 °C'de stabildir.

N-(1-naftil)etilendiamin çözeltisi (%1 NEDD çözeltisi): 50 mg NNDA 50 ml dH₂O içerisinde çözülmüştür. Bu çözelti 2 ay 0-8 °C'de stabildir.

Çinko sülfat (75 mM): 1,08 g ZnSO₄.7H₂O tartılır, beher içerisinde 50 ml dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Bakır sülfat (5 mM): 62,5 mg CuSO₄.5H₂O tartıldı, son hacim 50 ml olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak hazırlandı.

Sodyum hidroksit (55 mM): 110 mg NaOH tartıldı, bir erlene kondu ve dH₂O ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Griess ayırıcı: 50 ml %0,1 NEDD ve 50 ml %2 sülfanilamid eşit hacimde karıştırılması ile elde edildi.

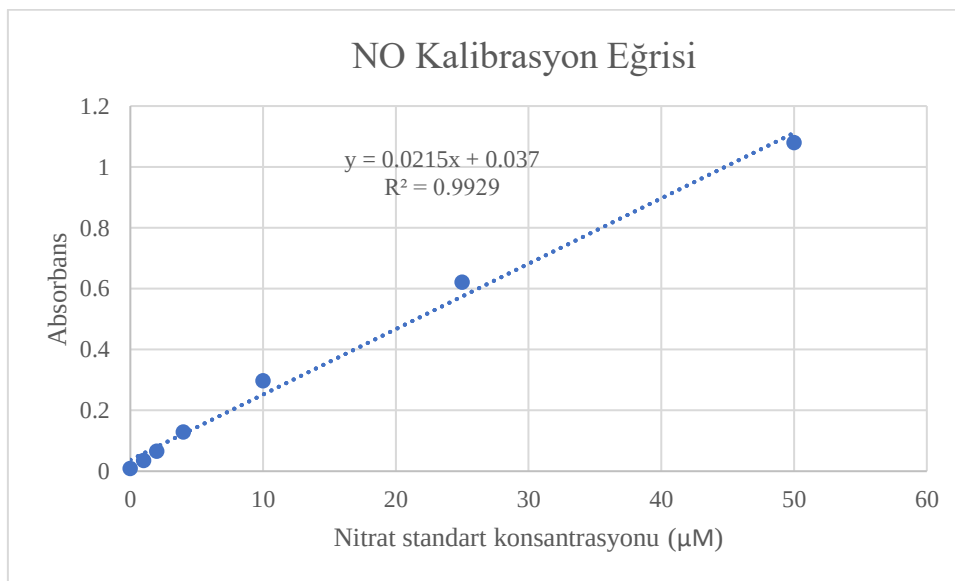
Deproteinizasyon: Hücre lizatları 1/5 oranında PBS ile dilüe edildi. 50 µL'si 200 µL 75 mM çinko sülfat çözeltisi ile karıştırıldı. Devamında 250 µL 55 mM NaOH çözeltisi eklendi. Final çözelti pH'sının 7-7,4 aralığında olması sağlandı.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa dH₂O ile yıkanmıştır. 1-2 dakika 5 mM bakır(II) sülfat çözeltisi içinde bekletildikten sonra vortekslenmiştir. Devamında 3 kez Glisin-NaOH tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. 10 dakika içinde kullanılmak üzere kurutma kâğıdı yardımıyla kurutulmuştur. Daha uzun sürelerde hava ile temas eden granüllerin redükte edici kapasiteleri azalmaktadır.

Elde edilen örnek absorbans değerleri, standart eğri denklemi kullanılarak deney gruplarına ait NO_x (nitrojen oksit) konsantrasyonları tayin edildi. NO_x konsantrasyonları proteine oranlanılarak µmol/mg protein şeklinde gösterildi.

Tablo 3.5. Nitrojen oksit düzeylerinin analiz yöntemi protokolü.

	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Glisin-NaOH tampon çözeltisi	1	1	1
Nitrat standartı (10 µM)	-	1	-
Proteinsizleştirilmiş örnek	-	1	1
dH₂O	3	1	2
Cam tüplerin içerisine 2,5 – 3 g kadar taze aktive edilmiş kadminyum granülleri eklendi ve karışımları sağlandı			
90 dakika sonra her tüpten 2 ml hacimde çözelti uygun şekilde etiketlenmiş tüplere aktarılarak NO _x ölçümü aşamasına geçildi.			
Analit karışımı	2	2	2
Griess ayıracı	2	2	2
Çözeltilerin iyice karışımları sağlandı. 20 dakika sonra, 40 dakika içerisinde tamamlanacak şekilde 545 nm dalga boyunda kör çözeltisine karşı cihaz sıfır ayarı yapıldıktan sonra absorbanslar kaydedildi. Standart eğri denklemi kullanılarak örneklerle ait NO _x konsantrasyonları µmol/mg protein/ml olarak hesaplandı.			



Şekil 3.14. Nitrojen oksit (NO_x) kalibrasyon eğrisi ve denklemi.

3.2.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksif dismutazlar (SOD), süperoksid ($O_2^{\cdot-}$) radikalini H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüştüren reaktif oksijen türlerine karşı selüler defans mekanizmalarının ön cephesinde yer alan antioksidan beir enzim ailesidir. Cu-Zn SOD (Copper/zinc superoxide dismutase), mitokondri intermembraner aralıkta lokalize, ökaryotlarda enzim aktivitesinin %90'ından sorumlu olan izoenzimidir (Mirişala ve ark., 2012). SOD enzim aktivitesi Ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen süperoksid ($O_2^{\cdot-}$) anyonunun nitrobluetetrazolyum (NBT)'u redükte etmesi prensibini esas alan kolorimetrik deney kullanılarak analiz edildi (Durak ve ark., 1996; Durak ve ark., 1993; Sun ve ark., 1988). NBT, bu deneyde $O_2^{\cdot-}$ üretimi için bir indikatör görevi görmektedir. Bu redüksiyon reaksiyonu (ksantin ksantin oksidaz tarafından ürik asite dönüştürülmesi sırasında açığa çıkan $O_2^{\cdot-}$ Cu-Zn SOD enzimi tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür) ortamda SOD varlığında inhibe edilmekte, ortama eklenen sarı renkli suda çözünebilen nitroblue tetrazolium klorit tuzunun süperoksit anyonu ile reaksiyona girererek 560 nm dalga boyunda absorbans veren suda çözünürlüğü olmayan mor renkli formazan bileşiğine (NBTH₂) indirgenmesi önlenmektedir. SOD enzim aktivitesi NBT'nin NBTH₂'ye indirgenmesini %50 azaltan enzim protein miktarı şeklinde belirtilmektedir. Monoformazan bileşiğinin bu dalga boyundaki molar ekstinksiyon katsayısı $15\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$ 'dir. Sörneklerin spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı.

3.2.4.1. Kimyasallar

Sodyum karbonat (Na_2CO_3 , Sodium carbonate, S7795 Sigma-Aldrich, ABD)

Disodyum etilendiaminotetraasetik asit (Sodyum EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, E1644, Sigma-Aldrich, ABD)

Ksantin (Xanthine, X4002, Sigma-Aldrich, ABD)

Nitrobluetetrazolyum (NBT, Nitrotetrazolium Blue chloride, N6876, Sigma-Aldrich, ABD)

Ksantin oksidaz (Xanthine Oxidase from bovine milk, X1875, Sigma-Aldrich, ABD)

Sığır serum albumin (BSA, Bovine Serum Albumin, A2153, Sigma-Aldrich, ABD)

Bakır (II) klorit ($CuCl_2$, Copper(II) chloride, 222011, Sigma-Aldrich, ABD)

Amonyum sülfat [$(NH_4)_2SO_4$ Ammonium sulfate, A4418, Sigma-Aldrich, ABD]

3.2.4.2. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

Ksantin Oksidaz (0,2 U/ml): 25 U 'lik ksantin oksidazdan 8 µl bir ependorf tüp içerisine alındı. 2,643 g (NH₄)₂SO₄'tan 10 ml dH₂O ile hazırlanmış 2 M amonyum sülfat çözeltisinden 1 ml alınarak 0,2 U/ml'lik ksantin oksidaz çözeltisi hazırlandı.

CuCl₂ (0,8 mM): 108 mg CuCl₂ tartıldı, 100 ml'lik balon joje içerisinde dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Reaktif çözeltisi

Sodyum karbonat çözeltisi (0,4 M): 4,24 g Na₂CO₃ tartıldı ve 100 ml'lik balon joje içerisinde dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Disodyum EDTA çözeltisi (0,6 mM): 11,15 mg Disodyum EDTA tartıldı ve 50 ml'lik balon joje içerisinde dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Ksantin çözeltisi (0,3 mM): 2,28 mg ksantin tartıldı ve 50 ml'lik balon joje içerisinde az miktar 1 M NaOH ile çözüldü. Üzerine 50 ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

Nitrobluetetrazolyum çözeltisi (0,15 mM): 12,3 mg NBT tartıldı ve 100 ml'lik balon joje dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

BSA (1 mg/mL): 25 mg BSA tartılıp 25 ml'lik balon joje içerisinde dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Hazırlanan çözeltilerden aşağıda belirtilen hacimlerde alınarak 100 ml balon joje içerisinde karıştırıldı:

12 ml Na₂CO₃ çözeltisi, 20 ml Disodyum EDTA çözeltisi, 40 ml ksantin çözeltisi, 20 ml NBT çözeltisi, 6 ml BSA çözeltisi. Deneyde kullanılan tüm çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. SOD enzim aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü.

	Kör (µL)	Örnek (µL)
Reaktif çözeltisi	1425	1425
Örnek	-	50
Ksantin oksidaz	25	25
Ependorf tüplerinde hazırlanan çözelti karışımı oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.		
Örnek	50	-
CuCl₂	50	50

Distile su körüne karşı sıfır ayarı yapıldı.
560 nm dalga boyunda OD değerleri okutuldu.

Çizelgede belirtildiği şekilde gerçekleştirilen pipetlemelerin bitiminde, kör ve örnek tüpleri içerisindeki çözeltiler 96'lık plakaya 300 µL hacimde pipetlenir, 560 nm'de distile suya karşı absorbans değerleri okunur. 1 Ünite SOD NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi miktarı olarak kabul edildiği şekliyle aşağıdaki formül kullanılarak SOD enzim aktivitesi belirlenir.

$$\text{SOD aktivitesi (U/mg)} = [(\text{ODK} - \text{ODN}) / \text{ODK}] \times 20 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

3.2.5. Katalaz (KAT) Aktivitesi Tayini

Aeibi tarafından tanımlanmış olan katalaz aktivitesi tayini deneyinde hidrojen peroksidin substrat olarak kullanılmaktadır (Aebi, 1984).

3.2.5.1. Kimyasallar

Hidrojen peroksit (H₂O₂, H-6520, Sigma-Aldrich, ABD)

Fosfat tamponu (Phosphate buffered saline, P4417, Sigma-Aldrich, ABD)

3.2.5.2. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

H₂O₂ çözeltisi (30 mM): Yoğunluğu 1.13 g/ml olan %3 (w/w) H₂O₂'den PBS ile 2-30 mM farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. 340,8 µL hacimde H₂O₂ alındı, distile su ile 10 ml hacimde 30 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. 1/3 dilüe edilerek 10 mM çalışma konsantrasyonunda H₂O₂ çözeltisi kullanıldı.

Fosfat tamponu çözeltisi (pH 7,4): 1 adet PBS tableti 200 ml dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Tablo 3.7. Katalaz enzim aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü.

	Kör (µL)	Örnek (µL)
H₂O₂ çözeltisi (10 mM)	270	270
Fosfat tamponu çözeltisi	30	-
Örnek	-	30

Aktiviteyi hesaplamak için $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ molar ekstinksiyon katsayısı değeri kullanıldı. Katalaz enzim aktivitesi $240 \text{ nm}'$ de 0 ve 30. saniyede gerçekleştirilen okumalarda absorbansdaki azalma değerlendirildi. 1 U katalaz enzim aktivitesi $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 'i pH 7 ve 25°C sıcaklık koşulları altında 1 dakika içerisinde parçaladığı miktar olarak ifade edilmektedir. H_2O_2 konsantrasyonunda yaşanan düşüş $10,3 \text{ mM}'$ dan $9,2 \text{ mM}$ şeklinde gerçekleştiği bildirilmektedir. Katalaz enzim aktivitesi U/dk/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.6. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

Ökaryot hücre non-protein sülfhidril grupları (SH), redükte glutasyon (GSH) formundadır. 5,5'-ditiyobis [2-nitrobenzoik asit (DTNB)] disülfid, bir kromojen molekül olarak sülfhidril grubu içeren bileşiklerle kolayca indirgenerek koyu sarı renkli bir bileşik oluşturur. Bu redükte kromojenin GSH konsantrasyonu ile orantılı olan 412 nm dalga boyundaki absorbansının ölçülmesi kolorimetrik kantitatif analizin esasını oluşturmaktadır [1 mol SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik asit (DTNB) oluşmaktadır]. Bu prensibi esas alan şekilde biyolojik örneklerde GSH düzeylerinin ölçümü gerçekleştirildi (Beutler ve ark., 1963; Ellman, 1959).

3.2.6.1. Kimyasallar

5,5'-ditiyobis-2-nitro benzoik asit [DTNB, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), D8130, Sigma-Aldrich, ABD]

Redükte glutasyon (GSH, γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine, L-Glutathione reduced, G4251, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, 1.06342, Supelco, Almanya)

Sodyum fosfat, anhidroz (NaPO_4 , ma: 163,94 g/mol, Sodium phosphate, S0876, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum fosfat monobazik, anhidroz (Na_2HPO_4 , ma: 119,98 g/mol, S8282, Sodium phosphate monobasic, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ma: 156,01 g/mol, 04269, Sodium phosphate monobasic dihydrate, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum fosfat dibazik (Susuz) (Na_2HPO_4 , ma:141,96 g/mol, Sodium phosphate dibasic, S9763, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum fosfat pentahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ma: 216,04 g/mol, Sodium phosphite dibasic pentahydrate, 04283, Sigma-Aldrich, ABD)

Glasiyel metafosforik asit [$(\text{HPO}_3)_n$, meta-Phosphoric acid, 04103, Sigma-Aldrich, ABD]

Potasyum klorür (KCl, Potassium chloride, P3911, Sigma-Aldrich, ABD)

Disodyum Etilendiaminotetraasetik asit (Sodyum EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, E1644, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum klorid (NaCl, Sodium chloride, S7653, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum nitrat (NaNO_3 , Sodium nitrate, S-8170 S8170, Sigma-Aldrich, ABD)

3.2.6.2. Deneyde kullanılan reaktifler ve hazırlanışı

Proteinsizleştirme çözeltisi: 1,67 g Glasiyel metafosforik asit, 0,20 g Disodyum EDTA ve 30 g NaCl 100 ml'lik balon joje içerisinde dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

Disodyum fosfat tampon çözeltisi (0,3 M): 42,59 g Na_2HPO_4 tartıldı, 1 lt'lik balon joje içerisine eklendi ve 1000 ml dH_2O ile çözülerek hazırlandı. 4 °C 'de saklanabilir. Eğer kristalize olursa ısıtılarak çözülür ve bu şekilde tekrar kullanılabilir.

DTNB kromojen çözeltisi (Ellman renk ayırıcı): 1 g NaNO_3 tartıldı. 100 ml'lik balon joje içerisinde 100 ml dH_2O ile çözülerek %1'lik sodyum nitrat solüsyonu elde edildi. Daha sonra 40 mg DTNB tartıldı ve %1'lik NaNO_3 solüsyonu içerisine eklenerek hazırlandı.

Redükte glutatyon standart çözeltisi (GSH standartı): 1 mg glutatyon 10 ml PBS ile çözülerek 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda stok standartı hazırlandı. Devamında seri dilüsyonlarla 0,5, 1, 2, 4, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda çalışma standartları elde edildi. Stabil olmadığı için standart çözeltiler taze olarak hazırlandı.

KCl çözeltisi (0,15 M): 1,118 g KCl tartıldı, 100 ml dH_2O ile çözülerek 0,15 M KCl çözeltisi elde edildi.

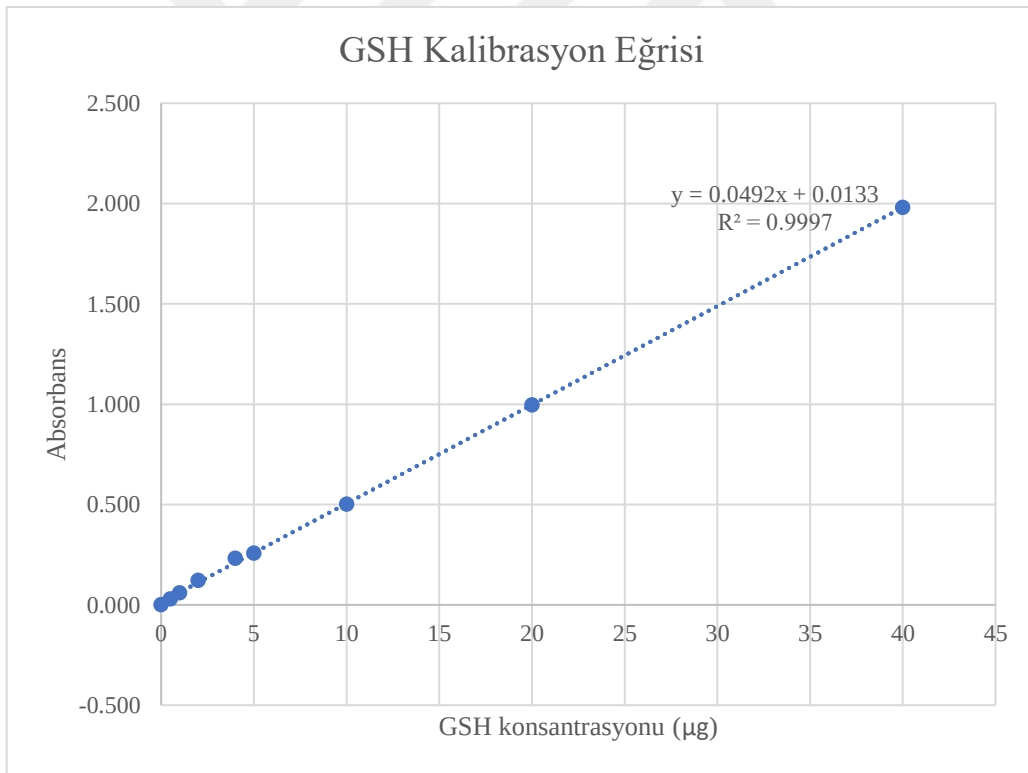
Tablo 3.8. Redükte glutatyon düzeylerinin belirlenmesi deneyi 1. aşama protokolü.

	Kör (μL)	Standart (μL)	Örnek (μL)
Proteinsizleştirme çözeltisi	750	750	750
Fosfat tamponu çözeltisi	100	-	-
Standart	-	100	-
Örnek	-	-	100
KCl	400	400	400

Tablo 3.8’de belirtilen hacimlerde 0,1 mL örnek/kör (fosfat tamponu)/standart, 0,4 mL 0,15 M KCl ve 0,75 mL proteinsizleştirme çözeltisi ependorf tüplere pipetlendi ve karıştırıldı. 10 000 g’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatantlar toplandı ve 96’lık mikroluka kuyucuklarına aşağıdaki Tablo 3.9’da belirtilen hacimlerde kondu ve çözeltilerin karışması sağlandı.

Tablo 3.9. Redükte glutatyon düzeylerinin belirlenmesi deneyi 2. aşama protokolü.

	Kör (µL)	Standart (µL)	Örnek (µL)
Süpernatant	50	50	50
Fosfat tamponu çözeltisi	300	300	300
Ellman ayırıcı	50	50	50
Distile su körüne karşı sıfır ayarı yapıldı. 412 nm dalga boyunda OD değerleri okutuldu.			



Şekil 3.15. Glutatyon kalibrasyon eğrisi ve denklemi.

GSH düzeyleri, 412 nm dalga boyundaki ekstinksiyon katsayısı $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ve standart eğri denklemi kullanılarak hesaplandı. Örneklerde GSH düzeyleri nmol GSH/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.7. Antioksidan Kapasite (Ferrik Demir İndirgenme Deneyi, FRAP) Tayini

Ölçümün gerçekleştirildiği çözeltideki antioksidan moleküllerin ferrik demiri (Fe^{+3}) ferröz demire indirgeme yeteneğini kolorimetrik olarak ölçülmesi prensibini esas alan basit güvenilir, analizi etkileyecek interferans açısından avantajlı bir metod olan FRAP deneyi kullanılarak total antioksidan kapasite (TAS, total antioxidant capacity) belirlendi (Benzie ve Strain, 1996). FRAP deneyi diğer birçok TAS tayin yöntemlerinin temel aldığı, bir radikal molekülün indirgenmesini sağlayacak gücün ölçümü prensibine dayanmamakta, ve bazı antioksidan moleküllerin bu şekilde etkinliklerinin gözardı edilmesi sorununu barındırmamaktadır (Firuzi ve ark., 2005).

3.2.7.1. Kimyasallar

Sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Sodium acetate trihydrate, 236500, Sigma-Aldrich, ABD)

Asetik asit ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, Acetic acid, A6283, Sigma-Aldrich, ABD)

2,4,6 Tris(2-piridil)-s-triazin [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, 93285, Supelco, Sigma-Aldrich, ABD]

Hidroklorik asit (HCl, Hydrochloric acid, 100317 Supelco, Almanya)

Demir (III)klorit hekzahidrat [$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Iron(III) chloride hexahydrate, 236489, Sigma-Aldrich, ABD]

L-Askorbik asit (L-Ascorbic acid, A-5960, Sigma-Aldrich, ABD)

3.2.7.2. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

Asetat tampon çözeltisi (0,3 M): 3,1 g sodyum asetat trihidrat 100 ml dH_2O içerisinde 1 Lt'lik cam beher içerisinde çözüldü. Üzerine 16 ml asetik asit eklendi. Reaktifin pH değeri 3,6'ya ayarlanarak toplam çözelti hacmi dH_2O ile 1 Lt'ye tamamlandı.

Askorbik asit standartları: 35,2 mg askorbik asit (AA) tartıldı, 10 ml dH_2O içerisinde 25 ml'lik balon joje içerisinde 2 mM konsantrasyonunda AA standart için stok çözeltisi hazırlandı. Seri dilüsyonlar gerçekleştirilerek farklı konsantrasyonlarda (100 – 1000 μM 'lık) 5 adet standart çözelti hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi (40 mM): %37'lik 25 °C'de dansitesi 1,2 g/ml olan preparattan 50 μL alındı ve 15 ml dH_2O bulunan 25 ml'lik balon joje içerisinde hazırlandı.

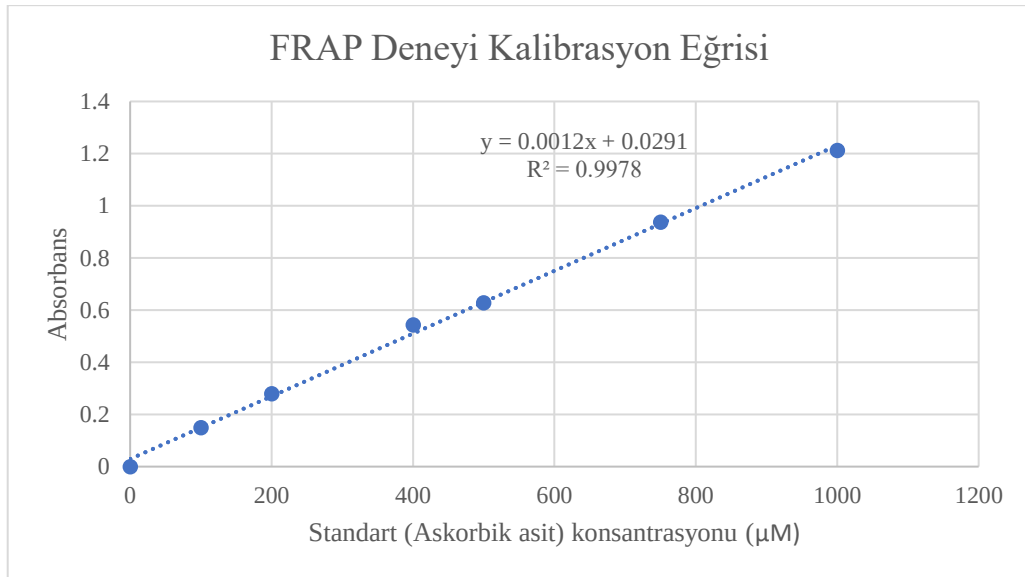
2,4,6 Tris(2-piridil)-s-triazin çözeltisi (10 mM): 2,4,6 Tris(2-piridil)-s-triazin'den 46,8 mg tartıldı. 15 ml 40 mM HCl çözeltisi bulunan balon içerisine eklendi ve çözülmesi sağlanarak TPTZ reaktifi 10 mM olarak hazırlandı.

Demir (III)klorit hekzahidrat çözeltisi (20 mM): 108 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 ml dH_2O içerisinde 25 ml'lik balon joje içerisinde çözülerek hazırlandı.

FRAP çözeltisi: 60 ml asetat tamponu, 6 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 6 ml TPTZ reaktifi 100 ml'lik balon joje içerisinde karıştırılarak FRAP ayıracı elde edildi.

Tablo 3.10. Total antioksidan durum (TAS) ölçüm yöntemi protokolü.

	Kör (µL)	Standart (µL)	Örnek (µL)
FRAP ayıraç çözeltisi	200	200	200
dH_2O	10	-	-
Standart	-	10	-
Örnek	-	-	10
37° C'de 4 dakika inkübe edildi.			
Distile su körüne karşı sıfır ayarı yapıldı.			
593 nm dalga boyunda OD değerleri okutuldu.			



Şekil 3.16. FRAP deneyi kalibrasyon eğrisi ve denklemi

İlk olarak 96'lık mikroluka kuyucuklarına mikropipet yardımıyla dH_2O , standart çözeltiler ve örneklerden eklendi 10'ar µL konuldu. Ardından tüm kuyucuklara 200 µL FRAP ayıracı konuldu. 37 °C'de 4 dakika inkübasyonun ardından 593 nm dalga boyundaki

absorbans değerleri ölçüldü. 1 mM askorbik asit çözeltisinin FRAP değeri için kabul edilen 2000 referans alınarak örneklere ait antioksidan kapasite verileri nmol/mg protein şeklinde elde edildi.

3.2.8. İleri Protein Oksidasyon Ürünlerinin Tayini (Advanced Oxidation Protein Products; AOPP)

AOPP, oksidatif stresin neden olduğu protein oksidasyonu düzeyini belirlemede duyarlı bir belirteçtir. AOPP düzeyleri literatürde tanımlanan kolorimetrik yöntemi esas alan deney protokollerinin uygulanması ile ölçüldü (Hanasand ve ark., 2012; Witko-Sarsat ve ark., 1996). Proteinlerin klorlu oksidanlar tarafından atak edilmesi ile oluşan proteinlerin çapraz bağlama ürünlerinin sitrik asit içeren asidik pH’da KI’yı (potasyum iyodür) oksitleyerek I₃-(triiodid) iyonu açığa çıkmaktadır. Triiodid iyonuna bağlı 340 nm’deki absorbansın ölçülmesi esasına dayanan kolorimetrik yöntemle elde edilen AOPPs düzeyleri µmolar kloramin-T eşdeğeri olarak ifade edildi.

3.2.8.1. Kimyasallar

Kloramine T hidrat (Chloramine-T hydrate, 857319, Sigma-Aldrich, ABD)

Fosfat tamponu (Phosphate buffered saline, P4417, Sigma-Aldrich, ABD)

Potasyum iyodür (KI, Potassium iodide, 03124, Sigma-Aldrich, ABD)

Sitrik asit monohidrat (ma: 210,14 g/mol, Citric acid monohydrate, C1909, Sigma-Aldrich, ABD)

3.2.8.2. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

Fosfat tamponu (pH 7,4): 1 adet PBS tablet 200 ml dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

Sitrik asit (0,2 M): 420 mg tartıldı, 10 ml dH₂O ile çözülerek hazırlandı.

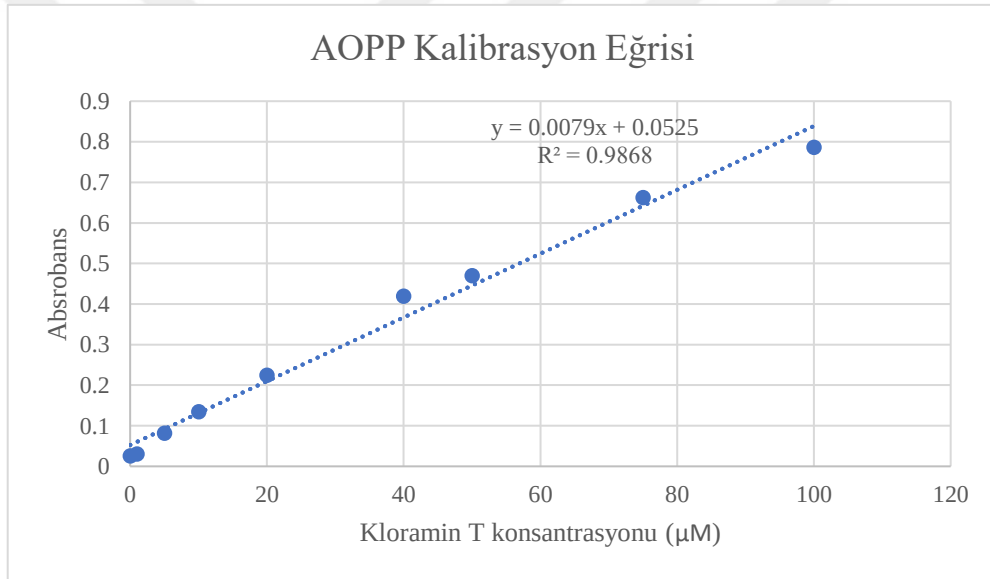
Potasyum iyodür çözeltisi (1,16 M): 192,56 mg KI tartıldı, 10 ml PBS ile çözülerek hazırlandı.

Kloramin T standartları (5-200 µmol/L): Kloramin-T’den 22,765 mg tartıldı, 100 ml dH₂O ile çözülerek stok standart çözeltisi 1 mM konsantrasyonda hazırlandı. Seri dilüsyonlar gerçekleştirilerek 1–100 µM konsantrasyon aralığında 8 farklı çalışma standart çözeltisi elde edildi.

Örnek çözeltisi: Hücre lizatları fosfat tampon çözeltisi ile 1/5 oranında dilüe edildi.

Tablo 3.11. İleri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPPs) ölçüm yöntemi protokolü.

	Kör (µL)	Standart (µL)	Örnek (µL)
Fosfat tamponu (pH 7,4)	200	10	-
Kloramin T (5-200 nmol/ml)	-	200	-
Örnek (1/5 dilüe)	-	-	200
KI çözeltisi (1,16 M)	10	10	10
Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi			
Sitrik asit (0,2 M)	20	-	20
Distile su körüne karşı sıfır ayarı yapıldı. 340 nm dalga boyunda OD değerleri okundu.			



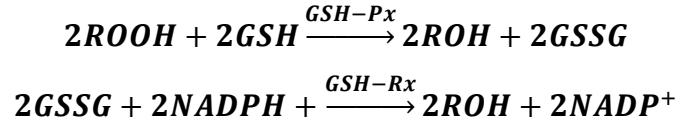
Şekil 3.17. İleri protein oksidasyon ürünleri (AOPPs) kalibrasyon eğrisi ve denklemi.

340 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedildi. Standart eğri denklemi kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. AOPPs düzeyleri nanomol/ml olarak ifade edildi.

3.2.9. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi tayini

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivite tayini ardı sıra ilerleyen iki reaksiyonu esas almaktadır. Birinci reaksiyonda serbest radikaller [hidrojen peroksit veya organik hidroperoksitler (ROOH)], GSH-Px'ın katalizlediği reaksiyon ile indirgenirken, ortamdaki redükte glutasyon molekülleri (GSH) okside olmaktadır. İkinci reaksiyonda ise, okside

glutasyon (GSSG) molekülleri, glutasyon redüktaz (GSH-Rx) enziminin katalizlediği reaksiyon ile yeniden GSH'a indirgenir. Ortamda bulunan NADPH molekülleri ise okside olarak NADP^{+} 'ye dönüşmektedir. Bu dönüşüm 340 nm dalga boyunda absorbanı veren NADPH'nin azalmasıyla ilişkili şekilde absorbanı düşüşü olarak izlenmektedir. Zira NADP^{+} molekülü 340 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmemektedir (Paglia ve Valentine, 1967).



3.2.9.1. Kimyasallar

Glutasyon redüktaz [GSH-Rx, Glutathione Reductase from baker's yeast (*S. cerevisiae*), G3664, Sigma-Aldrich, ABD]

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, Glutathione Peroxidase from bovine erythrocytes, G6137, Sigma-Aldrich, ABD)

Redükte glutasyon (GSH, γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine, L-Glutathione reduced, G4251, Sigma-Aldrich, ABD)

Okside glutasyon (GSSG, L-Glutathione oxidized, G6654, Sigma-Aldrich, ABD)

Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4 , ma: 136,09 g/mol, Potassium phosphate monobasic, 04243, Sigma-Aldrich, ABD)

Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4 , ma: 176,18 g/mol, Potassium phosphate dibasic, P3786, Sigma-Aldrich, ABD)

Disodyum etilendiaminotetraasetik asit (Sodyum EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, E1644, Sigma-Aldrich, ABD)

Sodyum azit (NaN_3 , Sodium azide, 438456, Sigma-Aldrich, ABD)

NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate, N1630, Sigma-Aldrich, ABD)

Tersiyer bütül hidroperoksit (CH_3)₃COOH, Luperox® TBH70X, tert-Butyl hydroperoxide solution, 458139, Sigma-Aldrich, ABD)

3.2.9.2. Deneyde Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışı

Sodyum azid (2 mM): 130 mg sodyum azid tartıldı, 100 ml'lik balon joje içerisinde dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (125 mM, pH 7,0): 1,7 g KH_2PO_4 tartıldı, 100 ml'lik balon joje içerisinde 100 ml dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

Disodyum EDTA çözeltisi (20 mM): 744 mg Disodyum EDTA tartıldı ve 100 ml'lik balon joje içerisinde dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

NADPH (2 mM): 16,66 mg NADPH tartıldı, 10 ml dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

GSH (10 mM): 61,46 mg NADPH tartıldı, 10 ml dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

Tersiyer bütül hidroperoksit (12 mM): 25 °C'de dansitesi 0,93 g/mL olan %70 (w/v) olan tersiyer hidroperoksit çözeltisinden 8,35 μL alındı 5 ml dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

Glutasyon redüktaz (0,5 IU/ml): 1,0 μmol GSSG'yi pH 7.6 ve 25 °C koşullarında 1 dakika içerisinde redükte eden enzim miktarı 1 U olarak tanımlanmaktadır. 100 U/ml'lik preparattan 25 μL alındı 5 ml dH_2O ile çözülerek hazırlandı.

Tablo 3.12. GSH-Px deneyi reaktif çözeltisi havuzunun oluşturulması.

Çözeltiler	mL
Potasyum fosfat tamponu (125 mM, pH 7,0)	20,0
Sodyum azid (2 mM)	2,5
Disodyum EDTA çözeltisi (20 mM)	2,5
NADPH (2 mM)	5,0
GSH (10 mM)	5,0
50 ml'lik beherde belirtilen hacimlerde karıştırılarak reaktif çözeltisi havuzu elde edilir	

GSH-Px enzim aktivitesi tayininde analiz esnasındaki 1 mL'lik hacimde tüm çözeltilere ilişkin son konsantrasyonlar: 50 mM potasyum fosfat tamponu, 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0,2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/mL glutasyon redüktaz (GSH-Rx), 1,2 mM tersiyer bütül hidroperoksit şeklindedir.

Tablo 3.13. GSH-Px enzim aktivitesi ölçüm yöntemi protokolü.

	Kör (μL)	Örnek (μL)
Reaktif çözelti havuzu	210	210
Fosfat tamponu	30	-
Örnek	-	30
GSH-Rx (0,5 U/ml)	30	30
Tersiyer bütül hidroperoksit (1,2 mM)	30	30

GSH-Px enzim aktivitesi tayini, reaksiyon ortamı koşullarının 37 °C’de nötr pH’da sağlanması ile gerçekleştirildi. Tersiyet bütül hidroperoksit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. 2 dakika süresince 340 nm dalga boyundaki ışığın absorbans değerleri 1 dakika aralıklarla distile su körüne karşı sıfır ayarı yapılması sonrasında ölçüldü. Sonuçlar NADPH’in 340 nm’deki molar ekstinksiyon katsayısı olan $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ’den faydalanılarak hesaplamalar gerçekleştirildi. GSH-Px enzim aktivitesi nmol/dakika/mg protein olarak ifade edildi. 1 ünite GSH-Px enzim aktivitesi 1 dakika içerisinde 1 μmol GSSG’yi GSH’ye indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlanır.

3.2.10. Protein Konsantrasyonu Ölçüm Yöntemi (Bikinkonik Asit Yöntemi)

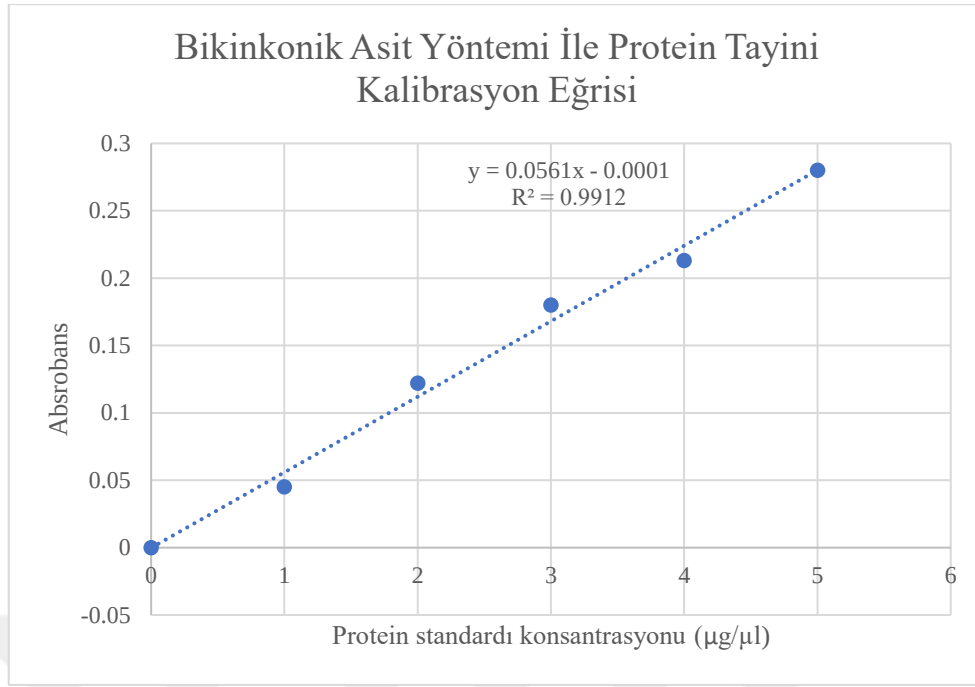
Kültüre edilen hücrelerin hasatı sonrası lizis aşaması ve proteaz ve fosfataz inhibitörlerin tatbiki ve devamında biyokimyasal değişkenler ile ilgili normalizasyon hesaplamaları için gereken total protein ölçümü bikinkonik asit (BCA) yöntemi ile gerçekleştirildi (He, 2011).

Reaktif A: Biçinkonik asit solüsyonu (katalog numarası B9643; Sigma-Aldrich)

Reaktif B: Bakır sülfat solüsyonu (% 4, katalog numarası C2284; Sigma-Aldrich)

Protein standartı: Bovine serum albumin (BSA) (katalog numarası A7030; Sigma-Aldrich)

BSA distile su ile çözülmesiyle farklı (0,5, 1, 1,5 ve 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) konsantrasyonlarda protein standartları hazırlandı. Reaktif A (50) ve B (1) 1:50 oranında karıştırılarak çalışma reaktifi taze olarak hazırlandı. 96’lık mikoplakadaki her bir kuyucuğa 25 μL standart ve öncesinde hazırlanan hücre lizatı pipetlendikten sonra 200 μL kadar çalışma reaktifi kuyucuklara eklendi. Çözeltilerin karışması sağlanacak şekilde 30 dakika kadar 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından distile suya karşı cihazın sıfır ayarı yapıldı ve standart çözeltiler ve örneklerin 562 nm’de absorbansları spektrofotometrede (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices, USA) ölçüldü. Absorbans değerleri ölçülen örneklerle ait protein kantitasyonu, farklı protein konsantrasyonlarında hazırlanan BSA standartlarının 562 nm’ye göre hazırlanmış BSA standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler 4 defa tekrarlandı ve bu tekrarların ortalamalarından elde edilen sonuçlar protein örneklerinin konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) olarak belirlendi.



Şekil 3.18. BCA yöntemiyle total protein tayini kalibrasyon eğrisi ve denklemi.

3.2.11. Sitokin düzeylerinin ELİSA ile belirlenmesi

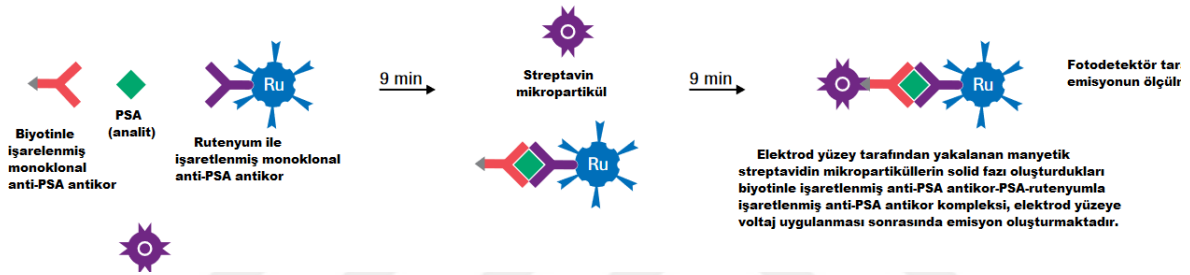
Analizler IL-1 β (Interleukin 1 beta), IL-6 (Interleukin 6), TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) ve TGF- β (Transforming growth factor beta) ELISA kitleri (E0143Hu, E0090Hu, E0082Hu, E3051Hu; BT-LAB, Çin) kullanılarak kit talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. Prostat Spesifik Antijen (PSA) Protein Düzeylerinin Elektrokemilüminesans İmmün Ölçüm ile Belirlenmesi

PSA protein analizleri en az 3 tekrarlı şekilde KOÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında Biyokimya otoanalizöründe (Cobas® e 801 Module, Roche Diagnostics) elektrokemilüminesans immün ölçüm prensibini temel alan PSA analiz kiti (Elecsys® total PSA, Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Mathy ve ark., 2021).

Analizde antikorlardan biri solid faza, diğeri işaretleyici bağlı olduğu yarışmasız (iki yönlü/antikorlu, sandwich) elektrokemilüminesans immün ölçüm gerçekleştirilmektedir. Test kitinde, streptavidin mikropartiküllerle kaplı yüzey, örnekteki PSA proteinini yüksek özgüllük ve affinite ile bağlayan biyotinlenmiş monoklonal anti-PSA antikor ve rutenyum ile işaretlenmiş monoklonal anti-PSA antikorlu içeren 3 temel bileşen yer almaktadır.

Streptavidinle kaplı mikropartiküller biyotinle etkileşime girerek solid fazı oluşturan kompleksi oluşturur. Örnekteki PSA'yı yakalayan biyotinlenmiş anti-PSA antikor-streptavidinle kaplı mikropartikül kompleksi, ölçümün gerçekleştirildiği hücreye elektrod yüzeyin manyetik çekimiyle yakalanarak numune çözeltisi içerisinde aspire edilmektedir. Bu mikropartikül kompleksi dışındakiler uzaklaştırılmaktadır. Elektrod yüzeye uygulanan voltajın indüklediği kemilüminesans emisyon foton sayıcı (photomultiplier) aracılığıyla ölçülmektedir. Kitin PSA proteini ölçüm aralığı 0,002 – 100 ng/ml şeklindedir. Analitin tespit limiti (LOD) 0,011 ng/ml iken, sıfır konsantrasyondaki numunenin tespit sınırı (limit of blank, LOB; analiti içermeyen solüsyon, kör) olarak belirlenen %95. yüzdelikteki değeri 0,007 ng/ml olarak ifade edilmektedir.



Şekil 3.19. Elektrokemilüminesans yöntemiyle PSA ölçümünün şematik gösterimi.

3.2.13. LNCaP Hücrelerinde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Düzeylerinin Akım Sitometride DCFDA Deneyiyle Belirlenmesi

ROT sensitif floresans prob olan H₂DCFDA (2' 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılarak literatürde belirtildiği şekilde intraselüler ROT düzeylerinin florometrik kantitasyonu gerçekleştirildi (Lyublinskaya ve ark., 2017). 6 kuyucuklu kültür kabında gerçekleştirilen deneylerin tamamlanmasıyla kültür medyumunu uzaklaştırdı. LNCaP hücreleri, 10 µM H₂DCFDA içeren PBS içerisinde 37 °C karanlıkta 30 dk. kadar inkübe edilir. Floresans probu inkübasyonun ardından %0,05 tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla kültür kabından kaldırılan hücreler PBS ile yıkanarak hazırlanan hücre süspansiyonuna 150 µL BSA-propidyum iyodür ilave edilerek 10 dk. buz üzerinde bekletildi. ROT düzeylerinin florometrik kantitasyonu, FACS Calibur (BD Biosciences, ABD) akım sitometri cihazında gerçekleştirildi. Akım sitometride, uygun ayarlar gerçekleştirildikten sonra (DCF filtre, 488 nm/25 nm bant genişliği; PI filtre, 575 nm/26 nm bant genişliği) ROT kaynaklı intraselüler floresans şiddet değerleri ölçüldü. İntraselüler DCF floresans şiddeti relatif floresan birimi (RFU, relative fluorescence unit) cinsinden

elde edildi. Verilerin analizi, BD Cell QuestTM software programı ile gerçekleştirildi.

3.3. qRT-PCR ile Gen İfade Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Eif2ak3, XBPs, AUF-1, OCT4, SOX-2, Nanog ALDH1A1, e-cadherin, vimentin, n-cadherin, snail-1, twist-1, TGF- β 1, VEGF (vascular endothelial growth factor), glutatyon peroksidaz (Gpx1), Nrf2, Homoksijenaz-1, c-myc, KLK-3, hOGG1 genlerin ifade düzeyleri qRT-PCR analiziyle belirlendi. İç kontrol olarak GAPDH geni kullanıldı. Forward ve reverse primerler her biri için 0,40 μ mol miktarında liyofilize haldeki ticari ürün (Metabion, Almanya) olarak satın alındı. PCR için uygun saflıktaki steril distile su ile önerilen dilüsyon oranında çözülerek -20 °C’de saklandı. Hücrelerde total RNA izolasyonu için GeneMATRIX Universal RNA Purification kitiyle (kat. no. E3598, EURx Ltd, Gdansk, Polonya) belirtilen talimatlara göre gerçekleştirildi. Örneklerde RNA’nın saflığı ve konsantrasyonu A260 değeri ve A260/A280 absorbans oranları nanodrop UV-spektrofotometre (ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technology, Wilmington, DE, USA) ile ng/ μ l olarak teyit edildi. Devamında cDNA dönüşümü aşaması; cDNA sentezi, ters transkriptaz PCR yönteminde One-Run RT Q-PCR Sistemi 2X (SNP Biotechnology Ltd., Ankara, Türkiye) reverse transkripsiyon kiti kullanılarak mRNA’dan cDNA dönüşümü gerçekleştirildi. Real-Time PCR (LightCycler480-II, İndiana, ABD) cihazında 5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estonya) ürün protokolüne uygun şekilde gen amplifikasyon analizleri gerçekleştirildi.

3.3.1. Gen Primerlerinin Tasarımı

NCBI nükleotid veri tabanına girilerek insan türüne ait araştırma hedeflerinde yer alan 19 genin tam sekansına ulaşıldı. İlgili genin nükleotid sekansının tamamı seçildikten sonra blastlanır. Blastlama için NCBI (National Center of Biotechnology Information) nükleotid blast sekmesine gidildi. Tam gen sekansı kopyalanan ilgili gene ait nükleotid dizisi, blast (Basic Local Alignment Research Tool) sekmesinde ilgili alana yapıştırıldı ve blastlama işlemi başlatıldı. İşlem bitiminde açılan blast sonucu ekranında grafik özeti penceresinde gene ait primer tasarımına uygun ayırıcı bölgeler tespit edildi. Primer dizaynında uygun bulunan gen dizisi bölgesi NCBI veri tabanında gen sekansı sayfasına gidilerek primer dizaynı için uygun bölge dizisi seçilerek kopyalandı. Kopyalanan gen dizisi primer dizaynının gerçekleştirileceği <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> sitesinde ilgili arama çubuğuna yapıştırıldı. Site ekranında primer tasarımına ilişkin ayarlar primer boyutu 20

baz uzunluğu optimum, minimum 19, maksimum 21 ve optimum 20 baz uzunluğu aralığında, ürün boyutu (prob) 851-1000 baz olacak şekilde gerçekleştirildi. Sıcaklık ve guanin/sitozin oranlarına müdahale edilmeden “pick primers” tuşuna basılarak forward ve reverse primerler elde edildi. Çevrimiçi primer tasarlama motorunun verdiği primerler NCBI blast motorunda blastlanarak kontrol edildi. Probun blastlanması için forward ve reverse primerlerin başlangıç noktalarının arasından gen dizisi seçilerek prob dizisi de blast analizi yapıldı.

3.3.2. RNA İzolasyonu

Tümör biyolojisindeki değişimleri belirlenmesinde ilgili hedef gen ifadelerinin qRT-PCR ile araştırılmasında kullanılmak üzere 8×10^5 kadar LNCaP hücresi, 60 mm’lik hücre kültür petri kaplarına ekimi gerçekleştirildi. Deney aşamalarının bitimiyle ortam cam pipetle uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra hücre kazıyıcı kullanılarak petri kültür kaplarından mikrosantrifüj tüplere toplandı. GeneMATRIX Universal RNA Purification kiti üretici firma tarafından belirtilen uygulama talimatlarına göre gerçekleştirildi.

Tablo 3.14. qPCR reaksiyonunda kullanılan karışım içeriği.

	Çalışma hacmi (µl)	Final konsantrasyon
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR SuperMix	10	1X
İleri primer (10 pmol/µl)	0,4	200 nM
Geri primer (10 pmol/µl)	0,4	200 nM
Genomik kalıp DNA	5	1 ng/µl
dH₂O (PCR grade)	4,2	
Toplam	20	
Not: Total volüm dH ₂ O ile 20 µl’ye tamamlanır		

Tablo 3.15. qPCR analizinde sıcaklık, inkübasyon süre ve döngü sayıları.

Siklus basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Siklus sayısı
Başlangıç denaturasyonu	95	3 dakika	1
Denaturasyon	95	15 saniye	45

Annealing/Uzama	60	60 saniye	
-----------------	----	-----------	--

Tablo 3.16. qRT-PCR ile ifade düzeyleri belirlenen genlerin analizde kullanılan forward ve reverse primer dizileri

KLK3 forward primer: 5' – GGA AGC CAG GTG ATG ACT CC – 3'
KLK3 reverse primer: 5' – TCC TCT GGT TCA ATG CTG CC – 3'
Eif2ak3 forward primer: 5' – ATG AAA GCA CAG ACT GGC CA – 3'
Eif2ak3 reverse primer: 5' – GCT GCA TCC ACT GAC TCA CT – 3'
Auf1 forward primer: 5' – GGT GGT TTT GGT GAG GTG GA – 3'
Auf1 reverse primer: 5' – GTC ACC ACC TCT TCC ACG AG – 3'
Nanog forward primer: 5' – GCA TGC AGT TCC AGC CAA AT – 3'
Nanog reverse primer: 5' – TCA CAC GTC TTC AGG TTG CA – 3'
Aldh1a1 forward primer: 5' – CGT GGC GTA CTA TGG ATG CT – 3'
Aldh1a1 reverse primer: 5' – TGG ATC TTG TCA GCC CAA CC – 3'
N-Cad forward primer: 5' – CCT TTC AAA CAC AGC CAC GG – 3'
N-Cad reverse primer: 5' – TGT TTG GGT CGG TCT GGA TG – 3'
Twist1 forward primer: 5' – GTC CGC AGT CTT ACG AGG AG – 3'
Twist1 reverse primer: 5' – GCC AGC TTG AGG GTC TGA AT – 3'
Snail1 forward primer: 5' – GTT TAC CTT CCA GCA GCC CT – 3'
Snail1 reverse primer: 5' – GAG CCT TTC CCA CTG TCC TC – 3'
VEGF forward primer: 5' – CCA TCC AAT CGA GAC CCT GG – 3'
VEGF reverse primer: 5' – TCT CTC CTA TGT GCT GGC CT – 3'
Gpx1 forward primer: 5' – TTG ACA TCG AGC CTG ACA TC – 3'
Gpx1 reverse primer: 5' – ACT GGG ATC AAC AGG ACC AG – 3'
Nrf2 forward primer: 5' – CGG TAT GCA ACA GGA CAT TG – 3'
Nrf2 reverse primer: 5' – AGA GGA TGC TGC TGA AGG AA – 3'
HMOX1 forward primer: 5' – ATG CCC CAG GAT TTG TCA GA – 3'
HMOX1 reverse primer: 5' – AGA GGA TGC TGC TGA AGG AA – 3'
XBPs1 forward primer: 5' – TGT CAC CCC TCC AGA ACA TC – 3'
XBPs reverse primer: 5' – AAG GGA GGC TGG TAA GGA AC – 3'

c-Myc forward primer: 5' – AAC ACA CAA CGT CTT GGA GC – 3'
c-Myc reverse primer: 5' – GCA CAA GAG TTC CGT AGC TG – 3'
hOGG1 forward primer: 5' – TGT ACC GAG GAG ACA AGA GC – 3'
hOGG1 reverse primer: 5' – GCA TTC GAT GGG GTC TTG TC – 3'
GAPD forward primer: 5' – CTG AAC GGG AAG CTC ACT GG – 3'
GAPD reverse primer: 5' – GTC AAA GGT GGA GGA GTG GG – 3'
Ki67 forward primer: 5' – CTG GGT TAC CTG GTC TTA GTT C – 3'
Ki67 reverse primer: 5' – GAG GCT GTT CCT TGA TGA TTT – 3'
Bax-1 forward primer: 5' – GTG CAC CAA GGT-GCC-GGA-AC– 3'
Bax-1 reverse primer: 5' – TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA– 3'
Sox2 forward primer: 5' – ATG GGT TCG GTG GTC AAG TC – 3'
Sox2 reverse primer: 5' – ACA TGT GAA GTC TGC TGG GG – 3'

3.4. İmmünfloresans Kaspaz-3 Aktivitesi Tayini

Hücreler, 6-kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek %5 CO₂ atmosferinde, 37 °C 'de ve 24 saat boyunca ilaçlı/ilâç eklentisiz inkübe edildi. Hücre kültürünün gerçekleştirildiği kuyucuklar, birer kez DPBS tamponu (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkandıktan sonra hücreler, florojenik kaspaz-3 substratı (Caspase-3/7 Green Detection Reagent, Invitrogen™, CellEvent™, Kat. No: C10423, Thermo Scientific, U.S.A) ile 37 °C'de karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. Son olarak, hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve floresan mikroskobu ile görüntülendi (Marmol ve ark., 2017). Kaspaz-3 enzim ürünlerinin, 488 nm'de eksizyon ve 530 nm'de emisyon değerleri kullanılarak (yeşil) ışımaları değerlendirildi. Hücrelerin çekirdekleri DAPI (mavi) floresan boya ile işaretlendi. İmmünfloresan kaspaz-3 boyaması gerçekleştirilen her bir grup için 5 farklı alanda 40X büyütmede preparat incelemesi gerçekleştirildi. Örneklerin immünfloresan analizleri Kocaeli Üniversitesi KÖGEM İmmünohistokimya laboratuvarında, konfokal mikroskobu (Leica DMI 8 Laser Scanning Confocal Microscope) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5. Western Blot Deneyi

Protein örnekleri SDS-PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı ve PVDF membrana transfer edilerek hedef proteine özgü antikorlarla analiz edildi. Western transferi için yarı kuru sistem olan Trans-Blot SD Semi-

Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponun içerisine alınarak yaklaşık 10 dakika bekletildi. Bekleme esnasında PVDF membran ve Whatman kağıtları da transfer tamponunda ıslatıldı. Süre sonunda transfer cihazının demir levhaları arasına alttan üste doğru sırasıyla 2 kat Whatman kağıdı, PVDF membran, jel, 2 kat Whatman kağıdı olmak üzere (–) ve (+) kutuplara dikkat edilerek katmanlar halinde yerleştirildi. Katlar arasında hava kabarcığı olmaması için roller kullanıldı. Serin bir odada 20 V sabit akımda 2 saat boyunca transfer gerçekleştirildi. Transferin ardından membran proteinleri boyayan Coomassie brilliant blue boyası ile boyanarak western transferinin kalitesi kontrol edildi. Protein bantları gözlemlendikten sonra 30 µg miktarında protein içeren örnekler kuyucuklara pipetlendi.

Tablo 3.17. Western blot deneyinde kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları.

No	Çözelti	Miktar-konsantrasyon	Hazırlanışı
1	Tris.HCl pH 6,8	0,5 M, 100 ml	6 g Tris tartılarak 80 ml dH ₂ O ile çözüldü. HCl ile pH 6,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
2	Tris.HCl pH 8,8	1,5 M, 100 ml	18,15 g Tris tartılarak 80 ml dH ₂ O ile çözüldü. HCl ile pH 8,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
3	SDS	%10, 10 ml	1 g SDS tartılıp 10 ml dH ₂ O ile çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
4	Amonyum Persülfat (APS)	%10, 10 ml	1 g APS tartılıp 10 ml dH ₂ O ile çözüldü. Filtre edildikten sonra +4 °C'de saklandı.
5	6X Yükleme boyası (6 X Loading Dye)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, Glycerol (%99,7), %10 SDS, β-Mercaptoethanol, %0,5 (w/v) Bromphenol blue	1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2 ml Glycerol (%99,7), 1,6 ml %10 SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml %0,5 (w/v) Bromphenol blue 2,6 ml dH ₂ O içerisinde hazırlandı.
6	Akrilamid/Bisakrilamid	% 30, 100 ml	29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid tartıldı ve 100

			ml dH ₂ O ile çözüldü. Filtre edilerek +4 °C’de saklandı.
7	SDS-PAGE Yürütme Tamponu	5X, 300 ml	1,5 g SDS, 4,5 g Tris ve 21,6 g glisin ve dH ₂ O ile çözülerek 5X tampon 1X 'e dilüe edildi.
8	Western Blot Transfer Tamponu 1X	100 ml	0,303 gr Tris, 1,44 gr Glisin tartılarak 80 ml dH ₂ O ile çözüldü. Üzerine 20 ml metanol eklendi.
9	TBS-T pH 7,6	25 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2 % 0,1 Tween 20, 1 L	
10	Tris.HCl pH 6,8	0,5 M, 100 ml	2,42 gr Tris, 8 gr NaCl, 1 ml Tween 20, 900 ml dH ₂ O ile çözüldü. pH 7,6’ya getirildikten sonra son hacim 1 L’ye tamamlandı. Son olarak Tween 20’den 1 ml eklendi.

Tablo 3.18. SDS-Page yükleme ve ayırma jelinin hazırlanışı.

	Yükleme (Stacking) jel %5	Ayırma (Resolving) Jel %15
Akrilamid/Bisakrilamid %30	0,67 ml	5,00 ml
Tris-HCl pH 6,8 0,5 M	1,30 ml	-
Tris-HCl pH 8,8 1,5 M	-	2,60 ml
SDS %10	50,00 µL	100,00 µL
dH₂O	2,93 ml	2,20 ml
APS %10	50,00 µL	100,00 µL
TEMED	5,00 µL	10,00 µL
Toplam hacim	5,00 ml	10,00 ml

SDS-PAGE için jel kalınlığı 1 mm olarak planlanarak yükleme ve ayırma jelleri çizelgede verildiği şekilde hazırlanarak cam plakalar arasına döküldü ve 45 dakika jel polimerizasyonun gerçekleşmesi için oda ısında beklenildi. Örneklerin kuyucuklara

pipetlenmesi ve jelde yürütülmesinde moleküller ağırlıkları bilinen renkli protein bantları oluşturan protein ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10- 180 kDa, kat. no: 26616, Thermo Scientific™, ABD) kullanıldı. Uygulanan elektrik akımı ile SDS-PAGE’de moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, protein ladder bantlarına göre konumlandırıldı. Jelde protein bantlarına ayrılan örnekler, PVDF membrana transfer edilerek hedef proteine özgü antikorlarla analizi gerçekleştirildi. Western transferi için yarı kuru sistem olan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. Transfer işlemi öncesinde jel, transfer tamponun içerisine alınarak yaklaşık 10 dakika bekletildi. Bekleme esnasında PVDF membranı metanol ile aktifleştirildi. Sonrasında PVDF membran ve Whatman kağıtları da transfer tamponunda ıslatıldı.

Araştırılan hedef proteinlerin PVDF membrana transfer edilmesi sonrasında, bloklama, primer ve sekonder antikor işaretleme süreçleri iBind (iBind™ Western Device-Thermo Fisher) cihazı ile gerçekleştirildi. Lateral akım prensibiyle çalışan bu sistemde apoptosis ve DNA hasarı tamir yanıtlarına ilişkin fosfo-H2A.X (Ser139) ve cleaved PARP proteinlerinin analizi için ab131385 primer antikor kiti (Apoptosis and DNA Damage (H2A.X(S139) + cleaved PARP1 + Anti-GAPDH) Western Blot Cocktail) ve sc-525409 katalog nolu sekonder antikor kiti kullanıldı. iBind cihazı kullanım talimatları uygulanarak antikor işaretleme aşaması gerçekleştirildi. Primer ve sekonder antikorla işaretlenen protein bantlarının görüntülenmesi DNR MF-ChemiBIS 3.2 cihazında gerçekleştirildi. LumiGLO kemiluminesans deteksiyon sistemi ile önerilen protokole uygun şekilde (CST#7003; 20XLumiGLO® Reagent and 20X peroxide) hazırlanan solüsyon karanlık odada antikorlarla işaretlenen membranların üzerine dökülmesi ve 4 dk kadar inkübe edilmesi sonrasında protein bantlarının görüntülenmesi gerçekleştirildi. Dansitometrik analizler ImageJ 1,53 (NIH, Bethesda, MD, ABD) yazılımı ile gerçekleştirildi.

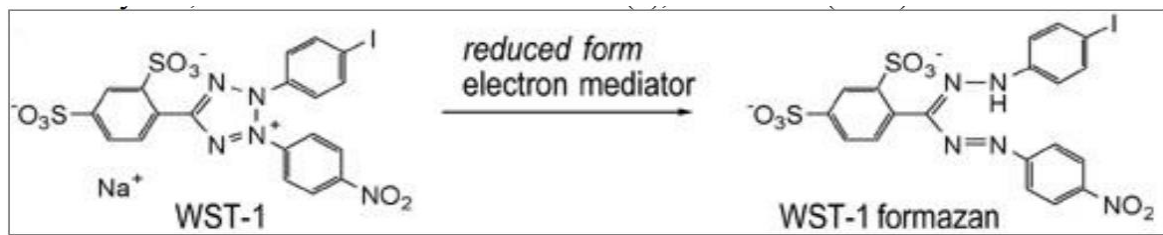
3.6. Hücre Canlılık, Proliferasyon ve Sitotoksite Analizleri

3.6.1. WST-1 (Water-soluble tetrazolium) Analizi

Deney gruplarında hücre canlılık proliferasyon analizleri WST-1 deneyi ile ilgili kitte belirtildiği şekilde (Cell Proliferation Reagent WST-1, CELLPRO-RO, Roche, Almanya) gerçekleştirildi. 10×10^3 LNCaP hücresi 96 kuyucuklu kültür plakalarına ekildi. Hücre kültür deneylerinin tüm aşamalarının tamamlanmasıyla kültür medyum hacminin %10’u (20 μ L) kadar WST-1 reaktifi kuyucuklara uygulandı. 4 saat süresince normal kültür ortamında inkübe edildi. Süre bitiminde 450 nm dalga boyunda formazana bağlı oluşan

absorbanslar ölçüldü. Absorbans değerleri excel programına aktararak % canlılık ve % sitotoksosite verilerine dönüştürüldü. Hücre canlılıklarının WST-1 ile değerlendirilmesi aktif makrofaj kültür ortamıyla oluşturulan enflamatuvar model dolayısıyla karşılaşılabilecek analitik performans değişimleri olasılığı göz önünde bulundurularak verilerin doğruluğu tripan mavisi ile hücre sayımı gerçekleştirilerek test edildi (Strober, 2015; Taskin ve ark., 2020).

WST (Water-soluble tetrazolium) tuzları, tetrazolyum molekülündeki fenil halkasına hidroksil gruplarının eklenmesi ve pozitif veya negatif elektriksel yüke sahip hale getirilmesi ile üretilen formazan boyasının suda çözünürlüğü artırılmış formudur. WST-1 (CAS no: 150849-52-8, 2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium), tuzunun kullanıldığı bu yöntemde, mitokondriyal redüktaz enzimi aktivitesi ile WST-1'in spesifik dalga boyundaki ışığı absorbe eden formazana indirgenmesi ve absorbanstaki değişimin kolorimetrik olarak tayini esasına dayanmaktadır. Mitokondriyal redüktaz enzim aktivitesi canlı hücre sayısı ile ilişkili olması dolayısıyla hücre proliferasyonu ve canlılık düzeyleri ile sitotoksosite oranları olarak bu yöntemde belirlendi. Şekil 3.20'de analizin prensibi görsel olarak sunulmaktadır. Stabil bir tetrazolyum tuzu olan WST-1'in kültür kabında metabolik olarak aktif canlı hücrelerin glikolitik ürünü olan mitokondriyal NADPH redüktaz enziminin aktivitesi neticesinde suda çözünebilen 440-450 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren formazan bileşiğine dönüşmektedir. İmpermeabl bir kimyasal olan WST-1'nin amfipatik özellik gösteren hücre membranında indirgenmesi gerçekleşmektedir (Stockert ve ark., 2018).



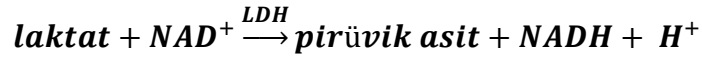
(Ishiyama ve ark., 1993)

Şekil 3.20. WST-1'in mitokondriyal dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyonla formazan bileşiğine indirgenmesi: WST-1 deney prensibinin şematik gösterimi.

3.6.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

LDH enzim aktiviteleri biyokimya otoanalizöründe (Beckman Coulter AU5400, Beckman Coulter Inc., ABD) kolorimetrik yöntemi temel alan kit kullanılarak gerçekleştirildi. Deney prensibi bir oksidoredüktaz olan LDH enziminin l-laktat substratını

pirüvik aside okside ederken ortamda bulunan NAD^+ 'ı $NADH$ 'ya redükte etmesi, $NADH$ miktarındaki artışın 340 nm dalga boyundaki ışık absorbansındaki artışla izlenmesi şeklindedir.



3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

En az 3 tekrarlı gerçekleştirilen hücre kültür deneylerinde elde edilen veriler IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA), Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) ve GraphPad Prism 6.0 Software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) programları kullanılarak analiz edildi. Laboratuvar deneylerinden elde edilen veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (SS) veya standart hata (SH) şeklinde ifade edildi. Deney grupları arasında kantite edilen değişken düzeylerinin farklılığı ve farkın istatistiksel anlamlılığı one-way ANOVA ile test edildi. Tüm değişkenlerin toplu olarak istatistik analizi two-way ANOVA testi, post hoc Bonferroni test yaklaşımı kullanılarak değişkenlerin gruplar arasında çoklu karşılaştırmaları gerçekleştirildi. Western blot ve immünfloresan yöntemlerle elde edilen görüntülerin kantitatif analizi NIH ImageJ (ImageJ, versiyon 1.53, NIH, Bethesda, MD, ABD, <https://imagej.nih.gov/ij/>) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. qRT-PCR sonucunda elde edilen ct değerlerinin, gruplar arası karşılaştırmaları GraphPad Prism 6.0 istatistik programı ile gerçekleştirildi. İncelenen parametrelerdeki değişimler, bazal seviyelere göre “kat değişimi” olarak ifade edildi. İstatistiksel karşılaştırmalar “Bağımsız Örneklem t Testi” kullanılarak gerçekleştirildi. Analizde $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ayrıca değişkenler arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığın istatistiksel gücünü ölçmek adına SPSS’te effect size değerlerinin belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Koşullu Besiyeri İçeriğindeki Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

U937 hücrelerinin PMA ile M0 matür makrofaj hücrelerine farklılaştırılmasının gerçekleştirilmesi sonrasında LPS ve IFN- γ ile M1 polarize tümör ilişkili makrofaj TAMs farklılaşması uyarıldı. Makrofaj hücre kültür besiyeri hücresel içerikten arındırıldıktan sonra içeriğindeki pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar karakterdeki sitokin düzeylerinin (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-10, IL-12p70 ELİSA yöntemi ile, nitrojen oksitler (NOx) ve hidrojen peroksit miktarlarının kolorimetrik biyokimyasal deneylerle analizleri gerçekleştirilerek sitokin profilleri ve hücrelerin polarizasyonlarına uygun metabolik karakter özellikleri sergileyip sergilemedikleri belirlendi. M1 makrofaj polarizasyonu sonrasında elde edilen koşullu besiyeri içeriğindeki IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-10 ve IL-12p70 sitokin düzeyleri ile nitrojen oksit (NOx) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) düzeyleri tanımlayıcı istatistik verileri olarak Tablo 4.1’de sunulmaktadır.

Böylelikle, M1 polarize tümör ilişkili makrofaj kaynaklı *in vitro* enflamatuar tümör mikroçevresi modelinin geliştirilmesinde ihtiyaç duyulan veriler koşullu besiyeri içerik analizleri neticesinde elde edildi. TAMs kaynaklı enflamatuar tümör mikroçevresi modeli bu koşullu besiyerinin LNCaP hücre gruplarında 24 saat süresince kültür ortamı olarak uygulanması ile gerçekleştirildi.

Tablo 4.1. Koşullu besiyeri içeriğindeki sitokin, NOx ve H₂O₂ düzeyleri.

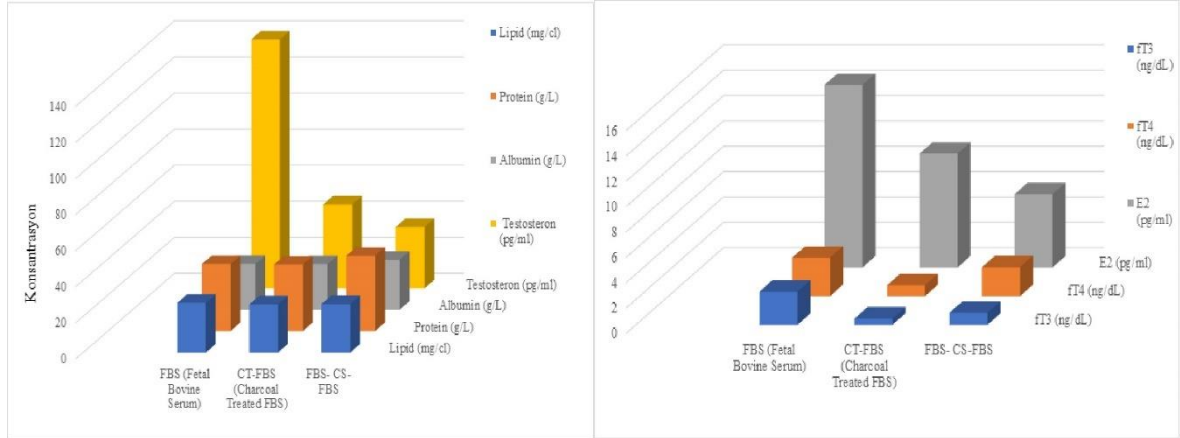
	Birim	Konsantrasyon	Standart Sapma
IL-1β	pg/ml	78,55	2,60
IL-6	pg/ml	58,09	1,60
TNF-α	pg/ml	102,31	4,50
TGF-β	pg/ml	157,88	6,30
IL-10	pg/ml	26,97	290
IL-12p70	pg/ml	397,31	1,80
NOx	μ M	14,71	0,35
H₂O₂	μ M	27,32	0,42

4.2. Dekstran 70 ile Kaplanmış Aktif Kömürle Muamele Edilen Fetal Sığır Serumunun Steroid Hormon, Lipid ve Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

LNCaP hücrelerinin hormondan arındırma aşaması ve devamındaki hücre kültürü deney aşamalarında kullanılmak FBS'nin dekstran 70 ile steroidden arındırılması gerçekleştirildi. üzere dekstran 70 ile kaplanmış aktif kömürle muamele edilen fetal sığır serumunun (CS-FBS, dextran 70 coated charcoal stripped-FBS) östradiol (E2), serbest triiodotironin (fT3), serbest tiroksin (fT4), total testosteron, total lipid, total protein ve albumin düzeylerinin belirlendi. Dekstran 70 ile kaplanmamış aktif kömürle muamele edilen FBS (CT-FBS, charcoal treated-FBS) ve işlem görmemiş FBS ile bu analitlerin miktarları açısından karşılaştırılarak hormondan arındırma işleminin etkinliği gösterildi. FBS'nin dekstran 70 ile kaplanmış aktif kömürle muamele edilmesinin steroid yapıdaki hormon, total lipid ve protein düzeylerine etkisi biyokimya otoanalizöründe belirlendi. Dekstran 70 ile işaretlenmiş serum (CS-FBS, charcoal stripped FBS), total lipid, albumin ve total protein düzeyleri açısından aktif kömürle muamele edilen FBS (CT-FBS, charcoal treated FBS) ve FBS ile benzer olduğu bulundu. CS-FBS estradiol ve testosteron düzeylerinin CT-FBS'ye göre belirgin derecede düşük olduğu, fT3 ve fT4 düzeylerinin ise CT-FBS'de belirgin şekilde düşük bulunurken, bu düşüş CS-FBS'de çok daha ılımlı seviyelerde olduğu tespit edildi. CS-FBS, CT-FBS ve FBS testosteron, E2, fT3, fT4, lipid, protein ve albümin düzeyleri ve değişim oranları Tablo 4.2'de sunuldu.

Tablo 4.2. CS-FBS, CT-FBS ve FBS bileşenleri.

	FBS	%	CT-FBS	%	CS-FBS
Total lipid (mg/cl)	27,42	-	26,63	-	26,76
Protein (g/L)	37,1	-	36,8	-	41,7
Albumin (g/L)	25,3	-	25,2	-	27,7
Testosteron (pg/ml)	138,0	↓ 66 ,4	46,5	↓ 75 ,5	33,9
Estradiol (pg/ml)	14,4	↓ 37 ,6	8,98	↓ 59 ,8	5,78
fT3 (ng/dL)	2,61	↓ 81 ,3	0,489	↓ 64 ,0	0,94
fT4 (ng/dL)	3,02	↓ 82 ,0	0,843	↓ 24 ,6	2,28



Şekil 4.1. CS-FBS, CT-FBS ve FBS'nin içerik analizi.

4.3. Enflamatuvar Stres ve Apalutamidin Oksidatif Hücre Hasarı ve Antioksidan Savunma Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Enflamatuvar stres ve apalutamidin oksidatif hücre hasarı ve antioksidan savunma mekanizmaları üzerine olan etkileri oksidatif stres düzeyinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılan; malondialdehit (MDA), nitrojen oksitler (NOx), hidrojen peroksit (H_2O_2), ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPPs); antioksidan savunma mekanizmalarının durumunu belirlemede kullanılan biyobelirteçler olan; süperoksit dismutaz enzim aktivitesi (Cu-Zn SOD), redükte glutasyon (GSH), total antioksidan kapasite (FRAP eşdeğeri), katalaz enzim aktivitesi ile ilerleyen kısımda değinilecek GSH-Px enzim aktivitesi kolorimetrik yöntemlerle belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.2'de sunulmaktadır.

Deney gruplarının MDA düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2A'da görülebildiği üzere M1 polarize tümör ilişkili makrofaj kaynaklı enflamatuvar çevresel stres uyarımı, LNCaP hücrelerinde (M1 grubu), MDA düzeyleri diğer tüm deney gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. M1+APA grubunda MDA düzeylerindeki farkın istatistiksel anlamlılığı $p < 0,5$ düzeyinde iken kontrol grupları ile enflamatuvar gruptaki hücrelerin MDA düzeyleri açısından değişkenliğin 4 kata ulaşan seviyede olduğu bulundu. Apalutamid uygulanan kontrol grubunda (Kontrol+APA) MDA düzeyleri kontrol grubu ile benzer olarak bulundu.

Deney gruplarının NOx düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2B'de görülebildiği üzere M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuvar çevresel stres ve apalutamid uygulamalarının LNCaP hücrelerinde nitrojen oksit (NOx) düzeyleri M1 ve M1+APA

grupları ile benzer olarak bulundu, Enflamatuvar deney gruplarında NO_x düzeyleri kontrol hücre gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Kontrol +APA ve kontrol grubu NO_x düzeylerinin de benzer olduğu bulundu.

Deney gruplarının H₂O₂ düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2C’de görülebildiği üzere, M1 grubunda H₂O₂ düzeyleri diğer tüm gruplardaki hücrelerden daha yüksek olduğu, H₂O₂ düzeyleri açısından M1 ve M1+APA grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Kontrol+APA grubunda kontrole göre H₂O₂ düzeyleri daha düşük olarak bulunmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

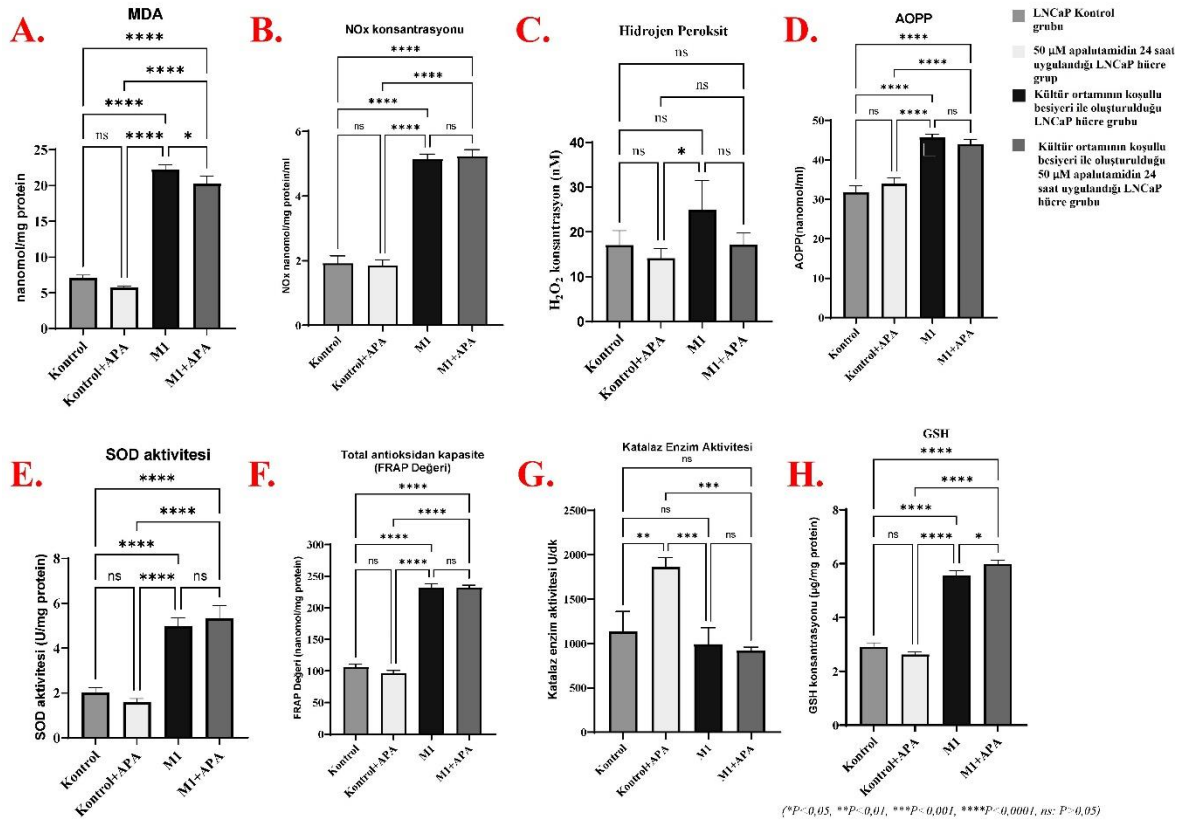
Deney gruplarının AOPPs düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2D’de görülebildiği üzere, enflamatuvar stres gruplarındaki hücrelerde AOPPs düzeyleri kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Gruplar içi karşılaştırmada AOPP düzeylerinin benzer olduğu bulundu.

Deney gruplarının SOD enzim aktivitesi düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2E’de görülebildiği üzere, SOD aktivitesi M1+APA grubunda diğer tüm gruplara göre daha yüksek olarak bulundu. M1+APA ve M1 grupları arasındaki SOD enzim aktivitesi açısından saptanan farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Yine kontrol gruplarındaki hücrelerin SOD aktivitesi açısından benzer olarak bulundu.

Deney gruplarının FRAP eşdeğeri olarak belirlenen total antioksidan kapasite (TAS) düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2F’de görülebildiği üzere, enflamatuvar stres gruplarında TAS düzeyleri kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Gruplar içi karşılaştırmada ise hücrelerin TAS düzeyleri açısından benzer oldukları bulundu.

Deney gruplarının katalaz enzim aktivite düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2G’de görülebildiği üzere, kontrol+APA grubunda katalaz aktivitesi diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Katalaz aktivitesinin, kontrol grubu ile M1 ve M1+APA gruplarındaki hücrelerde benzer düzeyde olduğu bulundu.

Deney gruplarının redükte glutatyon (GSH) düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.2G’de görülebildiği üzere, M1+APA grubunda GSH düzeyleri diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. M1 grubu ile GSH düzeyleri açısından belirlenen fark kontrol gruplarına nazaran daha düşük olduğu ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0,5$ olarak belirlendi.



Şekil 4.2. Enflamatuar stres ve apalutamidin oksidatif hücre hasarı ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisi.

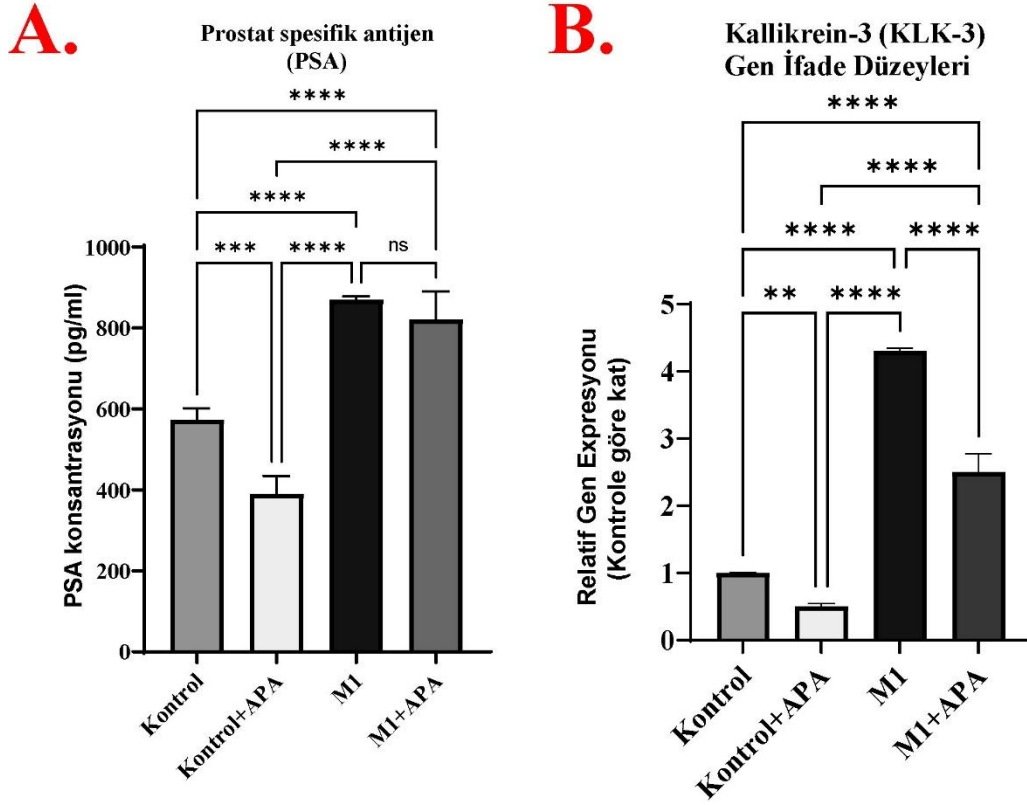
4.4. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Androjen Reseptör Sinyal Yoluğ Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

LNCaP hücrelerinde androjen reseptör sinyal yoluğ aktivitesinin belirlenmesi için PSA protein düzeyleri ile KLK3 gen ifade düzeyleri analiz edildi. Prostat spesifik antijen (PSA) protein düzeylerinin analizi, hücre kültür süpernatantında elektrokemilüminesans immün ölçüm yöntem ile gerçekleştirildi. AR sinyal yoluğ transkripsiyon aktivitesinin bir göstergesi olan KLK3 gen ifade düzeyleri qRT-PCR ile belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.3’de sunulmaktadır.

Deney gruplarının PSA protein düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.3A’da görülebildiğ üzere, PSA protein düzeyleri enflamatuar hücre gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Kontrol+APA grubunda PSA düzeyleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulunurken M1+APA gurubunda PSA düzeyleri M1 grubuyla benzer olarak bulundu.

Deney gruplarının PSA protein düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.3B’da

görülebildiği üzere, KLK3 gen ifade düzeyleri M1 grubunda diğer tüm deney gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Kontrol+APA grubunda KLK3 gen ifade düzeyi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu.



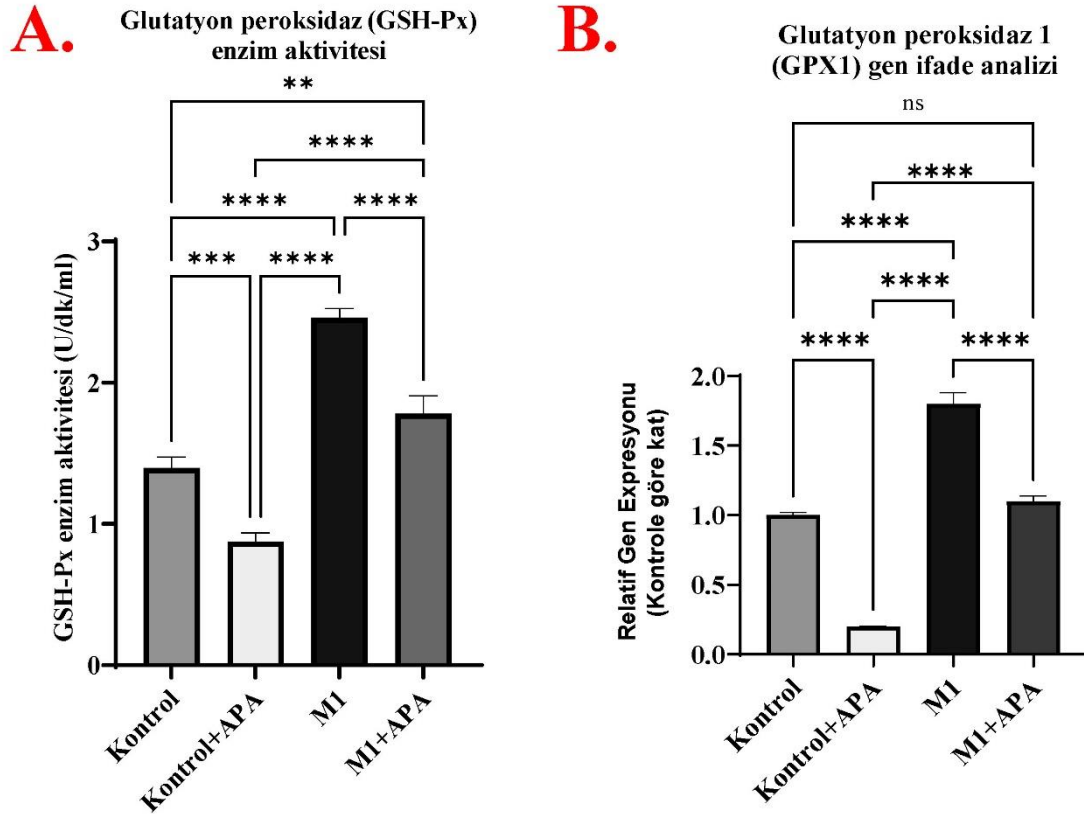
Şekil 4.3. Enflamatuvar stres ve apalutamidin androjen reseptör sinyalizasyonu üzerine etkisi.

4.5. Enflamatuvar Stres ve Apalutamidin Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi ve GSH-px1 Gen İfade Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

LNCaP hücrelerinde GSH-Px enzim aktivitesi kolorimetrik yöntem ile, glutasyon peroksidaz-1 (Gpx1) gen ifade düzeyleri qRT-PCR analizi ile belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.4’de sunulmaktadır.

Deney gruplarının GSH-Px enzim aktivite düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Şekil 4.4A’da görülebildiği üzere, enflamatuvar çevresel stresin modellendiği hücre gruplarında GSH-Px enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olarak bulundu. Apalutamidin LNCaP hücrelerinde GSH-Px aktivitesinin istatistiksel

olarak anlamlı şekilde diğer gruplara göre daha düşük olduğu bulundu. qRT-PCR analiziyle elde edilen veriler Gpx1 gen ifade düzeylerinin de enzim aktivitesindeki değişimle uyumlu olduğu ve apalutamid uygulaması gerçekleştirilen gruplarda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde gen ifadelerinde azalma olduğu, enflamatuar stresin GSH-Px1 gen ifade düzeylerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı olarak artışa neden olduğu bulundu.



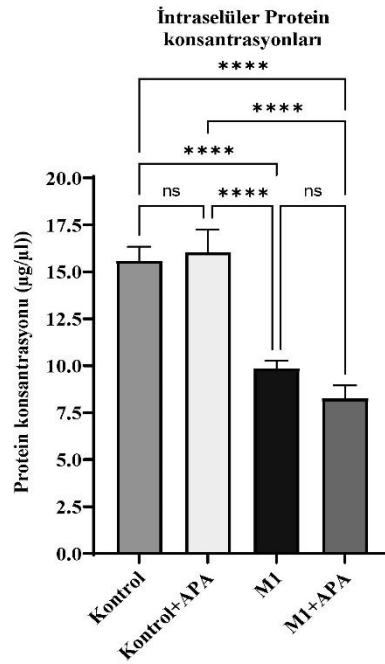
(* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns: $P > 0,05$)

Şekil 4.4. Enflamatuar stres ve apalutamidin GSH-Px enzim aktivitesi ve Gpx1 gen ifade düzeyleri üzerine olan etkisi.

4.6. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin LNCaP Hücrelerinde Protein Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

M1 polarize tümör ilişkili makrofaj kaynaklı enflamatuar stres uyarımı ve apalutamidin LNCaP hücrelerinde intraselüler protein düzeyleri biçinkonik asit (BCA) ile belirlendi ve elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.5'te sunuldu. Enflamatuar stresin modellendiği LNCaP hücre gruplarında protein miktarları istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrol gruplarındaki hücrelere göre daha düşük olarak bulundu. Apalutamid uygulamasının

gruplar arasında protein miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde daha düşük olarak bulundu.

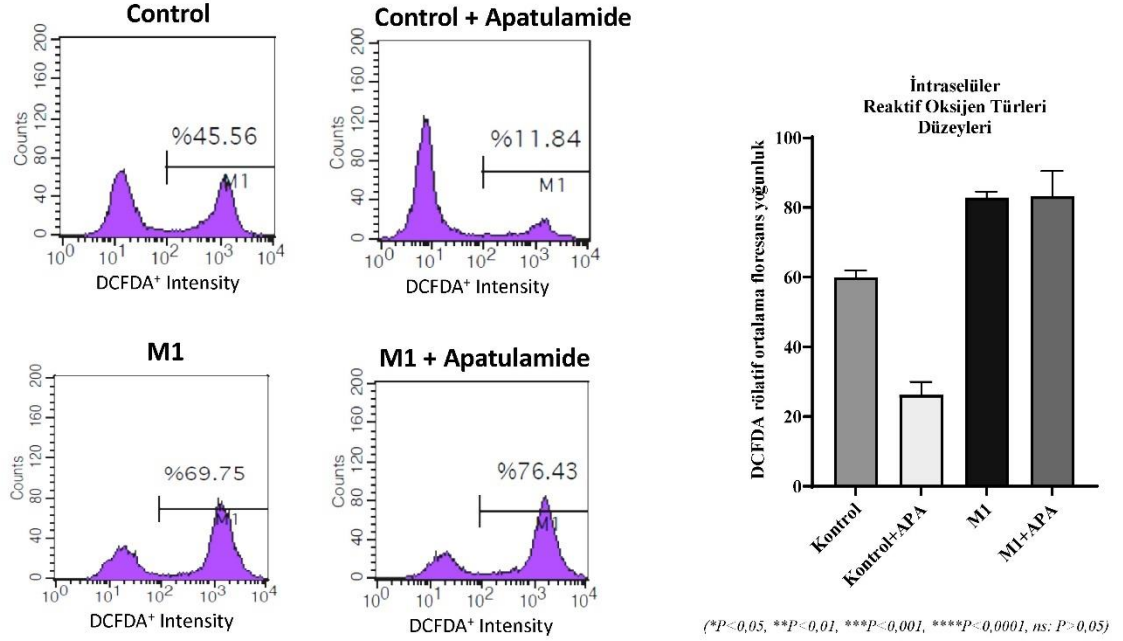


(* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns: $P > 0,05$)

Şekil 4.5. Enflamatuar stres ve apalutamidin intraselüler protein düzeyleri üzerine olan etkisi.

4.7. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin İntraselüler Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

M1 polarize tümör ilişkili makrofaj kaynaklı enflamatuar stres uyarımı ve apalutamidin LNCaP hücrelerinde intraselüler reaktif oksijen türlerinin (ROT) düzeyleri üzerine olan etkileri intraselüler ROT sensitif floresans prob olan DCFDA uygulaması ile akım sitometrede belirlendi, elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.4B’de sunuldu. M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuar çevresel stresin modellendiği LNCaP hücrel gruplarında intraselüler ROT düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu, apalutamid uygulanan kontrol grubunda (Kontrol+APA) ROT düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak bulundu. Bunun dışında enflamatuar hücre gruplarında apalutamid uygulaması ROT düzeyleri açısından benzer olduğu bulundu.



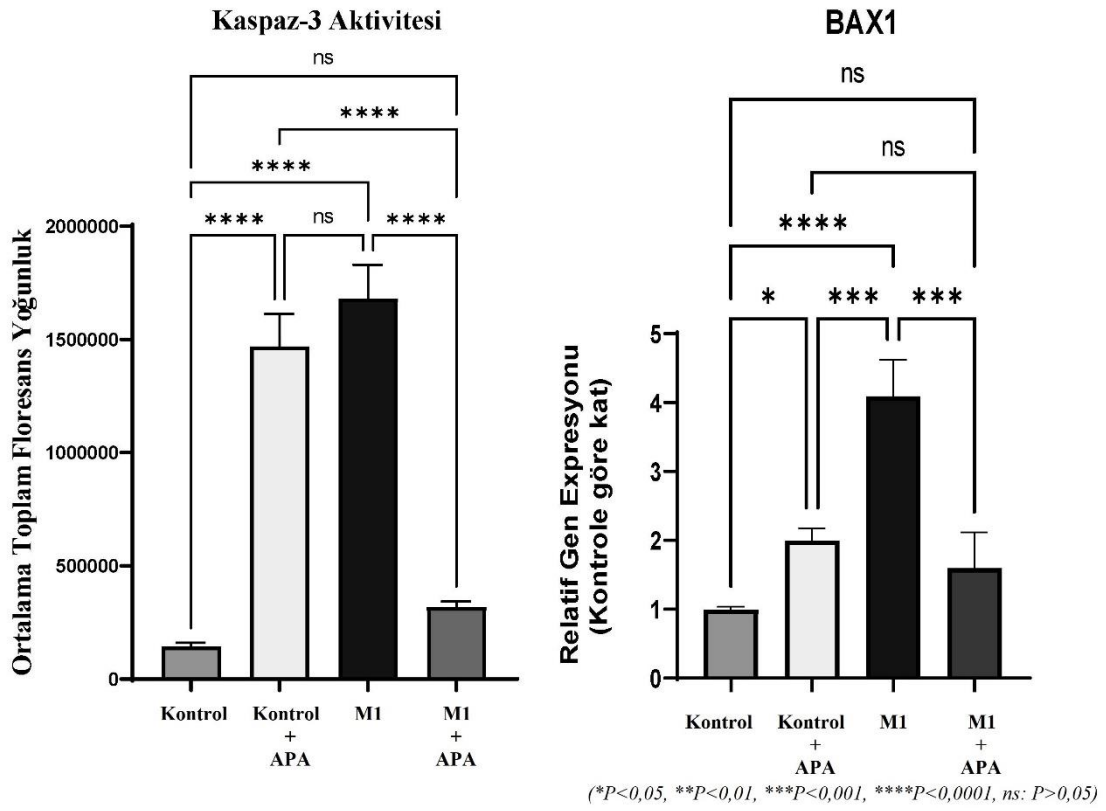
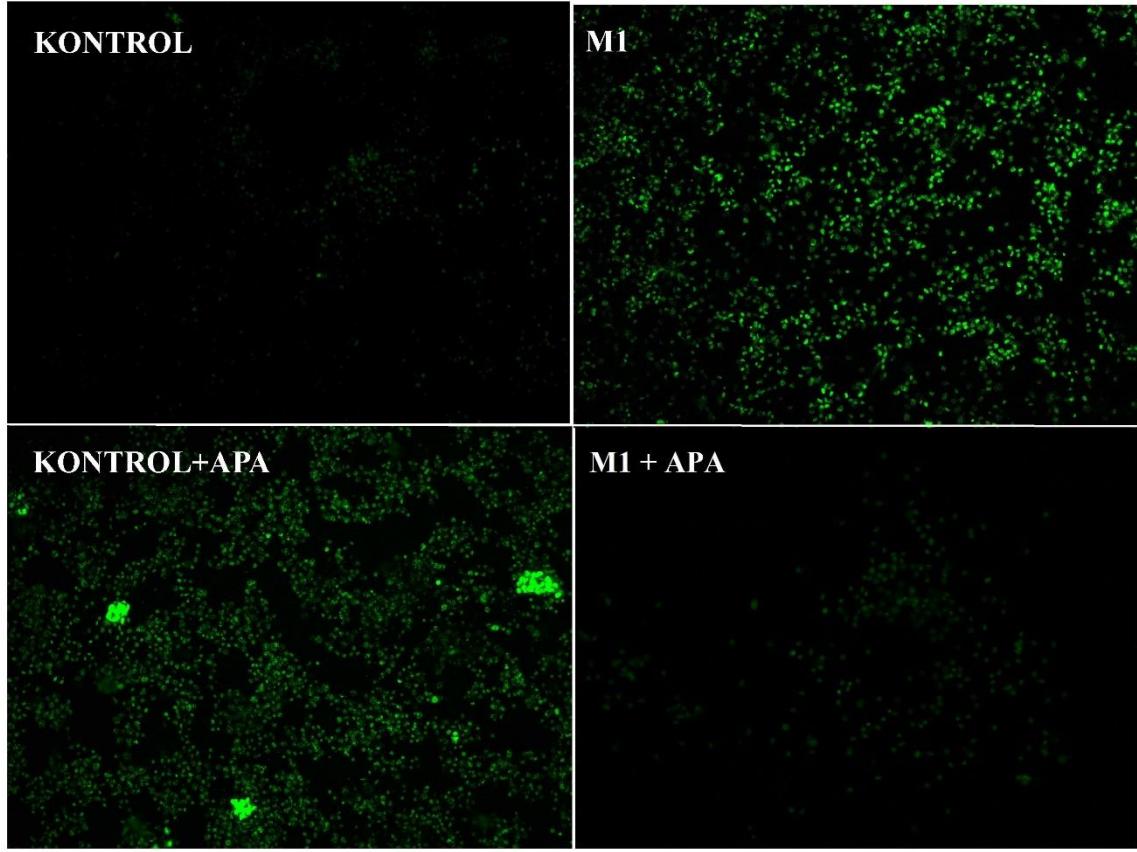
Şekil 4.6. Enflamatuar stres ve apatutamidin intraselüler ROT düzeyleri üzerine olan etkisi

4.8. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Kaspaz-3 Aktivitesi ve Kaspaz Bağımlı İntrensek Apoptozisin Aktivasyonu Üzerine Olan Etkilerin Belirlenmesi

Aktif kaspaz-3 aktivite düzeyleri, floresan işaretli kaspaz-3 substratı kullanılarak konfokal mikroskopta gerçekleştirilen immünohistokimyasal inceleme sonrası elde edilen görüntülerin ImageJ 1,53 (NIH, Bethesda, MD, ABD) yazılımına aktarılması ve ortalama floresans yoğunlukların kantitasonuyla belirlendi. Proaptotoik Bax1 (Bcl-2 Associated X-protein) gen ifade düzeyleri qRT-PCR ile belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.7’de sunulmaktadır.

Kontrol+APA grubunda aktif kaspaz-3 aktivite düzeyi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olarak bulundu. M1+APA grubunda, M1 grubuna göre aktif kaspaz-3 aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu bulundu. M1 grubunda aktif kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu, bu aktivitenin kontrol+APA grubuyla benzer düzeyde olduğu bulundu.

Diğer taraftan M1 grubunda Bax1 gen ifade düzeyleri diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu, kontrol+APA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde (2 kat kadar) daha yüksek olduğu bulundu.

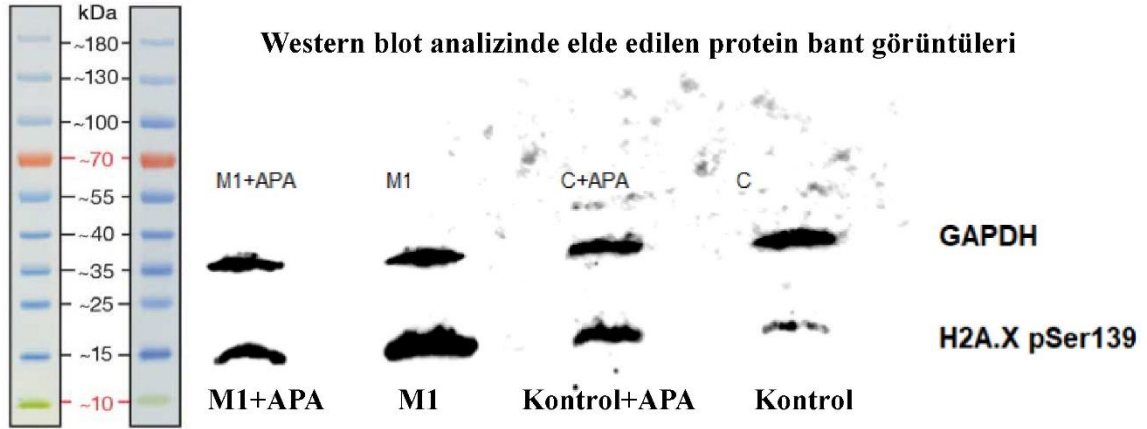


Şekil 4.7. Aktif kaspaz-3 aktivitesi ve Bax1 gen ifade düzeyleri.

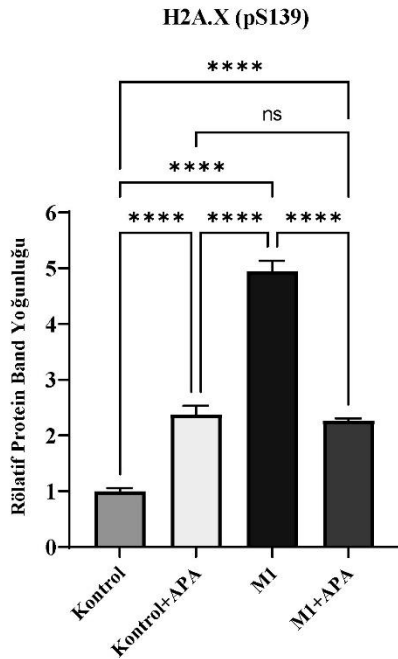
4.9. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Oksidatif DNA Hasarı ve Tamir Yanıtı Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Enflamatuar stres ve apalutamidin LNCaP hücrelerinde oksidatif DNA hasarı ve hasar tamir yanıtı üzerine olan etkileri, H2A.X p(Ser139) protein düzeylerinin western blot deneyiyle, hOGG1 gen ifade düzeylerinin qRT-PCR yönteminde kantitasyonu ile belirlendi.

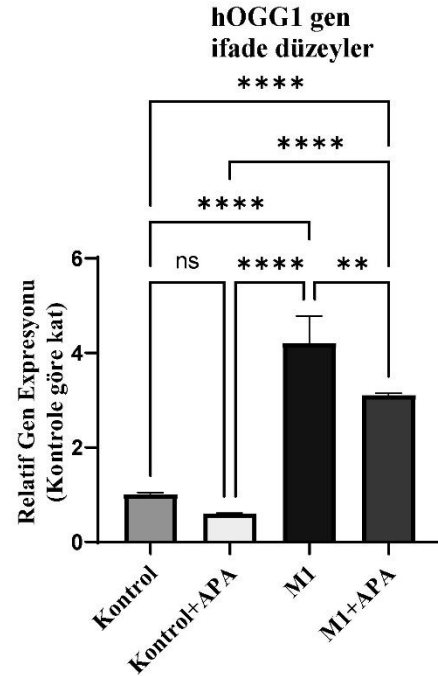
A.



B.



C.



(* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns: $P > 0,05$)

Şekil 4.8. Enflamatuar stres ve apalutamidin oksidatif DNA hasarı ve tamir yanıtı düzeyleri üzerine olan etkisi.

Protein band görüntülerinin dansitometrik analiziyle elde edilen verilerin istatistiksel

analizi sonuçları ile hOGG1 gen ifade düzeyleri Şekil 4.8’de sunulmuştur. M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuvar çevresel stresin uygulandığı hücre gruplarında H2A.X p(Ser139) protein düzeylerinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulundu. Kontrol+APA grubunda H2A.X p(Ser139) düzeylerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek iken, M1+APA grubunda M1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu bulundu. Diğer taraftan hOGG1 gen ekspresyon düzeyleri M1 grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek iken, apalutamid uygulamasının hem M1 hem de kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu bulundu.

4.10. Enflamatuvar Stres ve Apalutamidin Hücre Canlılık ve Sitotoksisite Düzeyleri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

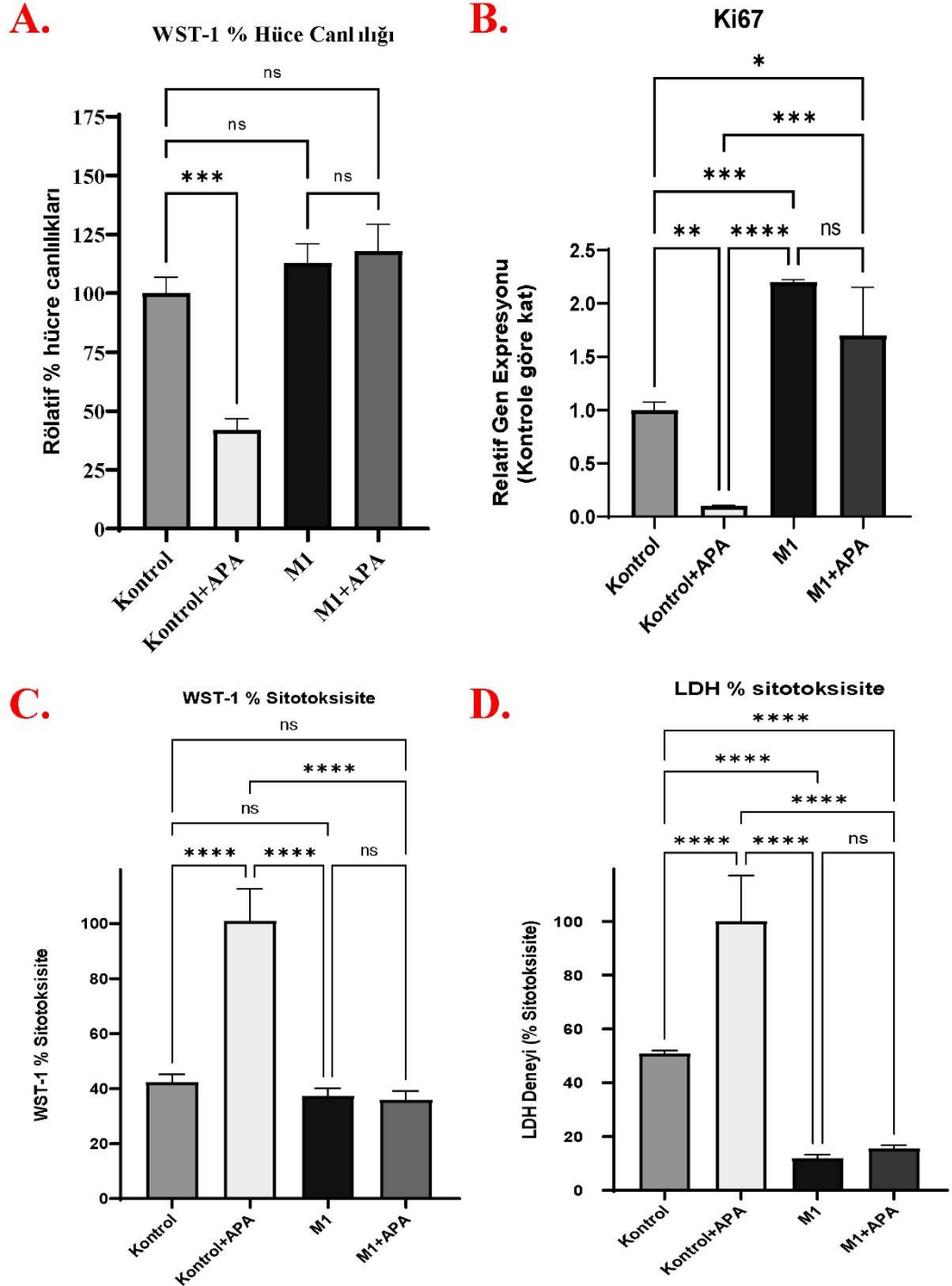
Enflamatuvar stres ve apalutamidin hücre canlılık ve proliferasyon düzeyleri üzerine olan etkileri WST-1 deneyinde rölatif % canlılık ve Ki67 gen ifade düzeylerinin qRT-PCR yönteminde kantitasyonu ile belirlendi. Sitotoksik etkinlik düzeyleri ise WST-1 deneyinde elde edilen veri rölatif % sitotoksisite ve hücre kültür süpernatantında laktat dehidrogenaz enzim (LDH) aktivitesi tayiniyle belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.9’da sunulmaktadır.

Deney gruplarının hücre canlılık düzeyleri açısından karşılaştırıldığı WST-1 analizinde elde sonuçların Şekil 4.9A’da sunulduğu üzere, enflamatuvar hücre gruplarında hücre canlılıkları kontrol gruplarına göre artmış olarak bulundu. Kontrol+APA grubunda hücre canlılıkları kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak bulunurken, M1+APA grubunda hücre canlılıkları M1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde yüksek olarak bulundu.

Deney gruplarının hücre canlılık düzeyleri açısından karşılaştırıldığı Ki67 gen ifade analizinde elde sonuçların Şekil 4.9B’da sunulduğu üzere, enflamatuvar hücre gruplarında canlılık düzeyleri WST-1 ile elde edilen bulgularla uyumlu şekilde kontrol gruplarına göre daha yüksek olarak bulundu ($P<0,001$). M1+APA grubunda Ki67 gen ifade düzeyleri M1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde daha düşük olarak bulundu. Kontrol+APA grubunda Ki67 düzeyleri WST-1 sonuçları ile uyumlu olarak kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu.

Deney gruplarının sitotoksisite düzeyleri açısından karşılaştırıldığı LDH analizinde elde sonuçların Şekil 4.9D’da sunulduğu üzere, kontrol+APA grubunda sitotoksisite

düzeyleri diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak belirlendi. Enflamatuvar deney gruplarında sitotoksosite düzeyleri WST-1 verileriyle uyumlu şekilde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak belirlendi. M1+APA ve M1 grupları sitotoksosite düzeyleri açısından benzer olarak bulundu.



(* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns: $P > 0,05$)

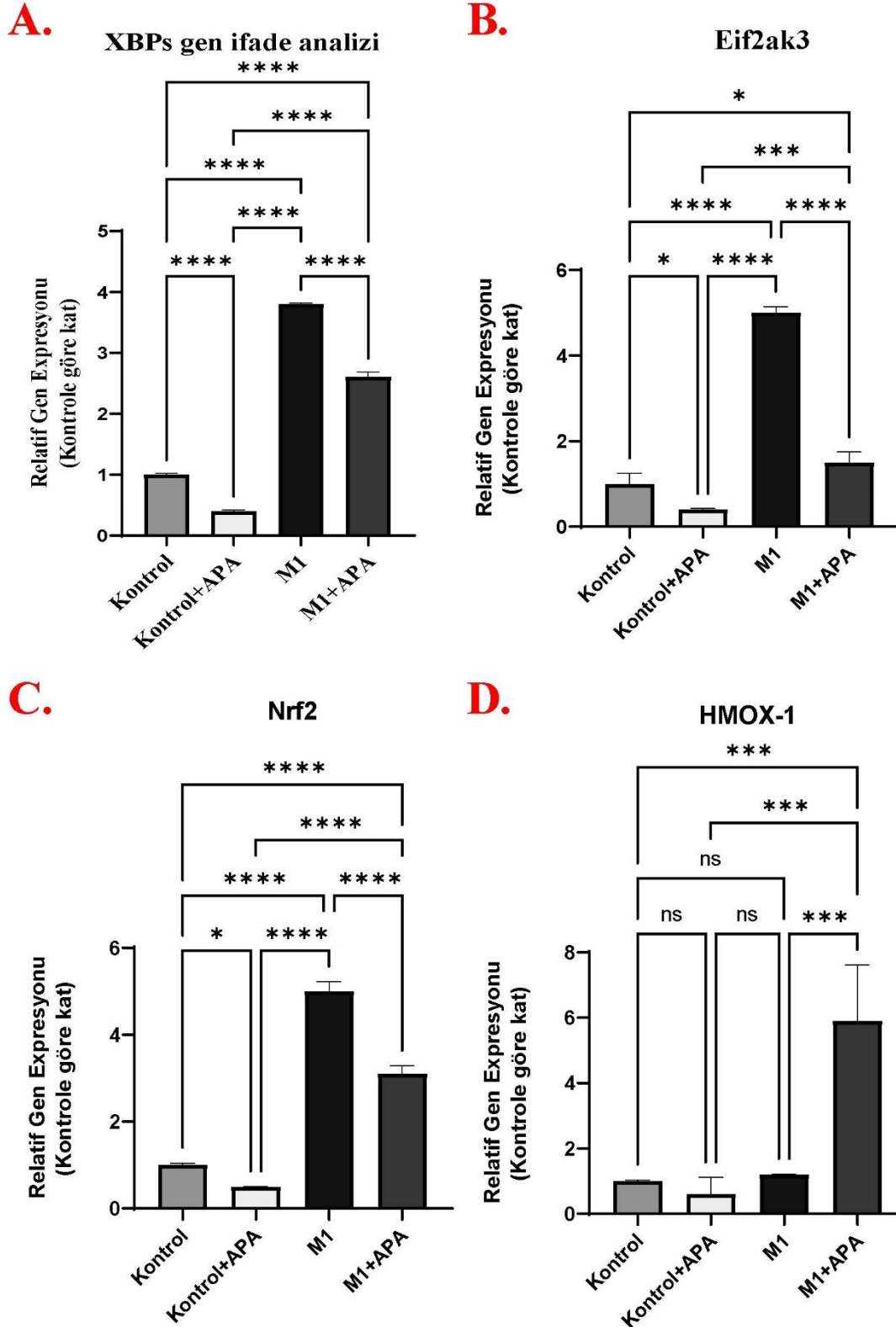
Şekil 4.9. Enflamatuvar stres ve apalutamidin hücre canlılık ve sitotoksosite düzeyleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi.

4.11. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin ER Stresi ile Selüler Entegre Stres Yanıtları Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Enflamatuar stres ve apalutamidin LNCaP hücrelerinde endoplazmik retikulum stresi (ER Stres) ve katlanmamış protein yanıtları üzerine olan etkileri ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış protein miktarını algılayan transmembran sensörü ve transdüser fonksiyonu üstlenen katalitik aktiviteye sahip iki temel protein olan IRE1 α ve PERK üzerinden araştırıldı. ER stresle aktive olarak katalitik aktivite kazanan IRE1 α 'nın substratı XBP1'in ankonvansiyonel intraselüler splicing ile oluşan XBPs mRNA ve PERK proteinini kodlayan EIF2AK3 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2-Alpha Kinase 3) geni ifade düzeyleri qRT-PCR ile belirlendi. Ayrıca enflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili ER stres ve selüler entegre stres yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynayan EIF2AK3, Nrf2 ve HMOX-1 gen ifade düzeyleri qRT-PCR ile belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.10'da sunulmaktadır.

Deney gruplarının XBPs mRNA ve EIF2AK3 gen ifade düzeyleri Şekil 4.10A-B'de sunulduğu üzere, enflamatuar hücre gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Hem kontrol hem de enflamatuar gruplarda apalutamid ilacının XBPs ve EIF2AK3 gen ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşle ilişkili olduğu bulundu.

Deney gruplarının Nrf2 ve HMOX-1 gen ifade düzeyleri Şekil 4.10C-D'de sunulduğu üzere, enflamatuar hücre gruplarında Nrf2 ve EIF2AK3 gen ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrol gruplarından yüksek olarak bulundu. Apalutamid uygulanan gruplarda Nrf2 e EIF2AK3 gen ifade düzeyleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak bulundu. Temel olarak antioksidan sinyal yollarının uyarılması ile ilişkili olan HMOX-1 gen ifadeleri M1+APA grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. Diğer 3 grupta HMOX-1 gen ifade düzeyleri benzer olarak bulundu.

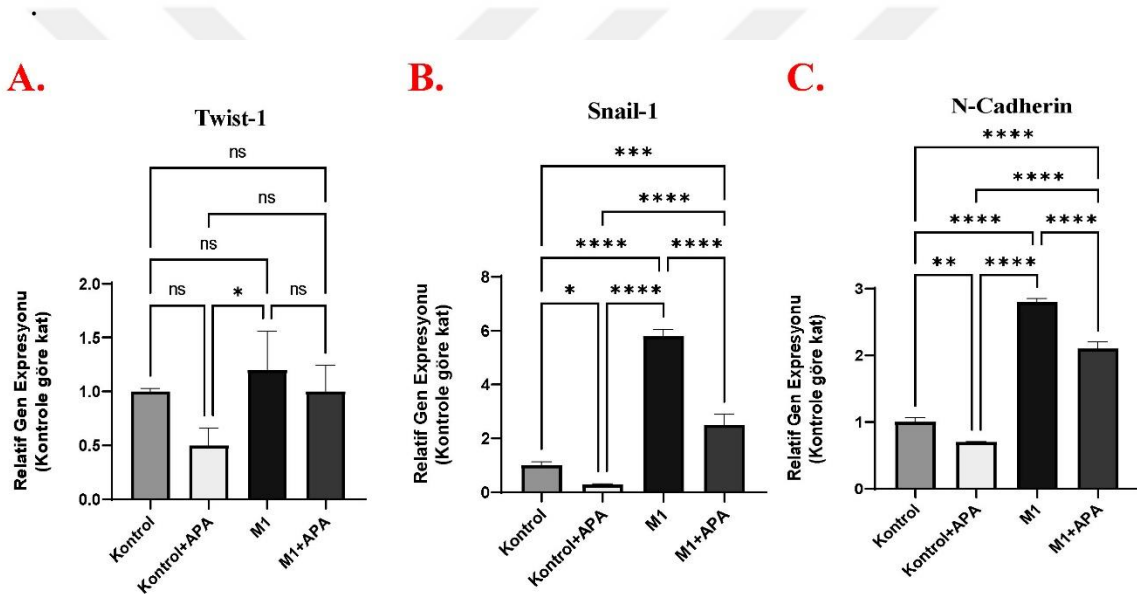


(*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001, ns: P>0,05)

Şekil 4.10. Apalutamid uygulaması ile M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuar stresin LNCaP hücrelerinde ER stresi ve katlanmamış protein yanıtları ile selüler entegre stres yanıtlarına etkisi.

4.12. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin EMT'ye Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Enflamatuar stres ve apalutamidin tümör hücre motilite, vasküler invazyon ve metastatik potansiyellerinin göstergesi olarak epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) üzerine olan etkileri, n-cadherin, twist-1 ve snail-1 gen ifade düzeylerinin qRT-PCR'da analizi ile belirlendi. Analiz sonuçları Şekil 4.11'de sunulmaktadır. Enflamatuar stresin modellendiği hücre gruplarında EMT ilişkili snail-1 ve n-cadherin gen ifade düzeyleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulundu. Apalutamid ilacının uygulandığı gruplarda diğer gruplara göre snail-1 ve n-cadherin gen ifade düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak bulundu. Twist-1 gen ifade düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi.

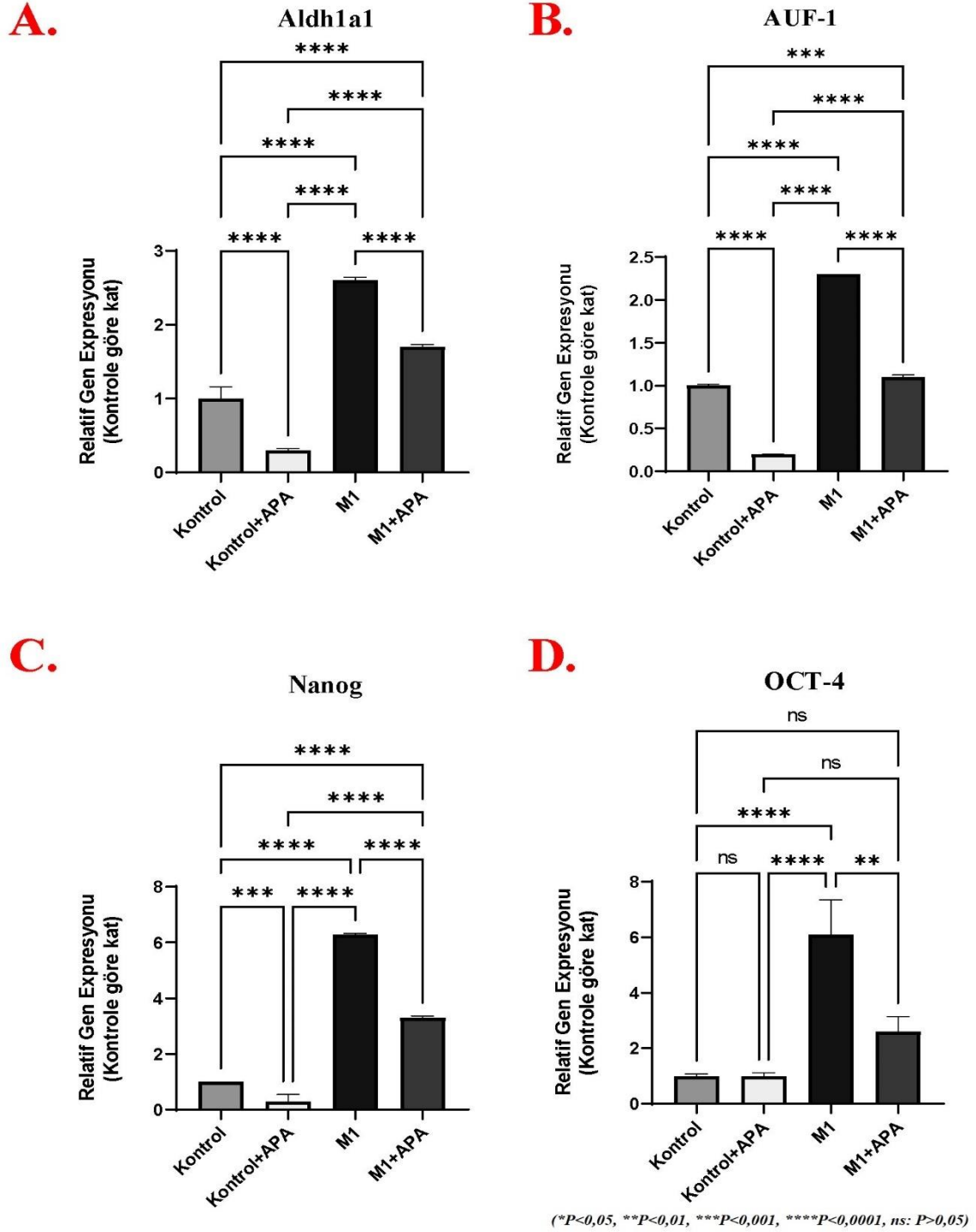


Şekil 4.11. Apalutamid uygulaması ile M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuar stresin LNCaP hücrelerinde ER stresi ve katlanmamış protein yanıtları ile selüler entegre stres yanıtlarına etkisi.

4.13. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Tümör Köklülük Karakteri Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Enflamatuar stres ve apalutamidin tümör hücre köklülük (stemness) karakteri üzerine olan etkileri AUF-1, OCT-4, Nanog ve Aldh1a1 gen ifade düzeylerinin qRT-PCR'da analizi ile belirlendi. Analiz sonuçları Şekil 4.12'de sunulmaktadır. Enflamatuar stresin modellendiği hücre gruplarında köklülükle ilişkili 4 gen ifade düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olarak bulundu. Kontrol+APA grubunda OCT-4 dışında

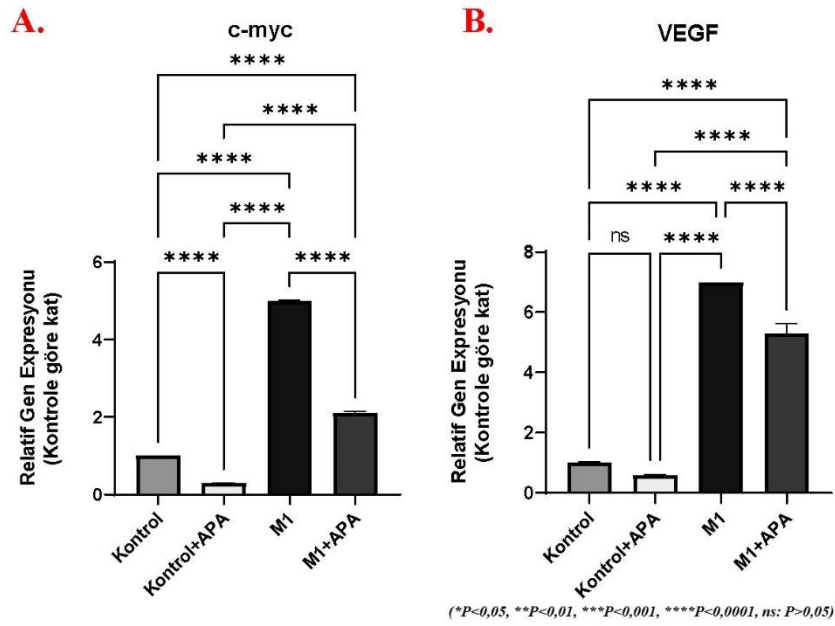
kalan 3 köklülük karakterini belirten gen ifade düzeyleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak bulundu. OCT-4 geni ifadesi kontrol gruplarında benzer olarak bulundu. M1+APA grubunda köklülük ilişkili gen düzeyleri M1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olarak bulundu.



Şekil 4.12. Enflamatuar stres ve apalutamidin tümör köklük karakteri üzerine etkilerinin belirlenmesi

4.14. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Karsinogenez ve Anjiojenez Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

M1 polarize TAMs kaynaklı enflamatuar çevresel stres uyarımı ve apalutamidin, LNCaP hücrelerinde pro-onkogenik sinyalizasyonun değerlendirilmesi c-myc; anjiojenik büyüme faktörü VEGF-A gen ifade düzeyleri qRT-PCR analizi ile belirlendi.

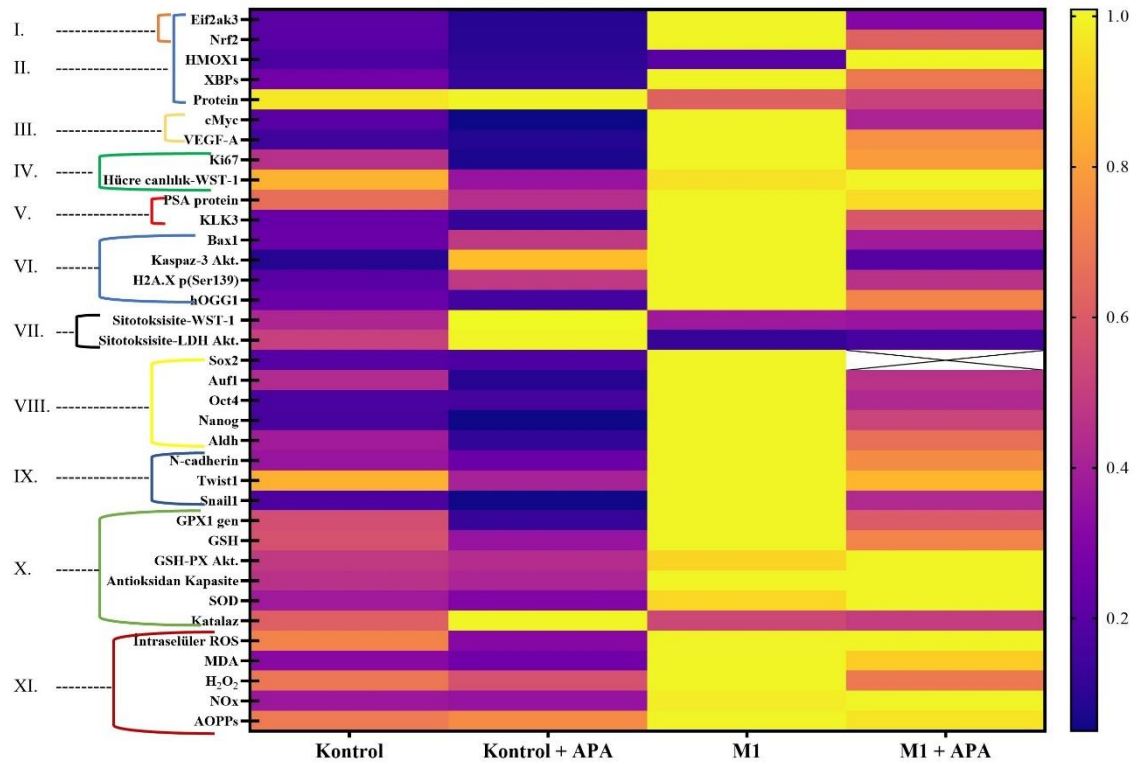


Şekil 4.13. Enflamatuar stres ve apalutamidin c-myc ve VEGF-A gen ifade düzeyleri üzerine etkisinin belirlenmesi

c-myc gen ifadeleri apalutamid uygulamasının gerçekleştirildiği kontrol ve M1 polarize TAMs kaynaklı enflamatuar çevresel stres gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı şekilde daha düşük olarak bulundu. Apalutamid uygulanan kontrol grubunda VEGF-A gen ifadeleri kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ancak gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Apalutamid uygulanan enflamatuar stres (M1+APA) grubunda VEGF-A gen ifadeleri M1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak belirlendi. Farklı şekilde ifade edilirse, enflamatuar stres grubunda c-myc ve VEGF-A gen ifadeleri diğer gruplardan istatistiksel anlamlı şekilde daha yüksek bulundu (Şekil 4.13).

4.15. Enflamatuar Stres ve Apalutamidin Karsinogenez ve Anjiojenez Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

Enflamatuar stres ve apalutamidin tümör biyolojisindeki etkilerinin farklı yönlerini işaret eden verilerin, hücre yanıtlarındaki değişimlerin karşılıklı ilişkileri ve ortak hareket eden sinyal yolları belirlendi. Tez çalışmasında farklı analiz yöntemleri ile elde edilen 36 farklı verinin bütünü dahil edilerek gerçekleştirilen istatistiksel analize ait sonuçlar ısı haritası olarak Şekil 4.14’te toplu olarak sunulmaktadır.



Bulguların kategorizasyonu: I. Entegre stres yanıtı; II. Katlanmamış protein yanıtı; III. Onkojenik aktivasyon-karsinogenez; IV. Hücre proliferasyonu/sağkalımı; V. AR sinyal yolağı aktivitesi; VI. Apoptozis/Oksidatif DNA hasarı; VII. Sitotoksiste; VIII. Tümör hücre köklülük yanıtı; IX. EMT-metastatik potansiyel; X. Antioksidan savunma mekanizmaları; XI. Oksidatif stres. Verilerin istatistiksel analizi tekrarlı ölçümler iki yönlü anova ve post hoc test olarak Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirildi. Analizde kullanılan sayısal veriler her bir değişken için maksimum değere normalizasyonu ile elde edildi. *M1+APA grubunda Soc2 gen ifadesi tekrarlı ölçümlerde de devam eden, anlamı bilinmeyen, abartılı yüksek değerler nedeniyle analiz dışında tutulmuştur.

Şekil 4.14. Enflamatuar stres ve apalutamidin tümör hücresi üzerine olan etkilerine yönelik gerçekleştirilen analizlerin bütünü ısı haritası gösterimi.

Enflamatuar stresin modellendiği M1 grubunda, tümör hücre entegre stres yanıtı, katlanmamış protein yanıtı, onkojenik aktivasyon ve karsinogenez, AR sinyal yolağı,

apoptotik aktivite, tümör köklülüğü, EMT, antioksidan savunma mekanizmaları ve aynı zamanda oksidatif stres düzeyleri diğer deney gruplarına göre yüksek olarak bulundu. Tümör hücrelerinde TAMs kaynaklı enflamatuvar stresin indüklenmesi ve KPY aktivasyonuna bağlı protein düzeylerinde azalma saptandı. M1 grubundaki tümör hücrelerinde HMOX-1 gen ifadesi beklentilerin aksi şekilde Nrf2 ile uyumlu değişim göstermemektedir. Nrf2 entegre selüler stres yanıtının eIF2 α ile birlikte temel bileşenlerinden olan transkripsiyon faktörü olup, HMOX-1 gen ifadesini düzenlenmesinde görev almaktadır. Enflamatuvar stresin modellendiği deney gruplarında entegre selüler stres yanıtının düzenleyici olarak fonksiyon üstlendiği apoptotik aktiviteyle birlikte hücre proliferasyonunda artış ve selüler sitotoksosite düzeylerinde azalma saptandı. Apalutamid uygulanan kontrol grubundaki hücrelerde katalaz enzim aktivitesindeki artışla birlikte hücre sitotoksosite düzeyleri diğer gruplara göre daha yüksek olarak saptandı. Uyumlu olarak hidrojen peroksit düzeyleri kontrol+APA grubunda düşük saptanırken, M1 grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olarak saptandı. İntraselüler reaktif oksijen türleri düzeylerinin tüm gruplarda malondialdehit ile uyumlu şekilde değişim gösterdiği, oksidatif stres M1 grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu bulundu. GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri M1+APA grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olarak saptandı. Total antioksidan kapasite düzeyleri antioksidan sistem biyobelirteçleri ile uyumlu değişim gösterdiği saptandı. Selüler sağkalımı mümkün kılan entegre stres yanıtları ile tümörögenezisde tümör hücrelerini destekler nitelikteki değişimler hücre canlılık düzeylerindeki artışla uyumlu olarak bulundu.

5. TARTIŞMA

Erkek cinsiyette en sık görülen solid doku kanser türü olan prostat kanseri, hastalığın belli aşamalarında, nükleer hormon reseptörü olan AR sinyal yolağı aktivitesine bağımlı gelişim göstermektedir. AR, normal prostat dokusunun embriyonik gelişim süreçlerinden başlayarak organizmada üstlendiği organ spesifik fonksiyonların yerine getirilmesindeki esansiyel konumunun bir benzerini PK gelişimi ve hastalık progresyonu süreçlerinde sergilemektedir. Karsinogenezin AR sinyal aktivitesine gereksinim gösteren biyolojik süreçlerinde (AR genomik ve nongenomik sinyalizasyonundaki disregülasyon) oluşan dalgalanma ve birtakım değişimlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Sommer ve ark., 2022). Glandüler dokular olan prostat ve meme parankim hücrelerinde, seks steroid hormon reseptör aktivitesinin orkestrasyonunda açığa çıkan metabolik aktivite seviyesindeki artış ve beraberinde gelişen glikolizasyon, organel biyogenezi ve veziküller trafikteki artış gereksinimleri ile yoğun protein sentezi gerçekleşmektedir. Bu durum prostat ve meme kanserlerinde, ER stresinin uyarılmasına bağlı tümör hücre adaptif yanıtı olan KPY ile selüler entegre stres yanıtı aktivasyonuna yol açmaktadır. Anabolik metabolik süreçlerde denge durumunun bozulmasıyla ortaya çıkan protein katlanması ve işlenmesi süreçlerinde meydana gelen bozulmalar, glandüler hücrelerde özellikle de temel fonksiyonu sekresyon olan lüminal epitel hücrelerinde kaçınılmaz şekilde proteotoksik ve oksidatif stres artışını doğurmaktadır. Bunun yanı sıra, karsinogenezin başlangıç aşamalarında PI3K/Akt/mTOR aktivitesinin kontrolündeki bozulmanın rol oynadığı artmış protein sentezi ve hipoksi ile birlikte glikolitik ve anabolik aktiviteyi kontrol eden negatif geri besleme mekanizmalarında yitimler sonucu hali hazırda metabolik aktivitenin yoğun olduğu bu hücrelerde stres düzeylerinde aşırı artışları beraberinde getirmektedir (Doultsinos ve Mills, 2020). Sonuç olarak prostat karsinogenez süreçlerinin bütününde önemli bir yere sahip olan ER stres yanıtı ve entegre stres yanıtı, tümör biyolojisinde meydana getirdiği adaptif değişimlerle, kanser hücrelerinin stresle baş edebilme kapasitelerinde artışı sağlayarak, hücre kurtuluşu ve tümör progresyonuna esansiyel katkılar sunmaktadır (Abou Khouzam ve ark., 2020; Bai ve ark., 2021; Direito ve ark., 2019; Pachikov ve ark., 2021; Sikkeland ve ark., 2022). İntrensek selüler stresle birlikte karşılıklı etkileşim içerisindeki çevresel ve genetik faktörler, prostat karsinogenezinde belirleyici olmaktadır. Artan sayıda bilimsel kanıt, başlangıç aşamasından tedavi direnci

gelişimi dahil PK'nin tüm süreçlerinde kronik enflamasyonun yer aldığını işaret etantitümöral immün yanıtların bozulması, mikroçevrenin yeniden düzenlenmesi gibi tümör progresyonu yönünde indirekt etkileri yanı sıra prostat tümör hücresinde onkojenik sinyal yollarının uyarılmasında da rol oynadığı gösterilmiştir (Nguyen ve ark., 2014). Enflamasyon, Jak/STAT3/IL-6, NF-κB, PI3K/AKT gibi bilinen hücre büyüme ve çoğalması süreçlerinde rol alan onkojenik sinyal yollarının dışında birçok intraselüler stres yanıt yollarını da etkinleştirerek tümör sağkalımı ve progresyonunu desteklemektedir (Velazquez-Caldelas ve ark., 2019; Zhao ve ark., 2021).

M1 polarize TAMs kaynaklı enflamatuar tümör mikroçevresinin *in vitro* olarak koşullu besiyeri kullanarak modellendiği bu tez çalışmasında, enflamatuar çevresel stres bileşenleri olarak ROT, pro-enflamatuar/anti-enflamatuar sitokinler, H₂O₂, NO_x vd M1 polarize makrofajlar tarafından kültür ortamına sekrete edilen biyoaktif mediyatörleri içeren koşullu besiyerine (KB) 24 saat süresince maruz bırakılan LNCaP hücrelerinde ER stresin indüklenmesi ve KPY ile adaptif entegre stres yanıtının aktivasyonu ile tümör biyolojisinde meydana gelen değişimler araştırılarak antiandrojen ilaç direnci ve tümör progresyonundaki rolleri aydınlatılmaya çalışıldı. Ayrıca enflamatuar stres ile apalutamidin LNCaP hücrelerinde AR sinyal yolağı aktivitesi üzerine olan etkileri, PSA protein ve KLK-3 gen ifade düzeylerinin analiz edilmesiyle belirlendi.

U937 monositik hücrelerinin iki aşamalı kimyasal indüksiyonuyla elde edilen M1 polarize TAM'lar kullanılarak oluşturulan *in vitro* enflamatuar TM stres modelinde hormon duyarlı prostat adenokarsinom hücreleri üzerindeki etkileri LNCaP hücre hattı ile yapılan, M1 deney grubu olarak adlandırılan hücre kültür deneyleri sonunda, 24 saatlik enflamatuar çevresel stresin tümör hücre canlılıklarında artma, selüler sitotoksitede azalma ile proliferasyonda artışa neden olduğu WST-1 deneyi, LDH enzim aktivite analizi ve Ki67 gen ifade analizleri ile gösterildi. Ayrıca enflamatuar stresin modellediği M1 deney grubunda, reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin neden olduğu MDA düzeylerindeki artışla belirlenen membran lipid peroksidasyonu, H2A.X p(Ser139) protein ve hOGG1 gen ifade düzeylerindeki artışla belirlenen oksidatif DNA hasarı ve DNA hasar tamir yanıtlarında artış ile aktif/kesilmiş kaspaz-3 aktivitesini immünohistokimyasal olarak belirlenmesini sağlayan florojenik kaspaz-3 substratı kullanılarak gerçekleştirilen immünfloresan boyama tekniğinde kaspaz-3 aracılı indüklenen apoptozisin en yüksek düzeyde olduğu belirlenirken, diğer yönden de tümör hücre sağkalımını sağlayan KPY, entegre stres yanıtı ile karsinogenezi destekleyen, antioksidan savunma mekanizmalarının da yer aldığı hücre sinyal yolları aktivasyonunun da aynı şekilde kontrol grubundaki

tümör hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterildi. Enflamatuvar stresin LNCaP hücrelerinde AR sinyalizasyonunu arttırdığı, antioksidan savunma mekanizmalarını uyardığı, anijojenez, tümörögenez, köklülük, EMT ve adaptif entegre stres yanıtları ile KPY'yi aktifleştirdiği ve apalutamidin sitotoksik etkinliğinin yitirilmesine karşın, tümör progresyonunu baskılayıcı nitelikte etkilerinin sürdüğü bulundu.

Literatürde artan bilimsel kanıtlarla desteklenen şekilde PK'de kanser kök hücre benzeri hücrelerin (PCSCs, prostate cancer stem-like cells) tedavi direnci ve metastazda önemli rol oynadığını gösteren birçok çalışma yer almaktadır. Nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin katalizlediği reaksiyonla sentezlenen nitrik oksitin (NO) tümör progresyonunu destekleyen nitelikte fonksiyonlar üstlendiği bilinmektedir. PK'de PCSCs'lerin gelişim ve büyüme süreçleri ile KDPK progresyonunda NOSs ve NO sinyal yolağının etkinliğini araştırmayı amaçlayan, CD163/CD44 yüksek ifade eden hücrelerin FACS'ta (Fluorescence-activated Cell Sorting) tasnifiyle PCSCs açısından zenginleştirilmiş antiandrojen dirençli hücre hatlarıyla (LNCaP-BC32, VCaP, 22RV1, DU145 ve PC-3 M) 3 boyutlu sferoid hücre kültüründe gerçekleştirilen bir çalışmada, yüksek dereceli PK ve metastatik KDPK tümör hücrelerinde eNOS'un (endotelial NOS) yüksek ifadelendiği, KDPK ksenograft modelinde eNOS ifadelerinde çarpıcı boyutlardaki artışı ile intraselüler NO düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir (Gao ve ark., 2022). İlgili çalışmada araştırmacılar, farklı tümör hücrelerinden izole edilen PCSCs'lerin eNOS/NO sinyal yolağının istatistiksel olarak anlamlı şekilde aktif olduğunu göstermişlerdir. Fonksiyonel analizlerin neticesinde, eNOS aktivitesindeki artışın PK'de tümörögenezi destekleyici ve metastatik potansiyelde artış yönünde protümöral özellikler sergilediği tespit edilmiştir. eNOS/NO sinyalizasyonu ile düzenlenen aşağı akış yollarının dahil edildiği analiz sonucu NO-sGC-cGMP-PKG efektör sinyal yolağı aktivasyonunun karakterize edildiği ve bu yolak aracılığıyla eNOS sinyalizasyonunun antiandrojen ilaçlara dirençli PK hücreleri ile PCSCs'lerde büyümeyi desteklediği bildirilmektedir. Araştırmacılar, çalışmanın sonucu olarak antiandrojen dirençli PK ve PCSCs hücrelerinde artan eNOS ifadesinin yukarı akış düzenleyicisi olan nükleer reseptör $ERR\alpha$ (Estrogen-related receptor alpha) ve ERG [erythroblast transformation-specific (ETS)-related gene] onkogeni ile transkripsiyon faktörünü hedef alan terapötik yaklaşımların aynı zamanda eNOS sinyalizasyonunda sönümlenmeye yol açabileceğini, bu şekilde potansiyelize bir antitümöral etkinlik vadettiğini ifade etmektedirler. Dahası, nitrojenik sinyal yolağının yoğun olduğu M1 polarize TAMs'larla modellenen enflamatuvar tümör mikroçevresinin, aktarılabılır (transmissible) ER stresinde olduğu gibi mikroçevrede yer alan hücrelerin ortama sekrete

ettikleri biyoaktif moleküller aracılığıyla komşu hücelere transfer edilebildiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Arora ve ark., 2018; Mahadevan ve ark., 2011; Perrotta ve ark., 2018; Rodvold ve ark., 2017; Urra ve ark., 2016; Wei ve ark., 2019). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, LNCaP hücrelerinde nitrozatif stres ile ER stres indüksiyonu TAMs kaynaklı çevresel stres ile gerçekleştirildi. Elde edilen bulgularla mevcut literatür uyumu değerlendirilerek, NOS sinyal yolağı ile KPY ve entegre stres yanıtlarının protümöral etkileri olduğu, antikanser ilaç direncine neden olan faktörlerden olduğu gösterildi.

Literatürde prostat kanser hücreleri ile tümör mikroçevresindeki T hücre ve monosit/makrofaj gibi immün hücreler arasındaki etkileşimin tümör biyolojisi üzerine olan etkilerinin koşullu besiyeri ile *in vitro* modellendiği çalışmaların geçmişi 90lı yılların ortalarına kadar uzandığı görülmekte ve yapılan çalışmaların o döneme yön veren genel kanı doğrultusunda antitümöral immün hücre fonksiyonları ekseninde ilerlediği gözlemlenebilmektedir (Hsieh ve Chiao, 1995; Hsieh ve ark., 1995). Periferik kandan izole edilen monosit hücrelerinde (PMBC) fitohemaglutinin-M ile mitozun uyarılması ve 48 saat kültürüyle elde edilen, monosit koşullu besiyerinin %10-60 oranlarında LNCaP hücre kültür ortamı olarak kullanılması ile oluşturulan ve hücrelerin bu enflamatuvar tümör mikroçevresinde 72 saat süresince kültüre edilmesi sonrası tümör hücre canlılıkları, AR ve PSA protein düzeylerinin değerlendirildiği çalışmada elde edilen sonuçlar çalışmanın araştırma hipotezi olarak belirlendiği ifade edilen monosit hücrelerinin antitümöral fonksiyonlar üstlendiğini gösterir niteliktedir (Culig ve ark., 1998). Çalışmada, monosit koşullu besiyerini (MKB) değişken oranlarda kültür ortamı olarak uygulandığı LNCaP hücrelerinde, 72 saat kültür sonunda %40 MKB uygulanan grupta hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre %50, AR protein düzeyleri %70 ve PSA düzeylerinin %80 oranında düşüş gözlemlendiği bildirilmektedir. Araştırmacılar tümör biyolojisindeki tüm bu değişimlerde rolü olabileceğine inandıkları iki faktörü test ettiklerinde prostaglandin E₂ (PGE₂)'nin (PGE₂'nin tek başına 1-10 µM dozlarında gerçekleştirdikleri deneylerin neticesinde) hücreler üzerine herhangi bir etkisi olmadığını, IL-1β'nın ise tüm bu değişimlerden sorumlu olabileceğini gösteren bulgulara eriştiklerini bildirmektedirler: IL-1β'nın 0,1-10 ng/ml dozlarında LNCaP hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen bulgular MKB ile benzer şekilde olduğu bildirilmektedir. İkinci bir deney planlayan araştırmacılar IL-1βR inhibitörü ilaçla bu etkilerin önlenebileceğini göstererek elde ettikleri sonuçlara mekanistik bir izahat getirebilmişlerdir. Çalışmada, uygulamaların 24 saat verileri makalede paylaşılmadığını, LNCaP hücrelerin hormondan arındırılma işleminin 72 saat süren protokolle gerçekleştirilmesi, hücrelerin strese daha duyarlı hale getirmiş

olabileceğini ifade etmek önemlidir. Deney sonunda ışık mikroskopu altında incelenen LNCaP hücrelerinin dentritik hücre morfolojisine ve uzamış fibriler yapıdaki hücrelere dönüşmesi, çalışma sonunda canlılıklarını koruyabilen LNCaP hücrelerinde nöroendokrin farklılaşmanın neticesi olduğu ifade edilebilir. Bunun dışında araştırmacılar LNCaP hücrelerini 72 saatlik %5 CS-FBS ile hormondan arındırma sonrasında 90 dakika oda ısısında R1881 (sentetik potent androjen; metribolone, methyltrienolone) ile muamele ederek planladıkları AR bağlanma deneyinde MKB'nin androjen reseptör sinyal yolağı üzerine olan etkisini nonkompetitif inhibisyon olarak açıklamışlardır. Bu durum MKB ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde AR proteini miktarındaki azalmanın (ubiquitinasyon-proteozomal degradasyon) sonucu gerçekleşmesi ile açıklanabilir. Son olarak literatürdeki ilgili çalışmaya ilişkin bir takım soru işaretlerini ifade etmek yerinde olacaktır: öncelikle periferik kandan izole edilen monositlerin kültüre edildikleri CS-FBS'nin ısı işlem görüp görmediği bilgisinin makalede yer almadığının not edilmesi önemlidir. FBS, içerdiği antijenik birçok bileşeni yanı sıra protein peptid yapısındaki muhtelif büyüme faktörlerini içermekte, bu haliyle immün hücrelerin kültüründe inaktivasyonun yapılmadan kullanılması halinde monosit hücrelerinin şiddetli aktivasyonuna neden olacağı, makalede periferik kan monositlerinin uyarılmaları sonrası CD14 hücre yüzey antijeni ekspresyonunu oldukça güçlü ve homojen şekilde ifade ettikleri bildirilmekte, bu yönüyle immün hücrelerin kültüre edildikleri ortamı bu yönde değiştirerek kanser hücrelerinin kültürünü mümkün kılacak besi ortamı özelliğini belli oranlarda kaybetmesine yol açabileceğini akılda tutmak gerekliliği ifade edilebilir. Diğer husus monosit hücrelerinin uyarımını sağlamak için kullanılan PHA-M ile uyarılan hücrelerin ürettikleri sitokin miktarları ve profilleri çalışmada paylaşılmamış olmasıdır. Güncel literatürde aynı desene sahip bir çalışmanın verileri incelendiğinde aynı dozda PHA-M ile uyarılan periferik kan monositlerinin (PBMC) sitokin profilleri 10 µg/ml LPS (bu tez çalışmasında M0 nonpolarize makrofajların 10 ng/ml LPS+20 ng/ml IFN-γ ile gerçekleştirilen M1 polarizasyonu için kullanılan dozun 1000 katı) ile uyarılan PMBC'lerle karşılaştırıldığında PHA-M uyarılan PMBC'lerde TNF-α >2000 pg/ml, IL-6 ~5000 pg/ml iken LPS ile uyarılan hücrelerde TNF-α >100 pg/ml, IL-6 >6000 pg/ml olarak paylaşılmıştır. Literatürde TNF-α'ya bağlı sitotoksitesite ile tümör biyoloji üzerine olan etkilerde androjen bağımlı gelişim gösteren prostat tümör hücreleri ile androjenden bağımsız gelişim gösteren hücreler arasındaki farklılıklar, Thalmann ve ark. ile Wu ve ark.'larının geliştirdikleri LNCaP'ten türetilen (kökeninde, subline) androjen reseptör pozitif, PSA sekrete eden (AR sinyalizasyonu intakt) ve androjenden bağımsız büyüme özelliğine sahip C4, C4-2,

C4-2B hücre hatları [atimik nude erkek farelere insan osteosarkomundan derive edilen fibroblast hücre hattı ile 29. pasaj LNCaP hücrelerinin (CRL-1740™) koinokülasyonu (subkutanöz ksenograft) ve devamında 8 hafta kastrasyon uygulanan farelerden elde edilen C4 (CRL-3313™) hücre hattının ek 4 haftalık kastrasyon uygulaması sonrasında kemik metastazından derive edilen, geliştirdikleri C4-2 hücre hattı (CRL-3314™; LNCaP subline) ve C4-2 hattı kullanılarak aynı protokolün tekrarlanmasıyla elde edilen, (kastrasyon yapılmış atimik nude erkek farelere ortotopik inokülasyon ve ek 12 haftalık tümör gelişimi sonrasında kemik metastazından oluşturulan) C4-2B hücre hattı (CRL-3315™)] kullanılarak gösterilmiştir (Thalmann ve ark., 1994; Thalmann ve ark., 2000; Wang ve ark., 2009; Wu ve ark., 1994). Bu çalışmada 24 saat süresince 20 pg/ml dozunda TNF- α ile muamele edilen LNCaP ve C4-2 hücrelerinde hücre canlılık düzeyleri, AR ve PSA protein miktarları ile sitokin uyarısına selüler NF- κ B sinyal yolağı yanıtları I κ B fosforilasyon düzeylerini protein düzeyinde ve transkripsiyon aktivitesini lüsiferaz raportör gen deneyiyle belirleyen araştırmacılar, TNF- α 'ya karşı verilen doz bağımlı hücre yanıtlarında NF- κ B-luc aktivitesinin belirleyici olduğunu, 100 pg/ml TNF- α dozunun 24 saat uygulamasının tümör hücrelerinde anlamlı bir etkiye neden olmazken, 50 ng/ml dozunun 96 saat uygulandığı LNCaP hücrelerinde hücre canlılıklarının AR sinyal yolağındaki baskılanmayla uyumlu %50 düşüş gösterdiği, AR bağımlı büyüme göstermeyen C4-2 ve C4-2B hücrelerinde ise grup içi kontrollere göre sırasıyla hücre canlılıklarında <%20 ve <%10 azalmaya neden olurken, 24 saat süresince 0,1 (AR sinyal yolağını pozitif yönde düzenlemekte) 1, 10, 20 ve 50 ng/ml dozlarında AR sinyal yolağı üzerine belirgin bir etkinin gözlemlenmediği bildirilmektedir. Araştırmacılar 24 saat 10 ng/ml TNF- α uyarısının NF- κ B sinyal yolağı üzerine olan etkileri belirlemeyi amaçladıkları lüsiferaz raportör gen deneyinde, LNCaP hücrelerinde NF- κ B aktivite düzeylerinin C4-2 ve C4-2B hücrelerine göre (benzer seviyede) 2 kat kadar daha yüksek olduğu gösterilmiştir. LNCaP hücrelerine tek başına etkisi olmayan nötralizan anti TNF- α antikorunun sitokin uygulamasıyla eş zamanlı verilmesi durumunda NF- κ B transkripsiyon aktivitesinin ve aracılık ettiği hücre canlılıkları ile AR sinyal yolağı üzerindeki baskılayıcı yöndeki TNF- α etkisinin büyük oranda sönümlendiği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada TNF- α 'nın prostat tümör hücreleri üzerine olan etkisinin TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1) yerine TRADD proteini (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein) üzerinden gerçekleştiği, TRADD geninin siRNA aracılı olarak susturulması ile TNF- α 'nın etkilerine aracılık eden NF- κ B aktivitesini indüklenme gücünün AR sinyal yolağı üzerine süpresif etkisinin sönümlendirildiği C4-2 hücrelerinde ise artışın

karşılık, LNCaP hücrelerinde. Literatürde LNCaP hücreleri ile yürütülen farklı çalışmalarda 100 ng/ml dozunda 72 saat uygulama ile LNCaP hücre canlılıklarını %50 oranında azalttığı gösterilmiştir (Gonen-Korkmaz ve ark., 2014; Wang ve ark., 2009). LNCaP ve PC-3 PK hücrelerinde 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (10-100 ng/ml) yalın TNF- α stimülasyonunun MAPK kinaz ve apoptotik hücre ölüm sinyal yolakları üzerine olan etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, TNF- α 'nın LNCaP hücrelerinde doz bağımlı olarak hücre ölümünü uyardığı, MAPK inhibitörü ile birlikte TNF- α 'nın ise LNCaP hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü p38 (stress-activated protein kinase) inhibisyonuna bağılı olarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığını gösteren araştırmacılar, hormon bağımlı PK'de p38 inhibisyonunun terapötik hedef olarak kullanılabileceğini önermektedir (Ricote ve ark., 2006). Araştırmacılar 72 saatlik 50-75 n/ml dozlarındaki TNF- α uygulaması sonrasında LNCaP hücrelerinde G1 fazındaki hücre sayısındaki artışa G2 fazındaki hücre miktarındaki azalmanın eşlik ettiğini, bu değişimin apoptotik aktivite ile ilişkili olduğunu bildirmektedirler. Nihai olarak günümüz literatüründe TRADD (tumor necrosis factor receptor-associated death domain) ilişkili nekroptoz ve TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ilişkili sitotoksiste bilinmekte, yüksek doz ve 72 h uygulama ile LNCaP hücrelerinde oluşturulan modeldeki verilerin bizim çalışmamızda elde edilen verilerle karşılaştırılması yukarıda ifade edilmeye çalışılan hususlar dolayısıyla uygun olmadığını düşünülmesine karşın literatürde enflamasyon ve AR sinyal yolağı ilişkisinin araştırıldığı ilk mekanistik çalışma olması dolayısıyla detayları ile tartışıldı.

Prostat kanseri (PK) tümör mikroçevresinde yer alan tümör ilişkili makrofajların (TAMs) tümör hücre enflamatuar yanıtlarını ne şekilde etkilediği, lokal etkinin prostat karsinogenezindeki rolünün LNCaP hücreleri kullanılarak araştırıldığı bir başka çalışmada, THP1 monosit hücreleri LPS ile uyarılarak aktive edilmeleri sonrasında tez çalışmasında uygulandığı gibi makrofaj hücre kültür ortamı toplanarak koşullu besiyeri elde edilmiş, elde edilen KB ile muamele edilen LNCaP hücrelerinin stokin profilleri ile pro-enflamatuar hücre sinyal yolaklarındaki değişim gösterilmiştir. Enflamatuar sinyal yolaklarının orkestrasyonunda rol oynayan ve karsinogenez dahil birçok hücre sinyal yolağı ile bağlantı halindeki NF- κ B transkripsiyon faktörünün aktive olduğu, bu aktivasyonla birlikte LNCaP hücrelerinde pro-enflamatuar hücre yanıtlarının stimüle olmasıyla hücrelerin TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinin üretimi tetiklendiği gösterilerek literatürde ilk kez bu çalışmada tümör ilişkili makrofajların prostat kanser hücreleri enflamatuar sinyal yolaklarını uyardığı ve tümör mikroçevresinde karsinogenezi

destekleyici yönde önemli bir faktör olarak TAMs'ların tümör hücresi üzerine olan etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi modeli ortaya konmuştur (Wong ve ark., 2009). Bu çalışmada ayrıca LNCaP hücrelerinin VCAM1 ve ER α (nuclear estrogen receptor α) protein ifadelerinin kontrol gruplarındaki hücrelere (naif LNCaP, bizzat LPS ile muamele edilmiş olan LNCaP hücreleri ve LPS ile uyarılmamış naif THP-1 hücre kültür ortamı ile muamele edilen LNCaP hücreleri) göre belirgin şekilde artmış olduğu, bu proteinlerin LNCaP hücrelerindeki artışın, sırasıyla tümör hücre migrasyon & metastaz kabiliyeti ve tümör progresyonundaki artışla ilişkili olduğu, M1 polarize TAMs kaynaklı enflamasyon uyarısının prostat kanser hücrelerinde karsinogenezi destekleyici nitelikte hücre yanıtlarını arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, araştırmacıların bu çalışmada kullanmayı tercih ettikleri THP-1 monosit hücre hattı ve makrofaj hücre farklılaşmasını daha önce kendilerinin geliştirdikleri optimize model esas alınarak [48 saatlik 5ng/ml düşük doz PMA (8 nM) uygulamasıyla M0 nonpolarize makrofaj uyarımı] gerçekleştirilmiş olduğu bilgisini vurgulamak yerinde olacaktır (Park ve ark., 2007). Makrofaj hücre uyarımı ve farklılaşma süreçlerinde uygulanan protokoller son derece heterojen olup, kullanılan kimyasal ajanın doz, süre ve kültür ortamındaki birçok değişkenle (hipoksi, kültür ortamı pH'sı immün hücre farklılaşma ve polarizasyonlarını büyük oranda etkilemektedir) birlikte azımsanmayacak ölçülerde farklılıklar içerdiği göz önünde bulundurulmalıdır (Palma ve ark., 2018). Literatürde var olan bu heterojenitenin nedensellik tarafı büyük oranda monosit ve makrofaj hücrelerinin sahip oldukları plastisite ve divertisite özelliklerinin ve ayrıca araştırmacının bu hücreleri kullanımındaki (çalışmadaki primer araştırma hedefleri ve ilişkili deney basamağına ve ilgili deneye ilişkin nihai plana uygun olarak hücre polarizasyon ve farklılaşma protokollerindeki farklılıklar) temel amaca bağlı olduğu söylenebilir. Dokudaki temel antijen sunucu hücreler olan dentritik hücrelerin naif CD4⁺ T helper hücrelerle CD80/CD86-CD28; MHC-II-TCR reseptörleri aracılığıyla tutunması ve salgıladıkları IL-12 sitokini aracılığıyla CD4⁺ naif hücrelerin Th1 hücre farklılaşmasını uyarmaktadırlar. Sitokin aracılı immün yanıtta rol oynayan Th1 (T helper1) hücreleri ise sekrete ettikleri IFN- γ sitokini ile farklı polarize makrofaj hücre farklılaşmasında rol oynamaktadır. Bu şekilde LPS ve Th1 sitokinler (IFN- γ ve TNF- α) ile uyarılan makrofaj hücrelerinin TLR2, TLR4, CD80, CD86, iNOS (NOSII, inducible nitric oxide synthase) ve MHC-II ile karakterize edildikleri, bu yönleriyle antijen sunucu hücre fonksiyonu ile kendilerinin farklılaşmasını uyararan Th1 hücrelerinin CD4⁺ naif hücrelerden farklılaşma süreçlerini indükleyebilmektedirler. Dahası bu şekilde farklılaştırılan M1 polarize makrofajlar TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CXCL9 (kemokin lidand 9) ve CXCL10

(kemokin ligand 10) sitokin ve kemokinlerini sekrete ederek M0 makrofajların da M1 yönünde polarizasyonunu uyarak pozitif feedback loopu oluşturmakta olduğu bilinmektedir. M1 polarize makrofajların kendilerini karakterize eden genlerin ekspresyonlarını uyarmalarında anahtar konumdaki sinyal yollarının NF- κ B, STAT1, STAT5, IRF3 (interferon regulatory factor 3) ve IRF5 (interferon regulatory factor 3) olduğu ifade edilmektedir (Yao ve ark., 2019). Detayları aktarılmaya çalışılan monosit-makrofaj ve farklı polarize makrofaj farklılaşma süreçlerinin oluşturmak istenilen deney modeli ve planlanan asıl deneyde elde edilmek istenen hedeflere uygun şekilde düzenlenmesi, M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamasyon modelinde ortaya çıkan verilerin bilimsel değerini tayin edecek önemde olduğunu ifade etmek yerinde olacaktır. Th1 sitokinlerinin kullanımı ile M1 polarize makrofaj hücre farklılaşmasının indüksiyonu protokolü, elde edilen makrofajların NF- κ B, STAT1 sinyal yollarının ağırlıklı olduğu metabolik işlev sergilemeleri ile mikrobisidal ve tümörosidal fonksiyonları icra etmekte olduklarını sağlamaktadır (Martinez ve Gordon, 2014; Murray, 2017; Porta ve ark., 2015; Weissner ve ark., 2013). Sonuç olarak yukarıda verileri ve çalışma metodolojisine ilişkin detayları aktarılan çalışmadaki sonuçlara benzer bulgular bu tez çalışmasıyla elde edildi. M1 polarize makrofajların tümör immünolojisi perspektifinde enflamatuvar ve oksidatif stres bileşenlerinden kaynaklanan çevresel stresin tümör hücre biyolojisinde entegre stres yanıtlarını uyarmasını temel alan bu tez çalışmasında, U937 hücre hattının kullanımı ile U937 monosit hücreleri literatürde kabul gördüğü şekliyle 48 saatlik yüksek doz (160 nM) PMA uyarısı ile nonpolarize M0 makrofaj ve devamında 24 saatlik hücrelerin normal kültür ortamında yetiştirilerek dinlendirilmesi ve devamında ortamdaki PMA kimyasalının hücrelerin 2 kez PBS ile yıkanarak uzaklaştırılması sağlandı. Taze hazırlanan besiyeri ile steril T75 flask içerisine ekimlerinin 2 saat sonrasında Th1 sitokinleri (LPS+IFN- γ) kullanılarak M1 polarize makrofaj uyarımı gerçekleştirildi. M1 polarizasyonu gerçekleştirilen hücrelerin ışık mikroskobu altında morfolojik incelemelerinin bitimiyle, makrofaj polarizasyon aşamalarında kullanılan kimyasalların (LPS, IFN- γ ve FBS) LNCaP hücre kültür ortamına taşınmasının önüne geçilebilmesi adına M1 polarize hücreler M0 polarizasyon süreçlerindeki adımın benzeri şekilde farklılaştırılma deneylerinin gerçekleştirildiği T75 flaskların içerisinden toplandı, PBS ile yıkandıktan sonra taze hazırlanan besi ortamıyla yeni bir flaska içerisinde 24 saat süresince kültüre edildi. Farklı inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilen denemelerimizde, süre uzadıkça uyarılmış ER stresi ve KPY yoğunlaşan etkisiyle M1 polarize makrofajların protein translasyon süreçlerinin baskılandığı, ortamdaki aktif biyomolekül

konsantrasyonlarının analiziyle ortaya kondu. Ayrıca literatürde M1 polarize makrofajların ER stres ve UPR aktivasyonu ile birlikte pro-enflamatuar sitokin üretim süreçlerinin baskılandığı daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada da bildirilmektedir (Shen ve ark., 2021). Bu nedenle, KB içeriğinin çalışma amaçlarına ulaşılmasında yetersiz kalmaması adına 24 saatlik inkübasyon süresi ile sınırlı tutularak toplanan kültür ortamı hücresel içerikten arındırıldı ve kolorimetrik biyokimyasal analizler ile NO_x ve H₂O₂ düzeyleri kantite edildi. Pro-enflamatuar/anti-enflamatuar sitokinlerin kantitasyonu gerçekleştirilerek makrofaj hücrelerinin yönlendirildikleri M1 polarizasyona uygun profilde metabolik aktivite sergiledikleri teyit edildikten sonra elde edilen KB ile *in vitro* enflamatuar modeli temsil eden LNCaP hücre gruplarına bütün kültür ortamı KB ile oluşturulacak şekilde tatbik edildi. Bu deney tasarımı, oluşturulan M1 polarize makrofaj kaynaklı enflamatuar stres, LNCaP hücrelerinde, öncesinde düzeyleri ölçülmüş ROT'lardan kaynaklanan oksidatif stresle birlikte pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar özellikteki sitokinlerin aracılık ettiği selüler stres yanıtlarının aktive olduğu, ER stres uyarımı ile KPY aktivasyonu ile ilişkili PERK (EIF2AK3), XBPs ile birlikte c-myc onkogenin upregüle olduğu gösterildi. Entegre sinyal yollarının aktive olması ve eIF2 α , Nrf2'nin tümör biyolojisi üzerine olan etkileri ile enflamatuar uyarıyla (Akt, NF- κ B, Jak/STAT3) aktive olan sinyal yollarının aracılık ettiği protümöral değişimlerin PK'de antitümöral etkinliği kanıtlanmış yeni nesil antiandrojen ilaç olan apalutamid yanıtlarına etkisi incelendiğinde, 24 saat 50 μ M dozunda uygulanmasının M1 polarize TAMs kaynaklı enflamatuar tümör mikroçevresinin modellendiği LNCaP hücre gruplarında sitotoksik ve antiproliferatif etkinliğini kaybettiği, bu yönüyle enflamatuar stres uygulanan LNCaP hücrelerinin aktifleşen entegre selüler stres yanıtları (ISR, integrated stress response) ile tümör biyolojisinde meydana gelen adaptif değişimlerle yeni nesil antiandrojen ilaçlara karşı direnç geliştirdikleri gösterildi. Literatürde LNCaP hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda AR sinyal aktivitesi ile c-myc arasında ters yönde ilişkiyi gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Birinci nesil antiandrojen ilaç olan bikalimidin c-myc ifadesini azalttığı, diğer taraftan yüksek c-myc ifade eden LNCaP/c-myc hücrelerinin androjen bağımsız büyüme özelliği kazandığı gösterilmiştir (Bai ve ark., 2019; Barfeld ve ark., 2017; Bernard ve ark., 2003). Ayrıca literatürde normal prostat epitelinde AR sinyalizasyonunun hücrelerin terminal farklılaşması üzerine olumlu etkileriyle c-myc aracılı onkojenik aktiviteyi baskıladığı, ancak tümör hücrelerinde c-myc üzerine olan negatif düzenlemenin mevcut olmadığı bildirilmektedir (Vander Griend ve ark., 2014). LNCaP hücrelerinde gerçekleştirilen M1 polarize TAMs kaynaklı enflamatuar çevresel

stresin tümör hücrelerinde ER stres ve KPY'yi uyarıcı etkisi ile tümör hücrelerini destekleyici nitelikte olan selüler adaptif yanıtlarda [PERK/eIF2 α , Nrf2, Gpx1, stresle indüklenen tümör hücre plastisitesi -snail ve twist-1) ve karsinogenezde azalmaya yol açtığı, bu yönüyle sitotoksik antitümöral etkinliğini bütünüyle yitirmesine karşın (hücre canlılıklarında anlamlı azalmayı sağlayamamakta), sitostatik antitümöral etkinliği sürdürdüğü, tümör progresyonunu önlediği gösterildi. Normal fizyolojik koşullarda sitoplazmada Nrf2/Keap1 kompleksiyle stabil halde tutulan transkripsiyon faktörü olan Nrf2, PERK bağımlı selüler sağkalımda aktive olan PERK için hem substrat hem de efektör molekülü görevi üstlenmekte, PERK aşağı akış düzenleyicileriyle Keap1'den ayrılarak genomik etkinliğini göstereceği nükleusa transloke olmaktadır. Memeli hücrelerinde gerçekleştirilen birçok çalışma Nrf2'nin, PERK/eIF2 α yolağı ile birlikte hücre kurtuluşunu sağlayan entegre stres yanıtlarının temel komponenti olduğunu göstermektedir (Bi ve ark., 2005; Cullinan ve ark., 2003; Robichaud ve Sonenberg, 2017; Tascioglu Aliyev ve ark., 2021; Walter ve Ron, 2011). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, stres koşullarında aktive olan bu yolakların tümörögenезin desteklenmesinde rol aldığını işaret etmektedir. KDPK gelişimi sonrasında dahi AR sinyal yolağını hedefleyen terapötiklerin PK tedavisindeki konumunu *in vitro* olarak destekleyen nitelik taşımaktadır (Elsesy ve ark., 2020; Jewer ve ark., 2020; Kaufhold ve Bonavida, 2014). Bu durum ayrıca, klinik uygulamalarda KDPK olgularında abirateron asetat+prednizolon ile birlikte antiandrojen ilaçların kombinasyon tedavi rejiminde ilk aşamada kendilerine yer bulmalarıyla anamlandırılabilir.

Makrofaj hücrelerinden kaynaklanan enflamatuvar stresin prostat kanser hücrelerinde androjen sinyal yolağı üzerine olan etkisinin bu tez çalışmasıyla benzer şekilde koşullu besiyeri ile *in vitro* enflamatuvar tümör mikroçevresi modelinde araştırıldığı bir çalışmada, 24 saat süresince 500 pg/ml konsantrasyonunda TNF- α içeren KB ile (tez çalışmasında kullanılan enflamatuvar modele göre ~5 kat daha yoğun enflamatuvar sitokin içermekte) muamele edilen LNCaP hücreleri canlılık düzeylerinde artışa karşılık, AR sinyal yolağı aktivitesinde belirgin azalma (AR ubiquitinasyonu ve proteozomal degradasyonunda artışla ilişkili) bildirilmektedir (Debelec-Butuner ve ark., 2014). PSA, KLK4, NKX3.1 gen ifadelerinde kontrole göre 10 kata ulaşan azalma ile WB analizinde qRT-PCR ile uyumlu AR ve NKX3.1 protein düzeylerinde azalma gösterilmiştir.

PC-3 hücre hattında proenflamatuvar (Th1)/anti-enflamatuvar (Th2) sitokin oranlarındaki değişimin tümör hücrelerinde proliferasyon ve hücre canlılıkları üzerine olan etkilerinin BALB/cByJNarl dişi farelerinin primer peritoneal makrofaj hücreleri ve splenositlerinin

kültürüyle elde edilen koşullu besiyeri kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, sitokin immünoterapisinin KDPK'de bir alternatif sunup sunmadığı, PC-3 hücreleri üzerinde antikanser etkinlik gösteren paklitakselin pozitif kontrol olarak belirlenmiş, tümör immünolojisinin temel kabullerinin dışında 24 saat süresince Th1 sitokinlerini (IL-2 10-50 pg/ml) artan oranlarını içeren immün hücre kültür ortamının PC-3 hücre canlılıklarını arttırırken, Th2 sitokinlerinin artan oranlarının (IL-10 100-500 pg/ml) tümör hücreleri canlılıklarını azaltıcı yönde etkinlik gösterdiği bildirilmektedir (Lin ve Lin, 2016). Hücre kültürü 48 saate uzatıldığı ve immün hücre farklılaşma süreçlerinde uyarıcı ve/veya antitümöral fonksiyonlar gösteren 5 farklı polisakkaritle kombine edilerek uygulandığında, Th1 sitokinlerinin daha yüksek olduğu gruplarda hücre canlılıkları görece stabil bir seyir gösterirken ($r=0,062$; $p=0,550$), Th2 sitokinlerinin daha yüksek düzeylerini içeren hücre gruplarında canlılık oranları istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma eğilimi ($r=0,114$; $p=0,270$) sergilediği gösterilmiştir. Araştırmacılar daha sonra, primer makrofaj hücre kültüründe elde ettikleri koşullu besiyerini liyofilize hale getirdikten sonra IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-10 sitokinlerini belirli konsantrasyonlarını içeren kültür ortamında PC-3 deney gruplarında hücre canlılıkları açısından değişkenlik oluşturup oluşturmadığı test edilmiş, makrofaj kaynaklı enflamatuvar çevresel stresin anti-enflamatuvar profildeki sitokin düzeylerinin artan, pro-enflamatuvar profildeki sitokin düzeylerinin ise azalan konsantrasyonlarının 24 süresince maruz kalan PC-3 hücrelerinde canlılıkları azaltırken, 48 saatte bu etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın dışında servigiller familyasından batı mazısı ağacından elde edilen polisakkarit içeren özüt ile immün hücre farklılaşma süreçlerinin değiştirilmesi, farklı çalışmalarla kanser progresyonunda rol oynadığı gösterilen proenflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) bizzat tümör hücrelerince üretimi ile tümör mikroçevresindeki immün hücreler tarafından üretimini azaltarak antitümöral etkinlik elde edildiği, tümör migrasyonu ve invazyon süreçlerinin baskılandığı gösterilmiştir (Budhu ve Wang, 2006; Chuang ve ark., 2008; Sunila ve ark., 2011)

Protümöral fonksiyonlar üstlenen, KDPK gelişiminde rol oynadığı bilinen TAMs'ların dosetaksel ilaç yanıtları üzerine etkisinin AR sinyalizasyonu aktif olmayan KDPK model hücre hattı olan DU-145 hücrelerinin bir ksenograft modelinde kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, dosetaksel tedavisinin TAMs aktivitesinin inhibisyonu ile arttırılabileceği gösterilmiştir (Guan ve ark., 2019). TAMs aktivasyonunda anahtar konumdaki M-CSF-1 (CSF-1, macrophage colony stimulating factor) reseptör inhibitörü ilaç uygulaması ile tümör hücrelerinin antikanser tedavi uygulamasına verdikleri selüler yanıtlar sırasında

sekrete edilen sitokin ve kemokinler aracılığıyla tümör mikroçevresini protümöral yönde etkiledikleri, tümör bölgesine makrofaj migrasyonunu etkiledikleri, makrofaj polarizasyonları ve karakterlerini modüle edebildikleri, bu etkilerin CSF-1R inhibitörü ilaç uygulaması ile tümörün immün sistem hücreleri üzerine olan protümöral etkilerinin baskılanması ve dosetaksel terapötik yanıtlarında artışın sağlanabildiği gösterilmiştir (Guan ve ark., 2019; Guan ve ark., 2021).

Radikal prostatektomi ile tedavi edilen 124 PK hastasının doku örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, araştırmaya dahil edilen hastaların bir bölümüne (n=60) operasyon öncesi neoadjuvan kemoterapi (NAKT) uygulanmış. NAKT uygulanan hastalarda lenfanjiojenezin uyarıldığı, tümör agresifliği ve metastazla ilişkili olduğu bilinen ve anjiojenez (VEGF-A) ve lenfanjiojenez (VEGF-C&D) süreçlerinde de görev alan VEGF'lerin protein düzeyinde artmış olduğu yapılan analizlerle ortaya konmuş ve ayrıca bu artışın hastalardan alınan doku örneklerinin patolojik incelemesinde saptanan lenf damarı yoğunluğu ve alanıyla uyumlu olduğu bildirilmektedir. Araştırmacılar ayrıca NAKT alan hastalarda biyokimyasal rekürrens riskinin artmış olduğunu bildirmektedirler (Asai ve ark., 2017). Aynı çalışmanın *in vitro* olarak planlanmış kısmında %10 FBS ortamında kültüre edilen LNCaP hücreleri 3 saat süresince CS-FBS ile kültüre edilerek androjen deprivasyonu uygulaması (AR sinyali bloke gerçekleştirilmeden 3 saat süresince hormon deprivasyonu uygulanmış) gerçekleştirilmiş, bu uygulama neticesinde tümör hücrelerinde VEGF-A ve VEGF-B protein ifadelerinde azalma olduğu buna karşın lenfanjiojenez ile ilişkili VEGF-C ve VEGF-D protein ifadelerinde artış olduğu gösterilmiştir.

LNCaP hücrelerinde 10 μ M 2 saat H₂O₂ uygulaması ile oluşturulan oksidatif çevresel stres modelinde tümör hücre biyolojisindeki değişimlerin ve bu değişimlerin n-asetil sistein (NAC) ile nötralize edilip edilemeyeceğinin araştırıldığı bir çalışmada stresle indüklenen bir transkripsiyon faktörü olan ve EMT'de snail-1 ve TGF- β ile birlikte anahtar rolde bulunan twist-1'in ve AR sinyal yolunun indüklendiği gösterilmiştir (Shiota ve ark., 2010). 2 saatlik 10 μ M H₂O₂ uygulaması ile oluşturulan oksidatif stres uyarısının 24-48. saatler arasında en güçlü twist-1 yanıtı elde edildiği, androjen reseptör proteininde yukarı yöndeki artışın uygulamadan sonraki 72. saate kadar uzadığını gözlemlemenin sürpriz olduğunu bildirmektedirler. AR proteininin H₂O₂ uygulaması sonrasında oksidatif stres artışıyla ilişkili olup olmadığını araştırmak ve elde edilen veriyi doğrulayabilmek adına 5 mM NAC ile oksidatif stresi nötralize eden araştırmacılar 48 saat sonunda twist-1, AR ve akım sitometride DCFDA floresans probuyla ROS düzeylerini belirlemişler. Elde ettikleri

sonuçlar 24 ve 48. saat olarak NAC'ın H₂O₂'in meydana getirdiği etkileri nötralize ettiğiniz, twist-1 ve AR düzeyleri bazal seviyelerde belli çerçevede stabil seyrettiğini göstermişlerdir. Devamında araştırıcılar tümör biyolojisindeki değişimlerde twist-1'in mi AR'nin uyarılmasının oluşturduğu yanıtlardan mı kaynaklandığını araştırmak için planladıkları deneyde twist-1 siRNA ile LNCaP hücre transfeksiyonu gerçekleştirerek twist-1'in susturulması ile AR proteindeki artışın tamamen ortadan kalktığını göstermişlerdir. Bir sonraki aşamada araştırıcılar AR E-box promoter gen bölgesinin twist-1 tarafından uyarıldığını, twist-1'in AR gen ifade ve böylelikle AR protein düzeylerini yukarı yönde düzenlediğini göstermişlerdir. Twist-1'in siRNA aracılı susturulduğunda AR gen ve protein düzeylerinde azalma, LNCaP hücre büyümesinde yavaşlama ve selüler apoptozisde artışı bildirmişlerdir. Twist-1 geninin susturulmasının LNCaP hücrelerde kaspaz aracılı apoptozu uyardığını ve kesilmiş PARP-1 düzeylerinde artışı rapor etmişlerdir. Diğer taraftan AR geni susturulduğunda twist-1'dekine benzer etkiler gözlemlenmediği bildirilmiştir.

DNA spercoillerin aılması vd. birtakım esansiyel fonksiyonları ile özellikle mitozda anahtar roldeki bir enzim olan Topoizomerez II'yi inhibe eden antikanser ilaçlardan mitoksantron (DNA tek ve çift zincirinde ayrılmalara neden olmakta) aracılığıyla

Enflamatuar stres (enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan) vd. ekstrensek veya intrinsek stres kaynaklarına karşı selüler stres yanıtlarının uyarılması, hücre hasarının başlangıç aşamasından itibaren hücrenin sağkalımını sağlamak yönünde evrimleşmiş, karşılıklı etkileşim halindeki entegre selüler sinyal yolakları tümör hücrelerinin birçok açıdan zorlayıcı mikroçevre şartlarına adaptasyonunda esansiyeldir (Sharma ve ark., 2016; Thakor ve Holcik, 2012). Çalışmada, entegre sinyal yolaklarının merkezinde yer alan ve orkestrasyonu süreçlerinde Nr2 ile ortak olarak hareket eden eIF2 α (PERK/EIF2AK) gen ifadelerindeki uyarılma çalışmada elde edilen protümöral hücre yanıtları ile uyumluluk sergilemekte, her iki sinyal yolağının tümör hücre sağkalımını olumlu yönde etkilediği bilinen protein translasyonunda baskılanma ile selüler protein ifadesinde azalma, oksidatif stresin azaltılmasına dönük antioksidan savunma mekanizmalarında yukarı yönde düzenleme ile SOD, GSH-Px, katalaz enzim aktivitesinde artma bulunurken, antioksidan etkinlikteki artışa karşılık oksidan stres düzeylerinde azalma MDA, NOx, H₂O₂ hücre sağkalımını mümkün kılacak selüler adaptasyonların gelişimini sağlamıştır. Güncel literatürde meme kanserinde tümör hücre canlılığının korunması ve tümör progresyonu için yaşamsal konumdaki eIF2 α orkestrasyonundaki entegre sinyal yolaklarının tümör hücrenin köklülük yanıtları ve diğer ağır stres koşullarıyla başetmeyi mümkün kılan EMT artışı gibi

adaptif selüler yanıtların gelişiminde rolü olduğu bildirilmektedir (Jewer ve ark., 2020).

FBS'nin hormondan arındırılmasında dekstran 70 ile kaplanmış aktif kömürün kullanımı östradiol ve testosteron hormonlarını ortamdan uzaklaştırmadaki etkinliği tek başına aktif kömürle yapılan işlemde daha iyidir. Bu yönleriyle seks steroidleri ile düzenlenen kanser hücreleri (meme ve prostat kanserleri) ile gerçekleştirilen çalışmalarda CS-FBS kullanımının doğru sonuçların elde edilmesinde önemlidir. Bunun yanında fenol red içermeyen RPMI besiyeri kullanımı seks steroid reseptörleri sinyal yollarına etkiden kaçınmak adına sinyalizasyon mekanizmasını içeren araştırmalar için önem taşıyan bir diğer husustur (Wesierska-Gadek ve ark., 2007). Kan PSA seviyelerinin 2 kata çıkma süresi 10 ay ve daha az olan nonmetastatik KDPK olgularının dahil edildiği çift kör plasebo kontrollü faz 3 çalışmasında apalutamidin ADT tedavisine devam edilen kontrol grubuna göre semptomatik hastalık progresyonunu geciktirmekte, metastazsız sağkalım süresini belirgin şekilde arttırdığı (40,5 ay – 16,2 ay) gösterilmiştir (Smith ve ark., 2018).

LNCaP hücrelerinde koşullu besiyeri ile oluşturulan akut ve kronik enflamasyon modeliyle stresin tümör hücresinde oluşturduğu etkilerin [androjen reseptörü, NKX3.1 transkripsiyon faktörü (TF) ve p53 proteinlerinde azalma] enflamatuvar stresin reaktif oksijen türleri ve sitokin komponentlerinin ortak rol aldıkları ve bütüncül etkileri neticesinde gerçekleştiğinin gösterildiği çalışmada, n-asetil sistein (NAC, n-acetyl cystein) uygulaması ile oksidatif stresin nötralize edildiği hücrelerde AR ve p53 proteini düzeylerindeki azalma belli oranlarda geri döndürülebilirken AR sinyalizasyonu ile düzenlenen prostat spesifik bir TF olan NKX3.1 düzeylerinin antioksidan uygulamadan etkilenmediği gösterilmiştir (Debelec-Butuner ve ark., 2015). Sitokinlerin yer almadığı oksidatif stres etkisini araştırmak için H₂O₂ uygulaması gerçekleştirildiğinde hücrelerin NAC ile tamamen restorasyon sürecine girdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada kronik enflamatuvar uyarının tümör hücrelerinde oksidatif DNA hasarı ve genetik heterojeniteye yol açtığı ve oksidatif stres yanıtlarında düzenleyici mekanizmaların bozulduğu [pro-oksidan QSCN6 (sülfhidril oksidaz) geni ile antioksidan Gpx2 (glutatyon peroksidaz-2) gen ifadelerinde artışa neden olurken, antioksidan Gpx3 gen ifade düzeylerini azaltmaktadır] gösterilmiş olup, enflamatuvar uyarının prostat kanseri progresyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarının duyarlı bir göstergesi olan H2A.X p(S139) (Phospho-Histone H2A.X (Ser139) protein düzeylerinde artışa karşın DNA çift zincir kırığı (DSBs, double-strand breaks) hasarı tamir yanıtını oluşturan ve bir serin/treonin protein kinaz olan ATM'nin (ataxia telangiectasia mutated) düzeylerinin enflamatuvar stresle birlikte

değişmediğini göstermişlerdir.

Prostat kanserinde antiandrojen ilaç yanıtlarının androjen reseptör sinyalizasyonu ile bağlantılı PCA3 (Prostate cancer antigen 3) geninin siRNA aracılı susturulmasıyla ne şekilde değiştiğinin LNCaP, LNCaP-AR⁺ (AR aşırı eksprese eden LNCaP hücresi), VCaP (AR ekspresyonu normal olan ancak androjen bağımlı büyüme göstermeyen vertebral metastazdan elde edilmiş PK hücre hattı) hücrelerinde araştırıldığı bir çalışmada elde edilen bulgular AR sinyalizasyonunu ilişkili genin susturulması ile interfere edilmesinin ikinci nesil antiandrojen ilaç etkinliğinin artırılması ve ilaç direnci gelişimine karşı yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi yönünde umut verici bulgular sunmaktadır (Ozgur ve ark., 2017).

Dosetaksel öncesinde androjen deprivasyonu uygulanan LNCaP hücrelerinde, R1881 uyarısı sonrası 10. dakika itibarıyla büyük çoğunluğu sitoplazmada lokalize AR proteininin önemli bir kısmı nükleusa transloke olurken, diğer kısmının mikrotübüller boyunca ve KIF5B (kinesin family member 5B) motor proteini aktivitesiyle taşındığı membran lokasyonunda kaveolin başta olmak üzere lipid raftlarıyla etkileşime girdiği, nongenomik AR sinyal aktivitesinin ligand uyarısı sonrası membrana translokasyonunun sorumlu olduğu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. AR'nin ligand ile uyarılmasına cevap olarak dakikalar içerisinde membran lipid raftları mikrodomaine lokalize olması ve AKT ile etkileşime girerek AKT sinyalizasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. AR, kendisinin membran reseptörleriyle etkileşimi için ihtiyaç duyduğu anterograd transportundan sorumlu olan KIF5B motor proteini ile N-terminal domaini ile etkileşime girmektedir. Membran lokasyonuna göç eden AR ile nükleer AR arasındaki iletişimin sorumlu olan Hsp27 PK'de terapötik olarak umut vadeden, yapılan çalışmalarla artan miktarının PK'de kötü prognozla ilişkisi gösterilen ısı şok proteinidir. Seks hormonu sinyal yolları ile korelasyon gösteren, hastalık progresyonunda rol oynadığı gösterilen en agresif beyin tümörlerinden olan glioblastoma multiforme tedavisi için terapötik aday molekül olarak Hsp27 inhibitörü bir ajanın önerildiği çalışmada, Hsp27 inhibisyonu ile sitoplazmada stabil durumda kalmasının önüne geçildiği, AR proteininin E3 ubiquitin ligaz ile kovalent bağlanması uyarılarak AR'nin ubiquitin proteazom sistemi aracılığıyla degradasyonunun indüklediği gösterilmiştir (Li ve ark., 2021). Hsp27 ifadelerindeki artış temel olarak selüler stres yanıtları tarafından upregüle edilmektedir (Dodge ve ark., 2006). TAMs'lar tarafından mikroçevre ortamına sekrete edilen Hsp27'nin meme kanserinde prognozun kötüleşmesi ile ilişkili olduğu, ayrıca Hsp27'nin sitokin sinyalizasyonu ve NF-κB sinyal yoluyla aktivitesinin artışında da rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

(Banerjee ve ark., 2011; Batulan ve ark., 2016).

Katlanmamış protein yanıtlarının (KPY) ve ER stres transmembran transduser sensör protein kollarından biri olan IRE1 α 'nın (inositol requiring-enzyme 1 alpha) uyarılması ve aktivasyonu sonrasında XBP1 (X-box-binding protein 1) mRNA'nın sitoplazmik ankonvansiyonel splicingini gerçekleştirerek intron bölgesinin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. IRE1 α , XBP1u $\rightarrow$ XBP1s dönüşümünü katalizleyerek KPY'nın aşağı yönde düzenleyicisi olan ve hedef gen ifadelerini düzenleyen XBPs aktivasyonunu gerçekleştirir (Sheng ve ark., 2019). Ayrıca, KPY'nın IRE1 α kolunun androjen reseptör sinyalizasyonu ile yakın ilişkide olduğu ve prostat kanserinde IRE1 α aktivitesiyle ilişkili KPY'nın yoğun şekilde olduğu gösterilmiştir (Sheng ve ark., 2015). Literatürde, çevresel stresin tümör hücresinde adaptif stres yanıt yollarını uyardığı, bu yönüyle hücrelerin daha dirençli formlara transforme oldukları gösterilmiştir. Adaptif selüler sinyal yollarının antiandrojen ilaç direncine neden olduğunun gösterildiği bir çalışmada LNCaP hücreleri çevresel stres maruziyetine adaptif fenotipik değişimler geliştirdikleri, bu adaptif değişimlerin non-genomik sinyal yollarının aktivitesine bağlı olabileceği, nihai etki olarak adaptif tümör yanıtlarının LNCaP hücrelerinde enzalutamid direncine yol açtığı gösterilmiştir (Ferrari ve ark., 2017). Bu çalışmada, adaptif selüler değişimler neticesinde LNCaP hücrelerinde proliferasyondan sorumlu temel sinyal yollarının AKT, p38, MAPK aktivasyonu ve PARP-1 aşırı ifadelenmesi olduğu bildirilmektedir.

En güçlü pro-anjiojenik faktörlerden olan VEGF-A gen düzeyleri tümör progresyonu, metastaz için de önemli bir prognostik göstergedir. Antienflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip bir bitki ekstraktının LNCaP hücrelerinde antitümöral etkinliğinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada, 48. saatteki hücre canlılıklarını kontrole göre %50 azaltan antitümöral ilaç etki dozunun, kesilmiş PARP protein miktarını %100 arttırdığı ve VEGF-A gen ifade düzeylerinde 10 kat kadar azalma sağlayarak istatistiksel olarak anlamlı antikanser etkinlik sergilediği bildirilmiştir (Koken ve ark., 2016). Benzer kimyasal yapıya sahip bitki ekstraktlarının antikanser etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda VEGF-A gen düzeylerindeki azalmanın NF-kB transkripsiyon aktivitesinin inhibisyonuyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Cai ve ark., 2012; Koken ve ark., 2016; Luo ve ark., 2012). AKT, Erk, Hif 1 α yine VEGF-A gen ifadelerinin artışında rol oynayarak tümör progresyonunu destekleyen onkogenik sinyal yollarındandır. Diyetle alınan bir flavonoid olan nobiletinin prostat kanser hücrelerinde antitümöral etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, nobiletinin tümör hücrelerinde NF-kB düzeylerini azalttığı, ayrıca tümörögenezden sorumlu diğer sinyal yollarında da p-AKT, cMyc ve Hif 1 α benzer bir azalmanın gözlemlendiği,

VEGF-A düzeylerinde düşüşün AKT/Hif 1 α ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2014). Litetürdeki birçok farklı çalışmayla ortaya çıkan sonuçla uyumlu şekilde çalışmamızda enflamatuar çevresel stresin modellendiği LNCaP hücrelerinde VEGF-A gen ifade düzeylerinde 7 kat kadar artışa neden olduğu, apalutamid tedavisinin intraselüler ROT düzeyleri ile birlikte diğer tüm selüler stres ve karsinogenezle ilişkili gen ifadelerinde azalmayla birlikte VEGF-A düzeylerinde azalmaya neden olduğu bulundu. Enflamatuar strese maruz kalan tümör hücrelerinde apalutamid uygulaması VEGF-A gen ifadesi düzeylerinde ~%25 kadar düşüşe neden olurken kontrol grubunda %40 azalma sağladığı bulundu. Birinci nesil antiandrojen ilaç olan ve apalutamidle benzer molekül kimyasına sahip olan ancak 10 kat kadar daha düşük efikasiye sahip bicalutamid ile gerçekleştirilen bir çalışmada, LNCaP hücreleri sentetik potent androjen R1881 ile uyarılmasından önce 10 μ M bicalutamid ile 2 saat ön uygulaması yapıldığında VEGF gen ve protein ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma bildirilmekte ve ayrıca VEGF-A gen promoterının düzenlenmesinde AR sinyal yolunun genomik etkinliğinin önemli rol üstlendiği bildirilmektedir (Eisermann ve ark., 2013).

Prostat kanserinde tümör progresyonunda rol oynadığı düşünülen hipoksi ilişkili sinyal yollarının hedeflenmesinin kastrasyon dirençli prostat kanseri tedavisinde AR aksı yanında ikinci bir moleküler hedef ile ilaç direncinin önüne geçilebilmesinde yardımcı olabileceği ve antikanser tedavi etkinliğini olumlu yönde etkileyebileceği hipotezine sahip olan bir çalışmada, LNCaP hücre AR sinyal yolları androjen uyarısıyla; Hif 1 α sinyal yolağı hipoksi uyarısı ile provoke edilerek hücre canlılıkları, apoptozis, AR bağımlı genomik etkinlik ile Hif 1 α ilişkili genomik etkinlik gen ve protein ifadelerini içeren analizlerle değerlendirilmiştir (Fernandez ve ark., 2015). Çalışmada ayrıca Hif1 α sinyal yolağını test etmek için siRNA aracılı gen susturma ile birlikte Hif1 α inhibitörü bir kimyasal ajan kullanılmış. AR genomik etkinliği tarafından pozitif yönde düzenlenen KLK3, FKBP5 ve TMPRSS2 gen ifadelerinin Hif1 α tarafından baskılanırken, DHT, Hif 1 α genomik hedeflerinde uyarıcı etkinlik sergilediği bulgusu bildirilmektedir. Hem enzalutamid ile bloke edilen AR sinyal yolağı, hem de Hif 1 α sinyal yolu inhibitörü chetomin kimyasalı resiprokal etki göstererek AR ve Hif 1 α sinyal yolu genomik etkinliğinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Yine bu iki ilacın kombine etkisinin sinerjistik ilaç etkinliği kapsamında iki ilacın toplam etkinliğinin üstünde antitümöral yanıtlar sağladığı bildirilmektedir. İkili kombinasyon tümör hücrelerinde VEGF-A miktarında azalmayı da sağladığı gösterilmiştir. Diğer yünden, Hif 1 α siRNA uygulamasının da ilaç kombinasyonuna benzer sonuçlar ortaya çıkardığı, apoptozisin

indüklenmesi ile tümör hücrelerinde antiproliferatif etkinlik sağlandığı ve özellikle enzalutamid dirençli 22Rv1 prostat kanser hücre hattında enzalutamidin apoptotik etkinliği ile antitümöral yanıtların elde edildiği bildirilmektedir.

Antioksidan, sitoprotektif ve anti-apoptotik özellikleri yanı sıra enflamatuvar selüler yanıtların baskılanmasında rol oynayan ve PK, hepatoma, melanoma, beyin tümörleri dahil pek çok kanser türünde yüksek ifadelenen mikrozomal bir enzim olan HMOX-1'in, kemoterapi etkinliğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Meme kanseri hücre hatlarında siRNA aracılı HMOX-1 geninin susturularak gerçekleştirilen bir çalışmada, anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-XL moleküllerinin aşağı yönde düzenlendiği, hücrelerde apoptozisin indüklenerek doksorubisinin meme kanserinde antikanser etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2015). Literatürdeki çalışmalarda bildirilenin aksine, bu tez çalışmasında enflamatuvar stresle birlikte indüklenmesi beklenen HMOX-1 gen ifadelerinin M1 grubunda, kontrol grubuyla benzer olarak bulunmuştur. HMOX-1 gen promototer bölgesi H₂O₂'in rol aldığı sinyal yolağı ile yukarı yönde düzenlendiği bilinmekte, bu yönüyle de M1 grubundaki HMOX-1 düzeylerinin kontrol grubuyla benzer bulunmasının biyokimyasal perspektifte açıklanması mümkün görülememektedir (Cisowski ve ark., 2005; Jian ve ark., 2011). Diğer taraftan enflamatuvar çevresel stresin modellendiği ve aynı zamanda apalutamid uygulaması gerçekleştirilen deney grubu olan M1+APA'da HMOX-1 gen ifade düzeylerinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde 5 kat kadar arttığı gösterildi.

Antiandrojen tedavilerin tümör hücrelerinde reseptör tirozin kinazların aktivasyonuna yol açtığı birçok farklı çalışmayla gösterilmiş ve bu etkiler dolayısıyla tümör hücresinde protümöral birtakım değişikliklerin meydana gelmesine aracılık ettiği gösterilmiştir (J. Leung ve M. Sadar, 2017; Verma ve ark., 2020). AKT ve AR sinyal iletimi arasında karşılıklı çapraz bir etkileşim olduğu, AKT inhibe edildiğinde AR sinyal iletiminin aktive olduğu, antiandrojen tedavi uygulamalarının ise AKT aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Lee ve ark., 2015). ADT, PK hücrelerinde köklülük karakterini uyardığı, EMT ve metastatik potansiyellerinde artışa neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Tümör biyolojisinde meydana gelen tümörögenез yönündeki değişimlerin ortaya çıkışında nongenomik AR sinyal yolağı aktivasyonun RTK sinyal yolakları ve özellikle AKT aktivasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir (J. Leung ve M. Sadar, 2017; Shen ve ark., 2018; Verma ve ark., 2020). Nongenomik AR aktivitesinde, membran ilişkili AR aracılığıyla gerçekleştirildiği, bunun için AR'nin mikrotübül bağımlı membran transferinin gerektiği bildirilmektedir (Li ve ark., 2018). Membran ilişkili AR'nin Hsp27

aktivasyonuna neden olduğu bu aktivasyon ile AR aracılı membran nükleus sinyal taşınımının gerçekleştirildiği yine aynı araştırmacıların gerçekleştirdikleri çalışmayla gösterilmiştir. Membran ilişkili AR'ünün aktive olması, yine aktive olan Hsp27'nin nükleusa transloke olan AR'nin transkripsiyonel etkinliğinde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda AR'nin stabilizasyonunun Hsp27 proteini tarafından sağlandığı, Hsp27'yi inhibe eden ilaçlarla AR proteini degradasyon süreçlerinin aktive edildiği ve bu degradasyon sürecinin AR'nin mutant olmasından bağımsız şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2021). Tez çalışmasında TAMs kaynaklı enflamatuar çevrenin modellendiği LNCaP hücre gruplarında tümör köklülüğü, anjiojenez ve EMT'nin indüklendiği bulundu. Normoksik koşullarda kültüre edilen U937 hücrelerinin PMA ile monositik farklılaşmasının uyarılması ile Hif- α sinyal yolağının aktifleştiği gösterilmiştir (Knowles ve ark., 2006). Bunun yanında tümör mikroçevresinde enflamatuar çevre koşullarının ve TAMsların ortama sekrete ettikleri hipoksik uyarı sinyallerinin karsinogenezdeki rolü son dönemde tümör biyolojisi alanında yürütülen araştırmaların önemli üzerinde durduğu hususlardan biridir (Triner ve Shah, 2016). Makrofaj hücre karakteristik fonksiyonlarının yerine getirilmesinde anahtar konumdaki Hif- α sinyal yolağı, tümör mikroçevresinde yoğun şekilde yer alan makrofaj hücrelerinin sekrete ettikleri sitokin, kemokin, NO vd.(Thakor ve Holcik, 2012) biyoaktif substanslarla birlikte ekzozom ve ekstraselüler veziküller ile tümör çevresindeki ortamı oluşturmaktadır (Hoshino ve ark., 2015; Lin ve Simon, 2016). Hif- α sinyal yolağı tümör hücrelerinde agresif tümör karakteri ile tumor progresyonunu destekleyici yönde etkilerde bulunmakta ve PI3K/AKT başta olmak üzere çeşitli RTK sinyal yolakların aktivitelerini desteklemekte, NF-kB aktivasyonu ve selüler inflammatuar sinyal yolaklarını uyarmaktadır (Balamurugan, 2016; D'Ignazio ve ark., 2016; Muz ve ark., 2015; Scholz ve Taylor, 2013; Vaupel ve Mayer, 2014). Enflamasyon nöroendokrin transdiferansiasyonu uyaran, prostat kanserinde agresif tümör karakteri gelişimini uyardığını gösteren birçok çalışmada elde edilen bulguları desteklemektedir. Temel selüler inflammatuar sinyal yolaklarından olan STAT3'ün androjen reseptör sinyal aktivitesinin blokajıyla aktive olduğu, aktif STAT3'ün tümör hücrelerinde köklülük yanıtlarını uyardığı gösterilmiştir (Schroeder ve ark., 2014).

Nükleer hormon reseptör yapısındaki AR, ADT akabinde gelişen KDPK dönüşümü dahil olmak üzere PK progresyonunun tüm süreçlerinde kritik konuma sahip bir onkogen fonksiyonu sergilemektedir. AR tarafından genomik düzenlenmesi gerçekleştirilen kritik önemdeki genlerin belirlenmesi, özellikle kök hücre pluripotensinin düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörü yapısındaki ürünleri odak alan ve nihayetinde KDPK tümör

progresyonunda rol oynayadığı tespit edilen sinyal yollarının blokajıyla yeni terapötik hedeflerle mevcut antitümöral yaklaşımlara alternatif stratejiler getirebilmeyi amaçlayan bir çalışmada, daha öncesinde PK'de kök hücre benzeri karakterlerin ve kendi kendini yenileme (self-renewal) özelliğinde artışa neden olduğu gösterilen Nanog'un AR sinyalizasyonu ile düzenlenen aday terapötik onkogen hedefi olup olmadığı LNCaP hücrelerinde gerçekleştirilen deneylerle araştırılmış ve Nanog gen promoterına bağlanan AR ile gen ve protein düzeyinde yukarı yönde düzenlendiği, AR sinyal yolağı aktivitesi ile aktive olan Nanog aşırı ifadenmesinin LNCaP hücrelerinde proliferasyonu ve tümör büyümesine neden olduğu, buna karşın enzalutamid ve dosetaksel ilaç direncinde artışa neden olmadığı gösterilmiştir (Kregel ve ark., 2014).

Yakın zamanda farklı kanser kök hücrelerinde Nanog (nanog homeobox) ve TGF- β 1/SMAD (Transforming growth factor- β 1/drosophila mothers against decapentaplegic protein) sinyal yolağının kanser progresyonundaki rolüne ilişkin gerçekleştirilen çalışmaları baz alan araştırmacılar (Deng ve ark., 2017; Hu ve ark., 2016), DU-145 hücrelerinden CD44⁺/CD133⁺/NANOG⁺ PCSCs'lerin akım sitometre izole ederek gerçekleştirdikleri, PCSCs'lerde (prostate cancer stem cells) bu yolağın kastrasyon direnci gelişimi ile PCSCs proliferasyonu üzerine olan etkinliğinin araştırdıkları çalışmada Nanog gen ifadesinin azaltılmasının PCSCs'lerde antiproliferatif yönde etki gösterdiği, apoptozisi arttırdığı, G0/G1 hücre siklus geçişini bloke ettiği, ayrıca tümörögenез, tümör migrasyonu ve EMT ile ilişkili TGF- β 1 ve p-SMAD2 ifadelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Nanog'un TGF- β 1/SMAD sinyal yolağı üzerine olan pozitif yöndeki etkisiyle PCSCs'lerde büyümeyi desteklediği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2020).

TGF- β R defektif olan LNCaP hücrelerinde, enflamatuvar stresin ve ayrıca androjen deprivasyon tedavisinin, nöroendokrin diferansiasyon ile tümör hücrelerinde migrasyon ve EMT artışına yol açtığı bildirilmektedir (Nouri ve ark., 2014; Yuan ve ark., 2006). EMT'nin uyarılmasında temel mediyatörlerden olan TGF- β , kanonik TGF- β R/SMAD sinyal yolağı yerine kanonik olmayan ERK/p38 MAPK, PI3K/Akt sinyal yolağını kullandığı düşünülmektedir (Papanikolaou ve ark., 2021; Singha ve ark., 2014; Vo ve ark., 2013). Ayrıca, AR upregüle edilen S/P LNCaP hücre hattında gerçekleştirilen bir çalışmada, AR sinyalizasyonunun EMT ilişkili gen ve proteinlerin e-cadherin, n-cadherin, vimentin ve snail ifadelerini baskılayıcı yönde etkinlik göstermektedir (Zhifang ve ark., 2015).

Apalutamid ile aynı etki mekanizmasına sahip kendisi gibi ikinci nesil antiandrojen olan enzalutamidin LNCaP hücre transkriptomundaki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada

komplet AR sinyal yolu blokajı yaptığı bilinen enzalutamidin androjenle aktiveşen AR sinyal yolağının hedef DNA promoter bölgeleri yerine alternatif hormon yanıt elemanları (örn. glukokortikoid reseptörünü gen bölgesini uyarmaktadır) ile genomik etkinlik sergilediği bu yönüyle parsiyel agonist etkinlik sergilemekle birlikte etkileri klasik androjen reseptör sinyal yolundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (Yuan ve ark., 2019).

LNCaP hücrelerinde bir bitki ekstraktının antitümöral etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, etkin ilaç dozlarıyla muamele edilen hücrelerin DAPI boyamasında nükleer kondensasyon, DNA fragmantasyon ve perinükleer apoptotik cisimlerde artış; TUNEL boyamasında DNA zincir kırıklarında apoptozis ile uyumlu bulguların gözlemlendiği bildirilmektedir. Işık mikroskopu altında koyu kahverengi boyanan nükleer kondensasyonun olduğu TUNEL pozitif hücreler apoptotik hücre ölümünü işaret ettiği, qRT-PCR analiziyle pro-apoptotik Bax gen ifade düzeylerinde artış tespit edildiği buna karşılık anti-apoptotik Bcl-2 gen ifade düzeylerinde tespit edilen azalmanın histolojik incelemelerde elde edilen bulgularla uyumluluk sergilediği bildirilmektedir (Chang ve ark., 2006). Ayrıca aynı çalışmada araştırmacılar, bitki ekstraktının LNCaP hücreleri üzerindeki antitümöral etkinliğini gerçekleştirdikleri MTT deneyi ile elde ettikleri hücre sitotoksitesite düzeyleri ve 6 saat süresince kaspaz substratı [DEVD-peptide-nitroanilide (pNA)] kullanarak kantite edilen aktif kaspaz-3 aktivitesindeki artış verisinin süre sonunda ortama eklenen aktif kaspaz inhibitörü DEVD-fmk ile kaspaz aktivitesindeki azalma bulgularının uyumluluk gösterdiği bildirilmektedir.

Prostat kanseri etiyopatogenezinde kronik enflamasyonun meydana getirdiği hücrel değişimlerin prostat epitel hücresi neoplastik dönüşümü ve karsinogenez süreçlerinin bütününde merkezi rolde olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Dahl ve ark., 2020; Daniyal ve ark., 2014; de Bono ve ark., 2020; Hayashi ve ark., 2019; Karan ve Dubey, 2016; Klein ve Silverman, 2008; Lv ve ark., 2020; Palapattu ve ark., 2005; Sfanos ve De Marzo, 2012; St Hill ve Lutfiyya, 2015; Sutcliffe ve Pontari, 2016; Wilmer ve ark., 1989; Xu ve ark., 2005). Enflamatuvar ortamda oksidatif stresin arttığı ve redoks dengesindeki değişimin prostat karsinogenezinde önemli rol oynadığı bilimektedir (J. de Bono et al., 2020). Kronik enflamatuvar stres, hücre içi transkripsiyon faktörü olarak görev yapan, uyarılmadığında sitozolde yer alan AR proteininin ubiquitinasyonu, proteozomal degradasyonuna neden olmakta ve böylelikle androjen bağımsız prostat kanseri klonlarının ortaya çıkmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Debeleç Bütüner & Korkmaz, 2014). Yapılan birçok çalışmada, enflamatuvar stresin prostat kanser hücresinde oksidatif stres ve genetik hasarlar (DNA mutasyonları, çift zincir kırıkları vd) ile çok daha agresif bir yapıya

dönüşümü tetiklediği gösterilmiştir. Enflamatuvar stresin indüklediği tümör biyolojisindeki bu değişimle prostat kanser hücrelerinin anti-hormon tedavisinin etkinliğinin azalmış olduğu gösterilmiştir (Dahl ve ark., 2020; Li ve ark., 2014). Burdan yola çıkarak, özellikle apalutamid gibi yeni nesil antiandrojen ajanların tümör ilişkili makrofaj kaynaklı içerisindeki reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerle oksidatif stres komponentine ek çeşitli sitokin, kemokin ve aktif biyomolekülün yer aldığı enflamatuvar tümör mikroçevresinde, terapötik yanıtlarının tümör biyolojisindeki meydana gelen değişimlerle birlikte araştırıldığı özgün bir çalışma olarak onkoloji literatürüne katkı sunabileceğini düşünüyoruz. Dahası mikroçevrelerdeki etkinliğini anlayabilmek, bu tedavi rejiminin antitümöral etkisini artırabilme yolunda bize ışık tutabilir.

Birinci nesil antiandrojen ilaçlardan olan bicalutamid, tümör hücreleri üzerinde radyoterapi duyarlılığını arttırıcı etkinlik sergilemezken bicalutamide göre AR sinyalizasyonunu farklı aşamalarıyla birlikte 6-9 kat kadar daha güçlü şekilde bloke eden ikinci nesil antiandrojen ilaçların (abirateron asetat, enzalutamid, apalutamid ve darolutamid) prostat kanserinde iyonize radyasyon etkinliğini ne şekilde etkilediğinin araştırıldığı bir çalışmada tümör hücrelerinin kastrasyona/antiandrojenlere dirençli veya duyarlı olmasından bağımsız şekilde [hormon sensitif LNCaP (LNCaP-wt); hormon ablasyonuna dirençli LNCaP (LNCaP-abl); apalutamide dirençli (LNCaP-ARN509); KDPK C4-2B (C4-2B-wt); enzalutamide dirençli C4-2B subklonu (C4-2B-ENZA)], AR sinyal yolağı blokajına bağlı DNA çift zincir kırık tamir yanıtlarındaki (DNA double strand break repair) baskılanma ile DNA hasar artışının güçlü bir belirteci olan γ H2AX düzeylerinde artışla birlikte iyonize radyasyon etkinliğinde artış sağladığı gösterilmiştir (Elsesy ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, literatürdeki bu çalışmaya benzer şekilde enflamatuvar stres etkisiyle apalutamidin sitotoksik etkisine direnç geliştiren LNCaP hücrelerinde, apalutamidin sitostatik etkinliğinin sürmekte olduğu ve tümör biyolojisini antitümöral yöndeki etkileri tümörogenez, neovaskülarizasyon, EMT ve entegre stres yanıtları vd. protümöral sinyal yollarında baskılanma ile göstermektedir.

Prostat kanserinde ER stresin rolünün araştırıldığı birçok çalışma, indüklenen ER stres, akabinde gelişen adaptif katlanmamış protein yanıtı ile neoplastik progresyonun sağlanmasında esansiyel konumda olduğunu göstermektedir. Bu yönüyle birçok araştırmacı ER stres ve KPY'yi terapötik bir hedef olarak görmektedir (O. Chen ve ark., 2018; Clarke ve ark., 2014; Nguyen ve ark., 2018). PK'de tümör baskılayıcı PTEN gen kaybı ile birlikte temel onkojenik sinyal yolu olan c-myc aktivasyonu ER stres ile güçlü ilişki içerisinde (Iwata ve ark., 2010; Koh ve ark., 2010; Stine ve ark., 2015). IRE1 α -

XBPs yolağının c-myc sinyal yolunu aktive ederek LNCaP hücrelerinde kanser progresyonu sağladığını gösteren bir çalışmada, IRE1 α 'nın XBP1'in XBPs splicingini sağlayan RNaz aktivitesinin farmakolojik (MKC8866) olarak blokajının PK tümör büyümesini güçlü şekilde inhibe ettiği farelerde gerçekleştirilen birçok prelinik PK modeli üzerinden gösterilmiştir. Monoterapi ile elde edilen bu etkinin mevcut anitkanser ilaçlarla, enzalutamid ile kombinasyonla gerçekleştirildiğinde sinerjistik etkinlik sağlandığı bildirilmektedir. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri transkriptomik analizle IRE1 α -XBPs sinyal yolağı aktivitesinin c-myc sinyalizasyonu için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan analiz ile optimal c-myc aktivitesi (hem mRNA hem de protein ifadesinde) için XBP1s'a ihtiyaç duyulduğunun ilk kez gösterildiği bu çalışmada KPY ile onkojenik aktivasyon arasındaki mekanistik ilişki net şekilde ortaya konmuştur. Ayrıca XBPs transkripsiyon faktörünün DNA üzerindeki etkinliğinin güçlü şekilde PK progresyonuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Sheng ve ark., 2019).

LNCaP hücrelerinin IL-6 cDNA taşıyan bir vektörle transfekte edilerek IL-6 aşırı ifade eden LNCaP hücrelerinin elde edilerek klinikte gözlemlenen IL-6'yı otokrin olarak yüksek miktarlarda sekrete eden prostat tümörlerinde neoplastik süreçlerin aydınlatılmasını amaçlayan bir çalışmada, IL-6 aşırı ifadelendiği tümör hücrelerinde androjen deprivasyonuna duyarlılığın arttığı, Akt ve MAPK yolunun aktivitesinin ise arttığı gösterilmiştir (Terakawa ve ark., 2009). Hormon deprivasyonunun uygulanmadığı koşullarda hücre proliferasyonlarının benzer olduğu, deprivasyon uygulaması ile birlikte hücre proliferasyonu boş vektörle transfekte edilen LNCaP kontrol grubuna göre 6. güne kadar azalan hızda artış gösterirken, 7. Günde hücre proliferasyonu IL-6 aşırı ifade eden hücrelerde proliferasyon hızı kontrolden fazla olduğu gösterilmiştir. Nude farelere bu hücrelerin subkutan enjeksiyonu ile gerçekleştirilen prelinik çalışmada ise kastrasyon sonrası hücreler 5. güne kadar kontrol ile aynı tümör büyüklüğüne sahipken, 10. gün sonrasında IL-6 aşırı ifade eden hücrelerin uygulandığı fare gruplarında tümör boyutlara kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde küçük hale gelmiştir. Deprivasyon uygulanmadığı prelinik hayvanlarda ise IL-6'yı aşırı ifade eden LNCaP hücrelerinin uygulandığı farelerde tümör boyutları 50. deney gününe kadar istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrole göre daha küçük olduğu gösterilmiştir.

M1 polarize TAM'larca oluşturulan enflamatuar TM'den kaynaklanan çevresel stresin, prostat kanser hücresinde tümör hücre sağkalımını destekleyici yönde olduğunu gösteren bulgulara sahip olan bu çalışmada, ileri evre prostat kanser olgularında klinik etkinliği kanıtlanmış bir antikanser ilaç olan ve primer antitümöral etkinliğini androjen reseptör

sinyal yolağının blokajı üzerinden gerçekleştiren apalutamidin bu enflamatuvar çevre ortamının tümör hücre biyolojisinde neden olduğu değişimler neticesinde antiproliferatif ve sitotoksik etkinliğini yitirdiği, buna karşın kontrol grubunda etkin olan ilaç dozuyla tümör hücre progresyonunu sağlayan hücre içi sinyal yolaklarının baskılanması yönündeki etkilerinin belli oranda korunması ile sitostatik etkiler sergilediği gösterildi. Prostat kanserinde enflamasyonun neden olduğu tümör biyolojisinin değişimi yönündeki adaptif entegre sinyal yolaklarının bütüncül olarak tümör hücre kurtuluşunda rol oynadığı ve tümörögenezi destekleyici nitelik taşıdığı gösterildi. Tümör mikroçevresinin neoplastik hücrelerde genetik heterojenite, EMT, migrasyon, invazyon (bağ dokusu boyunca tümör migrasyonu), metastatik kabiliyet, neovaskülarizasyonda artış ile kemoterapötik ilaç ve apoptotik aktivitede azalma olarak kategorize edilen etkilerinin bütünü gerçekleştirilen tez çalışmasıyla elde edilen bulgularla örtüşmektedir (Ungefroren ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasında, tümör biyolojisi ve ilaç terapötik etkinliğindeki değişimlerin değerlendirilmesinde verilerin bir bölümü, gen ifade düzeylerinin qRT-PCR analizine dayanmaktadır. Selüler yanıtların transkripsiyonel aşamasını yansıtan bu veriler, sonraki translasyon ve posttranslasyonel süreçlerde meydana gelen olası değişkenliklerin tespitinde yeterli olamayabileceğinin ifade edilmesi önemlidir. Ayrıca M1 polarize TAMs kaynaklı enflamatuvar stresin indüklediği KPY ile entegre stres yanıtları aktivasyonu, EMT, tümör hücre köklülüğündeki artışların, karsinogenez ve ilaç direnci gelişimindeki rollerin detaylarının belirlenmesi ve tablonun çok daha net şekilde ele alınabilmesine katkı sağlayacağı düşünülen sinyal yolaklarında hedef olarak belirlenen moleküllerin farklı şekillerde blokajıyla (siRNA/hnRNA aracılı ve/veya kimyasal ajanlar kullanılarak) elde edilecek verilerin mevcut deneylerin sunamadığı bilimsel kanıtlarla eksik kalan hususların giderilmesini mümkün kılacağı düşünülebilir. Böylelikle enflamatuvar tümör mikroçevresinin tümörögenez ve ilaç direnci gelişim süreçlerindeki rolü ve tümör biyolojisinde meydana getirdiği değişimlerin tümör progresyonuna olan etkisi mekanistik olarak incelenebilmesini olanaklı kılacağı gibi analiz verilerinin çok daha güçlü bilimsel kanıt düzeyine taşınmasını mümkün kılacaktır. Nihai olarak, bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, literatürde önceki birçok çalışma ile gösterildiği şekilde AR reseptör aksını hedefleyen ikinci nesil antiandrojen ilaçların, sıklıkla vurgu yapılan AR sinyal yolağının konvansiyonel genomik düzeyle sınırlı olmayan inhibitör etkinliğiyle, onkojenik süreçlere destek olan ve diğer selüler sinyal yolaklarıyla ortak hareket eden ankonvansiyonel nongenomik AR sinyal yolağı üzerindeki etkilerine vurgu yapmaktadır. KDPK aşamasındaki tümör hücrelerinde karsinogenezi destekleyerek hastalık progresyonunda rol

oynayan değişimleri baskılayıcı yöndeki antitümöral nitelik taşıyan etkilerinin, sitotoksik ve antiproliferatif etkinliğin kaybolduğu aşamada da belli ölçülerde sürmekte olduğu ve etkinlik dolayısıyla sağladığı klinik fayda KDPK’de ilk ve ikinci basamak kemoterapi modalitelerindeki konumunun hücre boyutunda da anlaşılmasına katkı sunmuş olabileceği ifade edilebilir (Banuelos ve ark., 2020; Helminen, 2020; Hoshi ve ark., 2021; Tsao ve ark., 2021).



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

M1 polarize tümör ilişkili makrofaj (TAM) kaynaklı enflamatuvar tümör mikroçevresinin *in vitro* olarak modellendiği bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, hormon duyarlı prostat adenokanser hücrelerinde (LNCaP), TAM kaynaklı enflamatuvar çevresel strese rol oynayan kimyasal mediyatörler (sitokin vd. biyoaktif moleküller) ile oksidatif stres bileşenlerinin (ROT/RNT) bütüncül etkisi neticesinde tetiklenen selüler antioksidan savunma mekanizmalarının indüksiyonunu da içeren adaptif selüler stres yanıtların sitotoksik etkili antikanser ilaçlara karşı tümör hücrelerinde direnç gelişiminde ve hastalık progresyonunda oynadığı rolün önemine işaret etmektedir. İleri evre metastatik prostat kanserinde etkinliği kanıtlanmış yeni jenerasyon antiandrojen grubu antikanser ilaç olan apalutamidin M1 polarize TAM kaynaklı enflamatuvar tümör mikroçevresinin tümör hücresinde oluşturduğu adaptif stres yanıtları ile antitümör etkisini yitirdiği, buna karşın agresif tümör karakteri ile ilişkili ve karsinogenezis yönünde selüler değişimlerin bir bölümünü nötralize ederek gösterdiği sitostatik (tümör hücre canlılığını azaltma meydana getirmeyen) etkiyle tümör progresyonuyla ilişkili tümör hücre değişimlerini belli ölçülerde baskılayarak antitümör etkinliğini sürdürdüğü görüldü.

Translasyonel tıp perspektifinde gerçekleştirilen bu doktora tez çalışmasında elde edilen bulgular, ikinci nesil antiandrojen ilaçlara karşı direnç gelişen olguların, androjen reseptör sinyal yolağını hedefleyen ajanların dahil edildiği kombinasyon terapilerinden klinik fayda sağlamasını tümör hücre biyolojisindeki değişimlerde dirençli hücre gruplarında gözlemlenen antitümör yanıtların sürmekte olduğunun gösterilmesi ile klinik çalışmalarda elde edilen veriler ışığında şekillenen tedavi algoritmaları ve terapötik ilaç kombinasyonu modalitelerinin şekillenmesindeki süreci moleküler temelde destekleyici nitelik taşıdığı ifade edilebilir.

Ayrıca, çoğunlukla sekretuar özellikteki epitel hücrelerinden köken alan prostat kanserinde, farklı uyaranlar kaynak alabilen ER stres ve KPY'nin aktive olduğu kanser türlerinden biri olduğu, buna ek mikroçevrede yer alan immün hücre kaynaklı enflamatuvar stresle agümente olan selüler adaptif stres yanıtlarının tedavi direnci ve hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu, tümör hücre adaptif yanıtlarının inhibisyonu veya modülasyonu yoluyla interfere edilmesinin kanser progresyonunun önüne geçilebileceği düşüncesini desteklemeyerek bu yöndeki ilaç geliştirme süreçlerine ilişkin farklı bir

perspektif sunulmaktadır.

Son olarak, bu tez çalışması ile elde edilen bulguların büyük oranda tümör hücresine odaklanan terapötik yaklaşımların primer tümörü yegâne hedef olarak belirleyen prespektifle sınırlı kalmaması gereğini de yinelemesi açısından önem taşıdığı düşüncesindeyiz.



7. KAYNAKLAR

Abdulhadi, F. H. S. (2014). *Differentiation of U-937 Monocytes to Macrophage-Like Cells Polarized into M1 or M2 Phenotypes According to Their Specific Environment: A Study of Morphology, Cell Viability, and CD Markers of an In Vitro Model of Human Macrophages*. (Master Yüksek Lisans). Üniversitesi, Erişim sağlanan adres <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddu&AN=C0AFFEA471D8C05C&lang=tr&site=ehost-live> Şuradan ulaşılabilir Veri sağlayıcı Veritabanı ismi database.

Abou Khouzam, R., Goutham, H. V., Zaarour, R. F., Chamseddine, A. N., Francis, A., Buart, S., . . . Chouaib, S. (2020). Integrating tumor hypoxic stress in novel and more adaptable strategies for cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol*, 65, 140-154. doi:10.1016/j.semcancer.2020.01.003

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, 121-126. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3

Akl, H., Vervloessem, T., Kiviluoto, S., Bittremieux, M., Parys, J. B., De Smedt, H., & Bultynck, G. (2014). A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1843(10), 2240-2252. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.017

Alanee, S., Moore, A., Nutt, M., Holland, B., Dynda, D., El-Zawahry, A., & McVary, K. T. (2015). Contemporary Incidence and Mortality Rates of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Anticancer Res*, 35(7), 4145-4150. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124369>

Albright, F., Stephenson, R. A., Agarwal, N., Teerlink, C. C., Lowrance, W. T., Farnham, J. M., & Albright, L. A. (2015). Prostate cancer risk prediction based on complete prostate cancer family history. *Prostate*, 75(4), 390-398. doi:10.1002/pros.22925

Ali, M. U., Ur Rahman, M. S., Jia, Z., & Jiang, C. (2017). Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumour Biol*, 39(6), 1010428317709805. doi:10.1177/1010428317709805

Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., . . . Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*, 286(2), 241-278. doi:10.1111/febs.14608

Alshareef, M. H., Hartland, E. L., & McCaffrey, K. (2021). Effectors Targeting the Unfolded Protein Response during Intracellular Bacterial Infection. *Microorganisms*, 9(4). doi:10.3390/microorganisms9040705

Amaza® Cell Line Nucleofector® Kit C. (2009, Son güncelleme tarihi). Erişim sağlanan adres https://www.cultek.com/amfilerating/file/view/file_id/39913/

- Andersen, R. J., Mawji, N. R., Wang, J., Wang, G., Haile, S., Myung, J. K., . . . Sadar, M. D. (2010). Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell*, 17(6), 535-546. doi:10.1016/j.ccr.2010.04.027
- Arima, Y., Inoue, Y., Shibata, T., Hayashi, H., Nagano, O., Saya, H., & Taya, Y. (2008). Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 68(13), 5104-5112. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5680
- Arlt, W., Martens, J. W., Song, M., Wang, J. T., Auchus, R. J., & Miller, W. L. (2002). Molecular evolution of adrenarche: structural and functional analysis of p450c17 from four primate species. *Endocrinology*, 143(12), 4665-4672. doi:10.1210/en.2002-220456
- Arora, H., Panara, K., Kuchakulla, M., Kulandavelu, S., Burnstein, K. L., Schally, A. V., . . . Ramasamy, R. (2018). Alterations of tumor microenvironment by nitric oxide impedes castration-resistant prostate cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(44), 11298-11303. doi:10.1073/pnas.1812704115
- Asai, A., Miyata, Y., Matsuo, T., Shida, Y., Hakariya, T., Ohba, K., & Sakai, H. (2017). Changes in Lymphangiogenesis and Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Neo-Adjuvant Hormonal Therapy in Prostate Cancer Patients. *Prostate*, 77(3), 255-262. doi:10.1002/pros.23244
- Attar, R. M., Takimoto, C. H., & Gottardis, M. M. (2009). Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res*, 15(10), 3251-3255. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1171
- Auprich, M., Bjartell, A., Chun, F. K., de la Taille, A., Freedland, S. J., Haese, A., . . . van der Poel, H. (2011). Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. *Eur Urol*, 60(5), 1045-1054. doi:10.1016/j.eururo.2011.08.003
- Ayala, A., Munoz, M. F., & Arguelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438. doi:10.1155/2014/360438
- Bai, S., Cao, S., Jin, L., Kobelski, M., Schouest, B., Wang, X., . . . Dong, Y. (2019). A positive role of c-Myc in regulating androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Oncogene*, 38(25), 4977-4989. doi:10.1038/s41388-019-0768-8
- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Wasinger, V. C., Wang, S., Zhu, Y., . . . Li, Y. (2021). Activation of the eIF2alpha/ATF4 axis drives triple-negative breast cancer radioresistance by promoting glutathione biosynthesis. *Redox Biol*, 43, 101993. doi:10.1016/j.redox.2021.101993
- Baillargeon, J., Pollock, B. H., Kristal, A. R., Bradshaw, P., Hernandez, J., Basler, J., . . . Thompson, I. (2005). The association of body mass index and prostate-specific antigen in a population-based study. *Cancer*, 103(5), 1092-1095. doi:10.1002/cncr.20856

- Balamurugan, K. (2016). HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer*, 138(5), 1058-1066. doi:10.1002/ijc.29519
- Balk, S. P., Ko, Y. J., & Bubley, G. J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*, 21(2), 383-391. doi:10.1200/jco.2003.02.083
- Ballar, P., Erbaykent-Tepedelen, B., Gozen, O., & Erzurumlu, Y. (2020). Divergent Modulation of Proteostasis in Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 1233, 117-151. doi:10.1007/978-3-030-38266-7_5
- Bancroft, E. K., Page, E. C., Brook, M. N., Thomas, S., Taylor, N., Pope, J., . . . Eeles, R. A. (2021). A prospective prostate cancer screening programme for men with pathogenic variants in mismatch repair genes (IMPACT): initial results from an international prospective study. *Lancet Oncol*, 22(11), 1618-1631. doi:10.1016/s1470-2045(21)00522-2
- Banerjee, S., Lin, C. F., Skinner, K. A., Schiffhauer, L. M., Peacock, J., Hicks, D. G., . . . De, A. K. (2011). Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res*, 71(2), 318-327. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1778
- Banez, L. L., Hamilton, R. J., Partin, A. W., Vollmer, R. T., Sun, L., Rodriguez, C., . . . Freedland, S. J. (2007). Obesity-related plasma hemodilution and PSA concentration among men with prostate cancer. *JAMA*, 298(19), 2275-2280. doi:10.1001/jama.298.19.2275
- Banuelos, C. A., Ito, Y., Obst, J. K., Mawji, N. R., Wang, J., Hirayama, Y., . . . Sadar, M. D. (2020). Ralaniten Sensitizes Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer to Ionizing Radiation in Prostate Cancer Cells that Express Androgen Receptor Splice Variants. *Cancers (Basel)*, 12(7). doi:10.3390/cancers12071991
- Banuelos, C. A., Tavakoli, I., Tien, A. H., Caley, D. P., Mawji, N. R., Li, Z., . . . Sadar, M. D. (2016). Sintokamide A Is a Novel Antagonist of Androgen Receptor That Uniquely Binds Activation Function-1 in Its Amino-terminal Domain. *J Biol Chem*, 291(42), 22231-22243. doi:10.1074/jbc.M116.734475
- Barfeld, S. J., Urbanucci, A., Itkonen, H. M., Fazli, L., Hicks, J. L., Thiede, B., . . . Mills, I. G. (2017). c-Myc Antagonises the Transcriptional Activity of the Androgen Receptor in Prostate Cancer Affecting Key Gene Networks. *EBioMedicine*, 18, 83-93. doi:10.1016/j.ebiom.2017.04.006
- Batulan, Z., Pulakazhi Venu, V. K., Li, Y., Koumbadinga, G., Alvarez-Olmedo, D. G., Shi, C., & O'Brien, E. R. (2016). Extracellular Release and Signaling by Heat Shock Protein 27: Role in Modifying Vascular Inflammation. *Front Immunol*, 7, 285. doi:10.3389/fimmu.2016.00285
- Baud, V., & Karin, M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, 8(1), 33-40. doi:10.1038/nrd2781
- Beebe-Dimmer, J. L., Faerber, G. J., Morgenstern, H., Werny, D., Wojno, K., Halstead-Nussloch, B., & Cooney, K. A. (2008). Body composition and serum prostate-specific

antigen: review and findings from Flint Men's Health Study. *Urology*, 71(4), 554-560. doi:10.1016/j.urology.2007.11.049

Bell, K. J., Del Mar, C., Wright, G., Dickinson, J., & Glasziou, P. (2015). Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer*, 137(7), 1749-1757. doi:10.1002/ijc.29538

Benham, A. M. (2019). Endoplasmic Reticulum redox pathways: in sickness and in health. *FEBS J*, 286(2), 311-321. doi:10.1111/febs.14618

Benson, M. C., Whang, I. S., Olsson, C. A., McMahon, D. J., & Cooner, W. H. (1992). The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. *J Urol*, 147(3 Pt 2), 817-821. doi:10.1016/s0022-5347(17)37394-9

Benson, M. C., Whang, I. S., Pantuck, A., Ring, K., Kaplan, S. A., Olsson, C. A., & Cooner, W. H. (1992). Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol*, 147(3 Pt 2), 815-816. doi:10.1016/s0022-5347(17)37393-7

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239(1), 70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292

Bernard, D., Pourtier-Manzanedo, A., Gil, J., & Beach, D. H. (2003). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest*, 112(11), 1724-1731. doi:10.1172/JCI19035

Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882-888.

Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., . . . Koumenis, C. (2005). ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*, 24(19), 3470-3481. doi:10.1038/sj.emboj.7600777

Björk, T., Piironen, T., Pettersson, K., Lövgren, T., Stenman, U. H., Oesterling, J. E., . . . Lilja, H. (1996). Comparison of analysis of the different prostate-specific antigen forms in serum for detection of clinically localized prostate cancer. *Urology*, 48(6), 882-888. doi:10.1016/s0090-4295(96)00486-4

Boyce, M., & Yuan, J. (2006). Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ*, 13(3), 363-373. doi:10.1038/sj.cdd.4401817

Brauchle, E., Thude, S., Brucker, S. Y., & Schenke-Layland, K. (2014). Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Sci Rep*, 4, 4698. doi:10.1038/srep04698

Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A. E., Torrealba, N., Paredes, F., . . . Lavandero, S. (2013). Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics

and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol*, 301, 215-290. doi:10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1

Brawer, M. K., Aramburu, E. A., Chen, G. L., Preston, S. D., & Ellis, W. J. (1993). The inability of prostate specific antigen index to enhance the predictive value of prostate specific antigen in the diagnosis of prostatic carcinoma. *J Urol*, 150(2 Pt 1), 369-373. doi:10.1016/s0022-5347(17)35485-x

Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2017). *TNM classification of malignant tumours*. Yayınlandığı Yer: Yayıncı.

Bryk, D. J., Llukani, E., Taneja, S. S., Rosenkrantz, A. B., Huang, W. C., & Lepor, H. (2017). The Role of Ipsilateral and Contralateral Transrectal Ultrasound-guided Systematic Prostate Biopsy in Men With Unilateral Magnetic Resonance Imaging Lesion Undergoing Magnetic Resonance Imaging-ultrasound Fusion-targeted Prostate Biopsy. *Urology*, 102, 178-182. doi:10.1016/j.urology.2016.11.017

Bucala, R., Tracey, K. J., & Cerami, A. (1991). Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, 87(2), 432-438. doi:10.1172/JCI115014

Buchanan, G., Greenberg, N. M., Scher, H. I., Harris, J. M., Marshall, V. R., & Tilley, W. D. (2001). Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 7(5), 1273-1281. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350894>

Budhu, A., & Wang, X. W. (2006). The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol*, 80(6), 1197-1213. doi:10.1189/jlb.0506297

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Baskı, Vol. 52, pp. 302-310). Yer Published: Yayıncı. (Reprinted from: Tekrar Baskı).

Cai, X., Lu, W., Ye, T., Lu, M., Wang, J., Huo, J., . . . Cao, P. (2012). The molecular mechanism of luteolin-induced apoptosis is potentially related to inhibition of angiogenesis in human pancreatic carcinoma cells. *Oncol Rep*, 28(4), 1353-1361. doi:10.3892/or.2012.1914

Cairns, P., Okami, K., Halachmi, S., Halachmi, N., Esteller, M., Herman, J. G., . . . Sidransky, D. (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res*, 57(22), 4997-5000.

Calderwood, S. K. (2018). Heat shock proteins and cancer: intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 373(1738). doi:10.1098/rstb.2016.0524

Carlsson, S., Assel, M., Sjöberg, D., Ulmert, D., Hugosson, J., Lilja, H., & Vickers, A. (2014). Influence of blood prostate specific antigen levels at age 60 on benefits and harms of prostate cancer screening: population based cohort study. *BMJ*, 348, g2296. doi:10.1136/bmj.g2296

Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., & Ali, M. M. (2015). Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *EMBO J*, 34(11), 1589-1600. doi:10.15252/embj.201489183

Carter, H. B., Pearson, J. D., Metter, E. J., Brant, L. J., Chan, D. W., Andres, R., . . . Walsh, P. C. (1992). Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA*, 267(16), 2215-2220.

Catalona, W. J., Partin, A. W., Slawin, K. M., Brawer, M. K., Flanigan, R. C., Patel, A., . . . Southwick, P. C. (1998). Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA*, 279(19), 1542-1547. doi:10.1001/jama.279.19.1542

Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., . . . Southwick, P. C. (1994). Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*, 151(5), 1283-1290. doi:10.1016/s0022-5347(17)35233-3

Chang, H. K., Shin, M. S., Yang, H. Y., Lee, J. W., Kim, Y. S., Lee, M. H., . . . Kim, C. J. (2006). Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 29(8), 1597-1602. doi:10.1248/bpb.29.1597

Chang, S. L., Harshman, L. C., & Presti, J. C., Jr. (2010). Impact of common medications on serum total prostate-specific antigen levels: analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Oncol*, 28(25), 3951-3957. doi:10.1200/jco.2009.27.9406

Chanput, W., Peters, V., & Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. Lopez-Exposito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (Baskı, pp. 147-159). Yayıncı. (Reprinted from: Tekrar Baskı).

Chen, F. Z., & Zhao, X. K. (2013). Ubiquitin-proteasome pathway and prostate cancer. *Onkologie*, 36(10), 592-596. doi:10.1159/000355166

Chen, H., Zhou, L., Wu, X., Li, R., Wen, J., Sha, J., & Wen, X. (2016). The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21(5), 1084-1091. doi:10.2741/4443

Chen, J., Creed, A., Chen, A. Y., Huang, H., Li, Z., Rankin, G. O., . . . Chen, Y. C. (2014). Nobiletin suppresses cell viability through AKT pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells. *BMC Pharmacol Toxicol*, 15, 59. doi:10.1186/2050-6511-15-59

Chen, M., Zhang, J., Sampieri, K., Clohessy, J. G., Mendez, L., Gonzalez-Billalabeitia, E., . . . Pandolfi, P. P. (2018). An aberrant SREBP-dependent lipogenic program promotes metastatic prostate cancer. *Nat Genet*, 50(2), 206-218. doi:10.1038/s41588-017-0027-2

Chen, O., Bobak, P., Stasyk, V., & Kunz-Schughart, L. A. (2018). A Complex Scenario and Underestimated Challenge: The Tumor Microenvironment, ER Stress, and Cancer Treatment. *Curr Med Chem*, 25(21), 2465-2502. doi:10.2174/0929867325666180117110259

Chiang, S. K., Chen, S. E., & Chang, L. C. (2018). A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 20(1). doi:10.3390/ijms20010039

Cho, H., Stanzione, F., Oak, A., Kim, G. H., Yerneni, S., Qi, L., . . . Chan, C. (2019). Intrinsic Structural Features of the Human IRE1alpha Transmembrane Domain Sense Membrane Lipid Saturation. *Cell Rep*, 27(1), 307-320 e305. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.017

Chong, J. T., Oh, W. K., & Liaw, B. C. (2018). Profile of apalutamide in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: evidence to date. *Onco Targets Ther*, 11, 2141-2147. doi:10.2147/OTT.S147168

Chornokur, G., Dalton, K., Borysova, M. E., & Kumar, N. B. (2011). Disparities at presentation, diagnosis, treatment, and survival in African American men, affected by prostate cancer. *Prostate*, 71(9), 985-997. doi:10.1002/pros.21314

Christensson, A., Björk, T., Nilsson, O., Dahlén, U., Matikainen, M. T., Cockett, A. T., . . . Lilja, H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol*, 150(1), 100-105. doi:10.1016/s0022-5347(17)35408-3

Chuang, M. J., Sun, K. H., Tang, S. J., Deng, M. W., Wu, Y. H., Sung, J. S., . . . Sun, G. H. (2008). Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci*, 99(5), 905-913. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00756.x

Cigan, A. M., Feng, L., & Donahue, T. F. (1988). tRNAⁱ(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science*, 242(4875), 93-97. doi:10.1126/science.3051379

Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48(6), 749-762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022

Cisowski, J., Loboda, A., Jozkowicz, A., Chen, S., Agarwal, A., & Dulak, J. (2005). Role of heme oxygenase-1 in hydrogen peroxide-induced VEGF synthesis: effect of HO-1 knockout. *Biochem Biophys Res Commun*, 326(3), 670-676. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.083

Claps, M., Mennitto, A., Guadalupi, V., Sepe, P., Stellato, M., Zattarin, E., . . . Procopio, G. (2020). Immune-checkpoint inhibitors and metastatic prostate cancer therapy: Learning by making mistakes. *Cancer Treat Rev*, 88, 102057. doi:10.1016/j.ctrv.2020.102057

Clarke, H. J., Chambers, J. E., Liniker, E., & Marciniak, S. J. (2014). Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*, 25(5), 563-573. doi:10.1016/j.ccr.2014.03.015

Clegg, N. J., Wongvipat, J., Joseph, J. D., Tran, C., Ouk, S., Dilhas, A., . . . Hager, J. H. (2012). ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer Res*, 72(6), 1494-1503. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3948

Cohen-Kaplan, V., Livneh, I., Avni, N., Fabre, B., Ziv, T., Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2016). p62- and ubiquitin-dependent stress-induced autophagy of the mammalian 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(47), E7490-E7499. doi:10.1073/pnas.1615455113

Corcoran, N. M., & Costello, A. J. (2003). Interleukin-6: minor player or starring role in the development of hormone-refractory prostate cancer? *BJU Int*, 91(6), 545-553. doi:10.1046/j.1464-410x.2003.04025.x

Cordier, W., Gulumian, M., Cromarty, A. D., & Steenkamp, V. (2013). Attenuation of oxidative stress in U937 cells by polyphenolic-rich bark fractions of *Burkea africana* and *Syzygium cordatum*. *BMC Complement Altern Med*, 13, 116. doi:10.1186/1472-6882-13-116

Cortas, N. K., & Wakid, N. W. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, 36(8 Pt 1), 1440-1443. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2387039>

Costa-Mattioli, M., & Walter, P. (2020). The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science*, 368(6489). doi:10.1126/science.aat5314

Crawford, E. D. (1997). Prostate Cancer Awareness Week: September 22 to 28, 1997. *CA Cancer J Clin*, 47(5), 288-296. doi:10.3322/canjclin.47.5.288

Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M. C., Morselli, E., Vitale, I., . . . Kroemer, G. (2010). The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J*, 29(3), 619-631. doi:10.1038/emboj.2009.364

Culig, Z., Hobisch, A., Herold, M., Hittmair, A., Thurnher, M., Eder, I. E., . . . Konwalinka, G. (1998). Interleukin 1 β mediates the modulatory effects of monocytes on LNCaP human prostate cancer cells. *Br J Cancer*, 78(8), 1004-1011. doi:10.1038/bjc.1998.619

Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 279(19), 20108-20117. doi:10.1074/jbc.M314219200

Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(3), 317-332. doi:10.1016/j.biocel.2005.09.018

Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*, 23(20), 7198-7209. doi:10.1128/MCB.23.20.7198-7209.2003

- Cutler, G. B., Jr., Glenn, M., Bush, M., Hodgen, G. D., Graham, C. E., & Loriaux, D. L. (1978). Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*, 103(6), 2112-2118. doi:10.1210/endo-103-6-2112
- D'Ignazio, L., Bandarra, D., & Rocha, S. (2016). NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J*, 283(3), 413-424. doi:10.1111/febs.13578
- Dadey, D. Y., Kapoor, V., Khudanyan, A., Urano, F., Kim, A. H., Thotala, D., & Hallahan, D. E. (2016). The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. *Oncotarget*, 7(2), 2080-2092. doi:10.18632/oncotarget.6712
- Dagar, M., Singh, J. P., Dagar, G., Tyagi, R. K., & Bagchi, G. (2019). Phosphorylation of HSP90 by protein kinase A is essential for the nuclear translocation of androgen receptor. *J Biol Chem*, 294(22), 8699-8710. doi:10.1074/jbc.RA119.007420
- Dahl, H. C., Kanchwala, M., Thomas-Jardin, S. E., Sandhu, A., Kanumuri, P., Nawas, A. F., . . . Delk, N. A. (2020). Chronic IL-1 exposure drives LNCaP cells to evolve androgen and AR independence. *PLOS ONE*, 15(12), e0242970. doi:10.1371/journal.pone.0242970
- Dahle, L. K., Hill, E. G., & Holman, R. T. (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys*, 98, 253-261. doi:10.1016/0003-9861(62)90181-9
- Dai, C., Heemers, H., & Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(9). doi:10.1101/cshperspect.a030452
- Daniyal, M., Siddiqui, Z. A., Akram, M., Asif, H. M., Sultana, S., & Khan, A. (2014). Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(22), 9575-9578. doi:10.7314/apjcp.2014.15.22.9575
- de Bono, J. S., Guo, C., Gurel, B., De Marzo, A. M., Sfanos, K. S., Mani, R. S., . . . Alimonti, A. (2020). Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. *Nat Rev Cancer*, 20(8), 455-469. doi:10.1038/s41568-020-0267-9
- Debelec-Butuner, B., Alapinar, C., Varisli, L., Erbaykent-Tepedelen, B., Hamid, S. M., Gonen-Korkmaz, C., & Korkmaz, K. S. (2014). Inflammation-mediated abrogation of androgen signaling: an in vitro model of prostate cell inflammation. *Mol Carcinog*, 53(2), 85-97. doi:10.1002/mc.21948
- Debelec-Butuner, B., Ertunc, N., & Korkmaz, K. S. (2015). Inflammation contributes to NKX3.1 loss and augments DNA damage but does not alter the DNA damage response via increased SIRT1 expression. *J Inflamm (Lond)*, 12, 12. doi:10.1186/s12950-015-0057-4
- Debes, J. D., & Tindall, D. J. (2004). Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med*, 351(15), 1488-1490. doi:10.1056/NEJMp048178
- Del Vecchio, C. A., Feng, Y., Sokol, E. S., Tillman, E. J., Sanduja, S., Reinhardt, F., & Gupta, P. B. (2014). De-differentiation confers multidrug resistance via noncanonical PERK-Nrf2 signaling. *PLoS Biol*, 12(9), e1001945. doi:10.1371/journal.pbio.1001945

- Deng, L., Xiang, X., Yang, F., Xiao, D., Liu, K., Chen, Z., . . . Feng, G. (2017). Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates esophageal squamous cancer development. *Biochem Biophys Res Commun*, 490(2), 161-168. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.016
- Desai, M. M., Cacciamani, G. E., Gill, K., Zhang, J., Liu, L., Abreu, A., & Gill, I. S. (2022). Trends in Incidence of Metastatic Prostate Cancer in the US. *JAMA Netw Open*, 5(3), e222246. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.2246
- Dey, S., Sayers, C. M., Verginadis, II, Lehman, S. L., Cheng, Y., Cerniglia, G. J., . . . Koumenis, C. (2015). ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J Clin Invest*, 125(7), 2592-2608. doi:10.1172/JCI78031
- Direito, I., Fardilha, M., & Helguero, L. A. (2019). Contribution of the unfolded protein response to breast and prostate tissue homeostasis and its significance to cancer endocrine response. *Carcinogenesis*, 40(2), 203-215. doi:10.1093/carcin/bgy182
- Dodge, M. E., Wang, J., Guy, C., Rankin, S., Rahimtula, M., & Mearow, K. M. (2006). Stress-induced heat shock protein 27 expression and its role in dorsal root ganglion neuronal survival. *Brain Res*, 1068(1), 34-48. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.008
- Donovan, K. A., Walker, L. M., Wassersug, R. J., Thompson, L. M., & Robinson, J. W. (2015). Psychological effects of androgen-deprivation therapy on men with prostate cancer and their partners. *Cancer*, 121(24), 4286-4299. doi:10.1002/cncr.29672
- Dorff, T. B., Goldman, B., Pinski, J. K., Mack, P. C., Lara, P. N., Jr., Van Veldhuizen, P. J., Jr., . . . Hussain, M. H. (2010). Clinical and correlative results of SWOG S0354: a phase II trial of CNT0328 (siltuximab), a monoclonal antibody against interleukin-6, in chemotherapy-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 16(11), 3028-3034. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3122
- Doultinos, D., & Mills, I. (2020). The role of the androgen receptor as a driver and mitigator of cellular stress. *J Mol Endocrinol*, 65(2), R19-R33. doi:10.1530/JME-20-0057
- Durak, I., Canbolat, O., Kavutcu, M., Ozturk, H. S., & Yurtarslan, Z. (1996). Activities of total, cytoplasmic, and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *J Clin Lab Anal*, 10(1), 17-20. doi:10.1002/(SICI)1098-2825(1996)10:1<17::AID-JCLA4>3.0.CO;2-I
- Durak, I., Kavutcu, M., Kacmaz, M., Avci, A., Horasanli, E., Dikmen, B., . . . Ozturk, H. S. (2001). Effects of isoflurane on nitric oxide metabolism and oxidant status of guinea pig myocardium. *Acta Anaesthesiol Scand*, 45(1), 119-122. doi:10.1034/j.1399-6576.2001.450118.x
- Durak, I., Yurtarslan, Z., Canbolat, O., & Akyol, O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*, 214(1), 103-104. doi:10.1016/0009-8981(93)90307-p
- Eftekharzadeh, B., Banduseela, V. C., Chiesa, G., Martinez-Cristobal, P., Rauch, J. N., Nath, S. R., . . . Salvatella, X. (2019). Hsp70 and Hsp40 inhibit an inter-domain interaction

necessary for transcriptional activity in the androgen receptor. *Nat Commun*, 10(1), 3562. doi:10.1038/s41467-019-11594-y

Egger, S. E., Rumble, R. B., Armstrong, A. J., Morgan, T. M., Crispino, T., Cornford, P., . . . Beltran, H. (2020). Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol*, 38(13), 1474-1494. doi:10.1200/JCO.19.02768

Eisermann, K., Broderick, C. J., Bazarov, A., Moazam, M. M., & Fraizer, G. C. (2013). Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. *Mol Cancer*, 12, 7. doi:10.1186/1476-4598-12-7

Eklund, M., Jaderling, F., Discacciati, A., Bergman, M., Annerstedt, M., Aly, M., . . . consortium, S. (2021). MRI-Targeted or Standard Biopsy in Prostate Cancer Screening. *N Engl J Med*, 385(10), 908-920. doi:10.1056/NEJMoa2100852

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82(1), 70-77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6

Elses, M. E., Oh-Hohenhorst, S. J., Loser, A., Oing, C., Mutiara, S., Kocher, S., . . . Mansour, W. Y. (2020). Second-Generation Antiandrogen Therapy Radiosensitizes Prostate Cancer Regardless of Castration State through Inhibition of DNA Double Strand Break Repair. *Cancers (Basel)*, 12(9). doi:10.3390/cancers12092467

Epstein, J. I., Zelefsky, M. J., Sjoberg, D. D., Nelson, J. B., Egevad, L., Magi-Galluzzi, C., . . . Klein, E. A. (2016). A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*, 69(3), 428-435. doi:10.1016/j.eururo.2015.06.046

Ersoy, E. (2005). *Development of a spectrophotometric method for hydrogen peroxide analysis*. Üniversitesi, Şuradan ulaşılabilir Veri sağlayıcı Veritabanı ismi database.

Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., & Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), 959-967. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.024

Fernandez, E. V., Reece, K. M., Ley, A. M., Troutman, S. M., Sissung, T. M., Price, D. K., . . . Figg, W. D. (2015). Dual targeting of the androgen receptor and hypoxia-inducible factor 1alpha pathways synergistically inhibits castration-resistant prostate cancer cells. *Mol Pharmacol*, 87(6), 1006-1012. doi:10.1124/mol.114.097477

Ferrari, N., Granata, I., Capaia, M., Piccirillo, M., Guarracino, M. R., Vene, R., . . . Barboro, P. (2017). Adaptive phenotype drives resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Cell Commun Signal*, 15(1), 51. doi:10.1186/s12964-017-0206-x

Ferraro, S., Bussetti, M., & Panteghini, M. (2021). Serum Prostate-Specific Antigen Testing for Early Detection of Prostate Cancer: Managing the Gap between Clinical and Laboratory Practice. *Clin Chem*, 67(4), 602-609. doi:10.1093/clinchem/hvab002

Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic

voltammetry. *Biochim Biophys Acta*, 1721(1-3), 174-184. doi:10.1016/j.bbagen.2004.11.001

Fischer, A., & Smieško, M. (2020). Allosteric Binding Sites On Nuclear Receptors: Focus On Drug Efficacy and Selectivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 534. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/534>

Fizazi, K., De Bono, J. S., Flechon, A., Heidenreich, A., Voog, E., Davis, N. B., . . . Hudes, G. R. (2012). Randomised phase II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-IL-6 monoclonal antibody, in combination with mitoxantrone/prednisone versus mitoxantrone/prednisone alone in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Cancer*, 48(1), 85-93. doi:10.1016/j.ejca.2011.10.014

Food and Drug Administration, F. (2020, Son güncelleme tarihi). FDA approves liquid biopsy NGS companion diagnostic test for multiple cancers and biomarkers. Erişim sağlanan adres <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-liquid-biopsy-ngs-companion-diagnostic-test-multiple-cancers-and-biomarkers>

Fossati, N., Buffi, N. M., Haese, A., Stephan, C., Larcher, A., McNicholas, T., . . . Lazzeri, M. (2015). Preoperative Prostate-specific Antigen Isoform p2PSA and Its Derivatives, %p2PSA and Prostate Health Index, Predict Pathologic Outcomes in Patients Undergoing Radical Prostatectomy for Prostate Cancer: Results from a Multicentric European Prospective Study. *Eur Urol*, 68(1), 132-138. doi:10.1016/j.eururo.2014.07.034

Fruhbeck, G., Catalan, V., Rodriguez, A., Ramirez, B., Becerril, S., Salvador, J., . . . Gomez-Ambrosi, J. (2017). Involvement of the leptin-adiponectin axis in inflammation and oxidative stress in the metabolic syndrome. *Sci Rep*, 7(1), 6619. doi:10.1038/s41598-017-06997-0

Gao, W., Bohl, C. E., & Dalton, J. T. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev*, 105(9), 3352-3370. doi:10.1021/cr020456u

Gao, W., Wang, Y., Yu, S., Wang, Z., Ma, T., Chan, A. M., . . . Chan, F. L. (2022). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-NO signaling axis functions to promote the growth of prostate cancer stem-like cells. *Stem Cell Res Ther*, 13(1), 188. doi:10.1186/s13287-022-02864-6

Giampietri, C., Petrungaro, S., Conti, S., Facchiano, A., Filippini, A., & Ziparo, E. (2015). Cancer Microenvironment and Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Mediators Inflamm*, 2015, 417281. doi:10.1155/2015/417281

Gilbert, R., Tilling, K., Martin, R. M., Lane, J. A., Davis, M., Hamdy, F. C., . . . Metcalfe, C. (2018). Developing new age-specific prostate-specific antigen thresholds for testing for prostate cancer. *Cancer Causes Control*, 29(3), 383-388. doi:10.1007/s10552-018-1014-3

Giri, V. N., Hegarty, S. E., Hyatt, C., O'Leary, E., Garcia, J., Knudsen, K. E., . . . Gomella, L. G. (2019). Germline genetic testing for inherited prostate cancer in practice: Implications for genetic testing, precision therapy, and cascade testing. *Prostate*, 79(4), 333-339. doi:10.1002/pros.23739

Gleason, D. F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 50(3), 125-128.

Goldstein, M., & Kastan, M. B. (2015). The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu Rev Med*, 66, 129-143. doi:10.1146/annurev-med-081313-121208

Gomella, L. G. (2009). Effective testosterone suppression for prostate cancer: is there a best castration therapy? *Rev Urol*, 11(2), 52-60. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680526>

Gonen-Korkmaz, C., Sevin, G., Gokce, G., Arun, M. Z., Yildirim, G., Reel, B., . . . Ogut, D. (2014). Analysis of tumor necrosis factor alpha-induced and nuclear factor kappaB-silenced LNCaP prostate cancer cells by RT-qPCR. *Exp Ther Med*, 8(6), 1695-1700. doi:10.3892/etm.2014.2032

Gorman, A. M., Healy, S. J., Jager, R., & Samali, A. (2012). Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther*, 134(3), 306-316. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.02.003

Gorodetska, I., Kozeretska, I., & Dubrovskaya, A. (2019). BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer*, 10(9), 2109-2127. doi:10.7150/jca.30410

Gravis, G., Fizazi, K., Joly, F., Oudard, S., Priou, F., Esterni, B., . . . Soulie, M. (2013). Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 14(2), 149-158. doi:10.1016/S1470-2045(12)70560-0

Guan, W., Hu, J., Yang, L., Tan, P., Tang, Z., West, B. L., . . . Wu, L. (2019). Inhibition of TAMs improves the response to docetaxel in castration-resistant prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, 26(1), 131-140. doi:10.1530/ERC-18-0284

Guan, W., Li, F., Zhao, Z., Zhang, Z., Hu, J., & Zhang, Y. (2021). Tumor-Associated Macrophage Promotes the Survival of Cancer Cells upon Docetaxel Chemotherapy via the CSF1/CSF1R-CXCL12/CXCR4 Axis in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Genes*, 12(5), 773. doi:10.3390/genes12050773

Gui, B., Gui, F., Takai, T., Feng, C., Bai, X., Fazli, L., . . . Jia, L. (2019). Selective targeting of PARP-2 inhibits androgen receptor signaling and prostate cancer growth through disruption of FOXA1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(29), 14573-14582. doi:10.1073/pnas.1908547116

Ha, S., Ruoff, R., Kahoud, N., Franke, T. F., & Logan, S. K. (2011). Androgen receptor levels are upregulated by Akt in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 18(2), 245-255. doi:10.1530/ERC-10-0204

Halabi, S., Jiang, S., Terasawa, E., Garcia-Horton, V., Ayyagari, R., Waldeck, A. R., & Shore, N. (2021). Indirect Comparison of Darolutamide versus Apalutamide and

Enzalutamide for Nonmetastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Urol*, 206(2), 298-307. doi:10.1097/JU.0000000000001767

Hamamura, K., Minami, K., Tanjung, N., Wan, Q., Koizumi, M., Matsuura, N., . . . Yokota, H. (2014). Attenuation of malignant phenotypes of breast cancer cells through eIF2 α -mediated downregulation of Rac1 signaling. *Int J Oncol*, 44(6), 1980-1988. doi:10.3892/ijo.2014.2366

Hamilton, R. J., Goldberg, K. C., Platz, E. A., & Freedland, S. J. (2008). The influence of statin medications on prostate-specific antigen levels. *J Natl Cancer Inst*, 100(21), 1511-1518. doi:10.1093/jnci/djn362

Hanasand, M., Omdal, R., Norheim, K. B., Goransson, L. G., Brede, C., & Jonsson, G. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta*, 413(9-10), 901-906. doi:10.1016/j.cca.2012.01.038

Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., . . . Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11(3), 619-633. doi:10.1016/s1097-2765(03)00105-9

Hayashi, T., Fujita, K., Matsushita, M., & Nonomura, N. (2019). Main Inflammatory Cells and Potentials of Anti-Inflammatory Agents in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*, 11(8). doi:10.3390/cancers11081153

He, B., Kemppainen, J. A., Voegel, J. J., Gronemeyer, H., & Wilson, E. M. (1999). Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *J Biol Chem*, 274(52), 37219-37225. doi:10.1074/jbc.274.52.37219

He, F. (2011). BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Bio-protocol*, 1(5), e44. doi:10.21769/BioProtoc.44

Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Molecular Endocrinology*, 16(10), 2181-2187. doi:10.1210/me.2002-0070

Helminen, L. (2020). *Glucocorticoid receptor partially replaces androgen receptor signaling in enzalutamide-treated prostate cancer cells.* (Master Yüksek lisans tezi). Üniversitesi, Kuopio, Finland. Erişim sağlanan adres https://erepo.uef.fi/bitstream/handle/123456789/23379/urn_nbn_fi_uef-20201190.pdf?sequence=-1&isAllowed=y Şuradan ulaşılabilir Veri sağlayıcı Veritabanı ismi database.

Herczenik, E., & Gebbink, M. F. (2008). Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *FASEB J*, 22(7), 2115-2133. doi:10.1096/fj.07-099671

Herrero-Martin, G., Hoyer-Hansen, M., Garcia-Garcia, C., Fumarola, C., Farkas, T., Lopez-Rivas, A., & Jaattela, M. (2009). TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *EMBO J*, 28(6), 677-685. doi:10.1038/emboj.2009.8

Hessels, D., van Gils, M. P., van Hooij, O., Jannink, S. A., Witjes, J. A., Verhaegh, G. W., & Schalken, J. A. (2010). Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate*, 70(1), 10-16. doi:10.1002/pros.21032

Hetz, C., Chevet, E., & Oakes, S. A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol*, 17(7), 829-838. doi:10.1038/ncb3184

Hipp, M. S., Kasturi, P., & Hartl, F. U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(7), 421-435. doi:10.1038/s41580-019-0101-y

Hoeller, D., & Dikic, I. (2016). How the proteasome is degraded. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(47), 13266-13268. doi:10.1073/pnas.1616535113

Holcik, M. (2015). Could the eIF2alpha-Independent Translation Be the Achilles Heel of Cancer? *Front Oncol*, 5, 264. doi:10.3389/fonc.2015.00264

Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Chu, T. M., Wajsman, Z. L., Friedman, M., Papsidero, L., . . . Sandberg, A. A. (1980). The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res*, 37, 115-132. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7384082>

Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., . . . Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*, 43(4), 1809-1818. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6831420>

Hoshi, S., Meguro, S., Imai, H., Matsuoka, Y., Yoshida, Y., Onagi, A., . . . Kojima, Y. (2021). Upregulation of glucocorticoid receptor-mediated glucose transporter 4 in enzalutamide-resistant prostate cancer. *Cancer Sci*, 112(5), 1899-1910. doi:10.1111/cas.14865

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., . . . Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *nature*, 527(7578), 329-335. doi:10.1038/nature15756

Hsieh, T. C., & Chiao, J. W. (1995). Growth modulation of human prostatic cancer cells by interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Lett*, 95(1-2), 119-123. doi:10.1016/0304-3835(95)03876-x

Hsieh, T. C., Xu, W., & Chiao, J. W. (1995). Growth regulation and cellular changes during differentiation of human prostatic cancer LNCaP cells as induced by T lymphocyte-conditioned medium. *Exp Cell Res*, 218(1), 137-143. doi:10.1006/excr.1995.1140

Hu, C., Xu, L., Liang, S., Zhang, Z., Zhang, Y., & Zhang, F. (2016). Lentivirus-mediated shRNA targeting Nanog inhibits cell proliferation and attenuates cancer stem cell activities in breast cancer. *J Drug Target*, 24(5), 422-432. doi:10.3109/1061186X.2015.1082567

Hu, X. M., Li, Z. X., Lin, R. H., Shan, J. Q., Yu, Q. W., Wang, R. X., . . . Xiong, K. (2021). Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A

Categorical Comparison, A Prospective. *Front Cell Dev Biol*, 9, 634690. doi:10.3389/fcell.2021.634690

Hughes, D., & Mallucci, G. R. (2019). The unfolded protein response in neurodegenerative disorders - therapeutic modulation of the PERK pathway. *FEBS J*, 286(2), 342-355. doi:10.1111/febs.14422

Hunsucker, S. A., Magarotto, V., Matthews, J. A., Wang, M., Baladandayuthapani, V., Voorhees, P. M., . . . Orłowski, R. Z. (2009). Inhibition of Interleukin-6 Signaling with CNTO 328 Sensitizes Plasma Cell Dyscrasias to the Effects of Melphalan in Association with Suppression of Signaling through Protein Kinase B/Akt. *Blood*, 114(22), 1836. doi:<https://doi.org/10.1182/blood.V114.22.1836.1836>

Hussain, M., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., . . . de Bono, J. (2020). Survival with Olaparib in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 383(24), 2345-2357. doi:10.1056/NEJMoa2022485

Ittmann, M. (2018). Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(5). doi:10.1101/cshperspect.a030346

Iwata, T., Schultz, D., Hicks, J., Hubbard, G. K., Mutton, L. N., Lotan, T. L., . . . De Marzo, A. M. (2010). MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells. *PLOS ONE*, 5(2), e9427. doi:10.1371/journal.pone.0009427

Jannetti, S. A., Zeglis, B. M., Zalutsky, M. R., & Reiner, T. (2020). Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) Inhibitors and Radiation Therapy. *Front Pharmacol*, 11, 170. doi:10.3389/fphar.2020.00170

Jewer, M., Lee, L., Leibovitch, M., Zhang, G., Liu, J., Findlay, S. D., . . . Postovit, L. M. (2020). Translational control of breast cancer plasticity. *Nat Commun*, 11(1), 2498. doi:10.1038/s41467-020-16352-z

Jha, S. K., Rauniyar, K., Chronowska, E., Mattonet, K., Maina, E. W., Koistinen, H., . . . Jeltsch, M. (2019). KLK3/PSA and cathepsin D activate VEGF-C and VEGF-D. *Elife*, 8. doi:10.7554/eLife.44478

Ji, G., Yan, L., Liu, W., Qu, J., & Gu, A. (2013). OGG1 Ser326Cys polymorphism interacts with cigarette smoking to increase oxidative DNA damage in human sperm and the risk of male infertility. *Toxicol Lett*, 218(2), 144-149. doi:10.1016/j.toxlet.2013.01.017

Jian, Z., Li, K., Liu, L., Zhang, Y., Zhou, Z., Li, C., & Gao, T. (2011). Heme oxygenase-1 protects human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway. *J Invest Dermatol*, 131(7), 1420-1427. doi:10.1038/jid.2011.56

Jiang, Z., Jones, R., Liu, J. C., Deng, T., Robinson, T., Chung, P. E., . . . Zacksenhaus, E. (2011). RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. *Cell Cycle*, 10(10), 1563-1570. doi:10.4161/cc.10.10.15703

- JiaWei, Z., ChunXia, D., CunDong, L., Yang, L., JianKun, Y., HaiFeng, D., . . . MingKun, C. (2021). M2 subtype tumor associated macrophages (M2-TAMs) infiltration predicts poor response rate of immune checkpoint inhibitors treatment for prostate cancer. *Ann Med*, 53(1), 730-740. doi:10.1080/07853890.2021.1924396
- Jimenez-Panizo, A., Perez, P., Rojas, A. M., Fuentes-Prior, P., & Estebanez-Perpina, E. (2019). Non-canonical dimerization of the androgen receptor and other nuclear receptors: implications for human disease. *Endocr Relat Cancer*, 26(8), R479-R497. doi:10.1530/ERC-19-0132
- Jin, Y., & Saatcioglu, F. (2020). Targeting the Unfolded Protein Response in Hormone-Regulated Cancers. *Trends Cancer*, 6(2), 160-171. doi:10.1016/j.trecan.2019.12.001
- Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., . . . Schellhammer, P. F. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363(5), 411-422. doi:10.1056/NEJMoa1001294
- Karami, S., Young, H. A., & Henson, D. E. (2007). Earlier age at diagnosis: another dimension in cancer disparity? *Cancer Detect Prev*, 31(1), 29-34. doi:10.1016/j.cdp.2006.11.004
- Karan, D., & Dubey, S. (2016). From Inflammation to Prostate Cancer: The Role of Inflammasomes. *Adv Urol*, 2016, 3140372. doi:10.1155/2016/3140372
- Kasai, S., Yamazaki, H., Tanji, K., Engler, M. J., Matsumiya, T., & Itoh, K. (2019). Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control. *J Clin Biochem Nutr*, 64(1), 1-12. doi:10.3164/jcbn.18-37
- Kaufhold, S., & Bonavida, B. (2014). Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res*, 33, 62. doi:10.1186/s13046-014-0062-0
- Klein, E. A., & Silverman, R. (2008). Inflammation, infection, and prostate cancer. *Curr Opin Urol*, 18(3), 315-319. doi:10.1097/MOU.0b013e3282f9b3b7
- Knowles, H. J., Mole, D. R., Ratcliffe, P. J., & Harris, A. L. (2006). Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: effect of natural resistance-associated macrophage protein 1. *Cancer Res*, 66(5), 2600-2607. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-2351
- Koh, C. M., Bieberich, C. J., Dang, C. V., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S., & De Marzo, A. M. (2010). MYC and Prostate Cancer. *Genes Cancer*, 1(6), 617-628. doi:10.1177/1947601910379132
- Koken, T., Koca, B., Ozkurt, M., Erkasap, N., Kus, G., & Karalar, M. (2016). Apium graveolens Extract Inhibits Cell Proliferation and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Induces Apoptosis in the Human Prostatic Carcinoma Cell Line LNCaP. *J Med Food*, 19(12), 1166-1171. doi:10.1089/jmf.2016.0061

Krakowsky, Y., & Morgentaler, A. (2019). Risk of Testosterone Flare in the Era of the Saturation Model: One More Historical Myth. *Eur Urol Focus*, 5(1), 81-89. doi:10.1016/j.euf.2017.06.008

Kramer, G., Shiber, A., & Bukau, B. (2019). Mechanisms of Cotranslational Maturation of Newly Synthesized Proteins. *Annu Rev Biochem*, 88, 337-364. doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111717

Kregel, S., Szmulewitz, R. Z., & Vander Griend, D. J. (2014). The pluripotency factor Nanog is directly upregulated by the androgen receptor in prostate cancer cells. *Prostate*, 74(15), 1530-1543. doi:10.1002/pros.22870

Kristal, A. R., Till, C., Song, X., Tangen, C. M., Goodman, P. J., Neuhauser, M. L., . . . Klein, E. A. (2014). Plasma vitamin D and prostate cancer risk: results from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23(8), 1494-1504. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0115

Kroemer, G., Marino, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2), 280-293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023

Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu Rev Biochem*, 84, 435-464. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033955

Lamb, A. D., Warren, A. Y., & Neal, D. E. (2011). Pre-malignant Disease in the Prostate. In R. C. Fitzgerald (Ed.), *Pre-Invasive Disease: Pathogenesis and Clinical Management* (Baskı, pp. 467-491). Yayıncı: Yayın. (Reprinted from: Tekrar Baskı).

Lee, S. H., Johnson, D., Luong, R., & Sun, Z. (2015). Crosstalk between androgen and PI3K/AKT signaling pathways in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 290(5), 2759-2768. doi:10.1074/jbc.M114.607846

Lee, S. O., Pinder, E., Chun, J. Y., Lou, W., Sun, M., & Gao, A. C. (2008). Interleukin-4 stimulates androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. *Prostate*, 68(1), 85-91. doi:10.1002/pros.20691

Leinonen, K. A., Saramaki, O. R., Furusato, B., Kimura, T., Takahashi, H., Egawa, S., . . . Visakorpi, T. (2013). Loss of PTEN is associated with aggressive behavior in ERG-positive prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(12), 2333-2344. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0333-T

Lendinez-Cano, G., Ojeda-Claro, A. V., Gomez-Gomez, E., Morales Jimenez, P., Flores Martin, J., Dominguez, J. F., . . . Investigators, A.-P. (2021). Prospective study of diagnostic accuracy in the detection of high-grade prostate cancer in biopsy-naïve patients with clinical suspicion of prostate cancer who underwent the Select MDx test. *Prostate*, 81(12), 857-865. doi:10.1002/pros.24182

Leung, J., & Sadar, M. (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 8. doi:10.3389/fendo.2017.00002

- Leung, J. K., & Sadar, M. D. (2017). Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 2. doi:10.3389/fendo.2017.00002
- Li, B., Lu, W., & Chen, Z. (2014). Regulation of Androgen Receptor by E3 Ubiquitin Ligases: for More or Less. *Receptors Clin Investig*, 1(5). doi:<https://doi.org/10.14800/rci.122>
- Li, J., Fu, X., Cao, S., Li, J., Xing, S., Li, D., . . . Zhang, H. (2018). Membrane-associated androgen receptor (AR) potentiates its transcriptional activities by activating heat shock protein 27 (HSP27). *J Biol Chem*, 293(33), 12719-12729. doi:10.1074/jbc.RA118.003075
- Li, Y., Orahoske, C. M., Geldenhuys, W. J., Bhattarai, A., Sabbagh, A., Bobba, V., . . . Su, B. (2021). Small-Molecule HSP27 Inhibitor Abolishes Androgen Receptors in Glioblastoma. *J Med Chem*, 64(3), 1570-1583. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01537
- Lilja, H., Christensson, A., Dahlén, U., Matikainen, M. T., Nilsson, O., Pettersson, K., & Lövgren, T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem*, 37(9), 1618-1625.
- Lin, H. C., & Lin, J. Y. (2016). Immune Cell-Conditioned Media Suppress Prostate Cancer PC-3 Cell Growth Correlating With Decreased Proinflammatory/Anti-inflammatory Cytokine Ratios in the Media Using 5 Selected Crude Polysaccharides. *Integr Cancer Ther*, 15(4), NP13-NP25. doi:10.1177/1534735415627923
- Lin, N., & Simon, M. C. (2016). Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. *J Clin Invest*, 126(10), 3661-3671. doi:10.1172/JCI84426
- Lindorff-Larsen, K., Rogen, P., Paci, E., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2005). Protein folding and the organization of the protein topology universe. *Trends Biochem Sci*, 30(1), 13-19. doi:10.1016/j.tibs.2004.11.008
- Liu, C., Sheng, M., Lin, L., Li, H., Guo, S., Zhang, J., . . . Chen, H. (2020). NANOG regulates the proliferation of PCSCs via the TGF-beta1/SMAD pathway. *Open Med (Wars)*, 15(1), 841-849. doi:10.1515/med-2020-0221
- Locke, J. A., Guns, E. S., Lubik, A. A., Adomat, H. H., Hendy, S. C., Wood, C. A., . . . Nelson, C. C. (2008). Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*, 68(15), 6407-6415. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5997
- Loeb, S., Sanda, M. G., Broyles, D. L., Shin, S. S., Bangma, C. H., Wei, J. T., . . . Catalona, W. J. (2015). The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *J Urol*, 193(4), 1163-1169. doi:10.1016/j.juro.2014.10.121
- Logothetis, C., Aparicio, A., & Thompson, T. C. (2018). ER stress in prostate cancer: A therapeutically exploitable vulnerability? *Sci Transl Med*, 10(439). doi:10.1126/scitranslmed.aat3975

- Lotan, T. L., Carvalho, F. L., Peskoe, S. B., Hicks, J. L., Good, J., Fedor, H., . . . Berman, D. M. (2015). PTEN loss is associated with upgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy. *Mod Pathol*, 28(1), 128-137. doi:10.1038/modpathol.2014.85
- Lotan, T. L., Tomlins, S. A., Bismar, T. A., Van der Kwast, T. H., Grignon, D., Egevad, L., . . . Bubendorf, L. (2020). Report From the International Society of Urological Pathology (ISUP) Consultation Conference on Molecular Pathology of Urogenital Cancers. I. Molecular Biomarkers in Prostate Cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*, 44(7), e15-e29. doi:10.1097/pas.0000000000001450
- Luo, H., Rankin, G. O., Juliano, N., Jiang, B.-H., & Chen, Y. C. (2012). Kaempferol inhibits VEGF expression and in vitro angiogenesis through a novel ERK-NFκB-cMyc-p21 pathway. *Food chemistry*, 130(2), 321-328. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.045
- Luo, J., Wang, K., Yeh, S., Sun, Y., Liang, L., Xiao, Y., . . . Chang, C. (2019). LncRNA-p21 alters the antiandrogen enzalutamide-induced prostate cancer neuroendocrine differentiation via modulating the EZH2/STAT3 signaling. *Nat Commun*, 10(1), 2571. doi:10.1038/s41467-019-09784-9
- Lv, H., Zhu, C., Wei, W., Lv, X., Yu, Q., Deng, X., & Ci, X. (2020). Enhanced Keap1-Nrf2/Trx-1 axis by daphnetin protects against oxidative stress-driven hepatotoxicity via inhibiting ASK1/JNK and TxnIP/NLRP3 inflammasome activation. *Phytomedicine*, 71, 153241. doi:10.1016/j.phymed.2020.153241
- Lyublinskaya, O. G., Ivanova, J. S., Pugovkina, N. A., Kozhukharova, I. V., Kovaleva, Z. V., Shatrova, A. N., . . . Nikolsky, N. N. (2017). Redox environment in stem and differentiated cells: A quantitative approach. *Redox Biol*, 12, 758-769. doi:10.1016/j.redox.2017.04.016
- Madden, E., Logue, S. E., Healy, S. J., Manie, S., & Samali, A. (2019). The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biol Cell*, 111(1), 1-17. doi:10.1111/boc.201800050
- Maggi, M., Del Giudice, F., Falagario, U. G., Cocci, A., Russo, G. I., Di Mauro, M., . . . Busetto, G. M. (2021). SelectMDx and Multiparametric Magnetic Resonance Imaging of the Prostate for Men Undergoing Primary Prostate Biopsy: A Prospective Assessment in a Multi-Institutional Study. *Cancers (Basel)*, 13(9). doi:10.3390/cancers13092047
- Mahadevan, N. R., Rodvold, J., Sepulveda, H., Rossi, S., Drew, A. F., & Zanetti, M. (2011). Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(16), 6561-6566. doi:10.1073/pnas.1008942108
- Malekghasemi, S., Majidi, J., Baghbanzadeh, A., Abdolalizadeh, J., Baradaran, B., & Aghebati-Maleki, L. (2020). Tumor-Associated Macrophages: Protumoral Macrophages in Inflammatory Tumor Microenvironment. *Adv Pharm Bull*, 10(4), 556-565. doi:10.34172/apb.2020.066

Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*, 229(2), 176-185. doi:10.1002/path.4133

Mark, J. R., McDougall, C., & Giri, V. N. (2021). Genetic Testing Guidelines and Education of Health Care Providers Involved in Prostate Cancer Care. *Urol Clin North Am*, 48(3), 311-322. doi:10.1016/j.ucl.2021.03.003

Marmol, I., Virumbrales-Munoz, M., Quero, J., Sanchez-de-Diego, C., Fernandez, L., Ochoa, I., . . . Yoldi, M. J. R. (2017). Alkynyl gold(I) complex triggers necroptosis via ROS generation in colorectal carcinoma cells. *J Inorg Biochem*, 176, 123-133. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.08.020

Marques, R. B., Dits, N. F., Erkens-Schulze, S., van Ijcken, W. F., van Weerden, W. M., & Jenster, G. (2011). Modulation of androgen receptor signaling in hormonal therapy-resistant prostate cancer cell lines. *PLOS ONE*, 6(8), e23144. doi:10.1371/journal.pone.0023144

Martinez-Ariza, G., & Hulme, C. (2015). Recent advances in allosteric androgen receptor inhibitors for the potential treatment of castration-resistant prostate cancer. *Pharm Pat Anal*, 4(5), 387-402. doi:10.4155/ppa.15.20

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13. doi:10.12703/P6-13

Martinez, G., Duran-Aniotz, C., Cabral-Miranda, F., Vivar, J. P., & Hetz, C. (2017). Endoplasmic reticulum proteostasis impairment in aging. *Aging Cell*, 16(4), 615-623. doi:10.1111/acel.12599

Mathy, C. S., Mayr, T., Kurpig, S., Meisenheimer, M., Dolscheid-Pommerich, R. C., Stoffel-Wagner, B., . . . Bundschuh, R. A. (2021). Antihormone treatment differentially regulates PSA secretion, PSMA expression and (68)Ga-PSMA uptake in LNCaP cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 147(6), 1733-1743. doi:10.1007/s00432-021-03583-w

McEwan, I. J. (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer*, 11(2), 281-293. doi:10.1677/erc.0.0110281

Mei, W., Lin, X., Kapoor, A., Gu, Y., Zhao, K., & Tang, D. (2019). The Contributions of Prostate Cancer Stem Cells in Prostate Cancer Initiation and Metastasis. *Cancers (Basel)*, 11(4). doi:10.3390/cancers11040434

Mikolajczyk, S. D., Marks, L. S., Partin, A. W., & Rittenhouse, H. G. (2002). Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex. *Urology*, 59(6), 797-802. doi:10.1016/s0090-4295(01)01605-3

Miriyala, S., Spasojevic, I., Tovmasyan, A., Salvemini, D., Vujaskovic, Z., St Clair, D., & Batinic-Haberle, I. (2012). Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta*, 1822(5), 794-814. doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.002

- Miyake, H., Sato, R., Watanabe, K., Matsushita, Y., Watanabe, H., Motoyama, D., . . . Otsuka, A. (2021). Prognostic significance of third-line treatment for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: comparative assessments between cabazitaxel and other agents. *Int J Clin Oncol*, 26(9), 1745-1751. doi:10.1007/s10147-021-01956-2
- Mohler, J. L., Antonarakis, E. S., Armstrong, A. J., D'Amico, A. V., Davis, B. J., Dorff, T., . . . Higano, C. S. (2019). Prostate cancer, version 2.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17(5), 479-505.
- Moilanen, A. M., Riikonen, R., Oksala, R., Ravanti, L., Aho, E., Wohlfahrt, G., . . . Kallio, P. J. (2015). Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies. *Sci Rep*, 5, 12007. doi:10.1038/srep12007
- Morgan, T. O., Jacobsen, S. J., McCarthy, W. F., Jacobson, D. J., McLeod, D. G., & Moul, J. W. (1996). Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen in black men. *N Engl J Med*, 335(5), 304-310. doi:10.1056/NEJM199608013350502
- Muezzinoglu, T., Lekili, M., Eser, E., Uyanik, B. S., & Buyuksu, C. (2005). Population standards of prostate specific antigen values in men over 40: community based study in Turkey. *Int Urol Nephrol*, 37(2), 299-304. doi:10.1007/s11255-004-7976-y
- Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*, 79, 541-566. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034339
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, 3, 83-92. doi:10.2147/HP.S93413
- Nader, R., El Amm, J., & Aragon-Ching, J. B. (2018). Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J Androl*, 20(3), 221-229. doi:10.4103/aja.aja_40_17
- Nakai, K., & Tsuruta, D. (2021). What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? *Int J Mol Sci*, 22(19). doi:10.3390/ijms221910799
- Navone, N. M., Olive, M., Ozen, M., Davis, R., Troncoso, P., Tu, S. M., . . . Eschenbach, A. C. v. (1997). Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. *Clinical Cancer Research*, 3, 2493-2500.
- Nelson, E. C., Evans, C. P., Mack, P. C., Devere-White, R. W., & Lara, P. N., Jr. (2007). Inhibition of Akt pathways in the treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 10(4), 331-339. doi:10.1038/sj.pcan.4500974
- Nguyen, D. P., Li, J., & Tewari, A. K. (2014). Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int*, 113(6), 986-992. doi:10.1111/bju.12452

Nguyen, H., Conn, C. S., Kye, Y., Xue, L., Forester, C. M., Cowan, J. E., . . . Ruggero, D. (2018). Development of a stress response therapy targeting aggressive prostate cancer. *Sci Transl Med*, 10(439). doi:10.1126/scitranslmed.aar2036

Nonomura, N., Takayama, H., Nakayama, M., Nakai, Y., Kawashima, A., Mukai, M., . . . Tsujimura, A. (2011). Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *BJU Int*, 107(12), 1918-1922. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09804.x

Nouri, M., Ratther, E., Stylianou, N., Nelson, C. C., Hollier, B. G., & Williams, E. D. (2014). Androgen-targeted therapy-induced epithelial mesenchymal plasticity and neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer: an opportunity for intervention. *Front Oncol*, 4, 370. doi:10.3389/fonc.2014.00370

Oakey, R. E. (1988). *Steroid hormones: A practical approach*: Edited by B Green and R E Leake. pp 278. IRL Press, Oxford. 1987. £17 ISBN 0-947946-53-5. *Biochemical Education*, 16(1), 53-53. doi:[https://doi.org/10.1016/0307-4412\(88\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0307-4412(88)90038-6)

Obacz, J., Avril, T., Le Reste, P. J., Urra, H., Quillien, V., Hetz, C., & Chevet, E. (2017). Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Sci Signal*, 10(470). doi:10.1126/scisignal.aal2323

Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Chute, C. G., Guess, H. A., Girman, C. J., Panser, L. A., & Lieber, M. M. (1993). Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*, 270(7), 860-864. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688054>

Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Chute, C. G., Guess, H. A., Girman, C. J., Panser, L. A., & Lieber, M. M. (1993). Serum Prostate-Specific Antigen in a Community-Based Population of Healthy Men: Establishment of Age-Specific Reference Ranges. *JAMA*, 270(7), 860-864. doi:10.1001/jama.1993.03510070082041

Ostergren, P. B., Kistorp, C., Fode, M., Henderson, J., Bennedbaek, F. N., Faber, J., & Sonksen, J. (2017). Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists are Superior to Subcapsular Orchiectomy in Lowering Testosterone Levels of Men with Prostate Cancer: Results from a Randomized Clinical Trial. *J Urol*, 197(6), 1441-1447. doi:10.1016/j.juro.2016.12.003

Ozgur, E., Celik, A. I., Darendeliler, E., & Gezer, U. (2017). PCA3 Silencing Sensitizes Prostate Cancer Cells to Enzalutamide-mediated Androgen Receptor Blockade. *Anticancer Res*, 37(7), 3631-3637. doi:10.21873/anticancer.11733

Pachikov, A. N., Gough, R. R., Christy, C. E., Morris, M. E., Casey, C. A., LaGrange, C. A., . . . Petrosyan, A. (2021). The non-canonical mechanism of ER stress-mediated progression of prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1), 289. doi:10.1186/s13046-021-02066-7

Page, E. C., Bancroft, E. K., Brook, M. N., Assel, M., Hassan Al Battat, M., Thomas, S., . . . Eeles, R. A. (2019). Interim Results from the IMPACT Study: Evidence for Prostate-

specific Antigen Screening in BRCA2 Mutation Carriers. *European Urology*, 76(6), 831-842. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.019>

Page, E. C., Bancroft, E. K., Brook, M. N., Assel, M., Hassan Al Battat, M., Thomas, S., . . . Eeles, R. A. (2019). Interim Results from the IMPACT Study: Evidence for Prostate-specific Antigen Screening in BRCA2 Mutation Carriers. *Eur Urol*, 76(6), 831-842. doi:10.1016/j.eururo.2019.08.019

Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70(1), 158-169. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6066618>

Pagliarulo, V., Bracarda, S., Eisenberger, M. A., Mottet, N., Schroder, F. H., Sternberg, C. N., & Studer, U. E. (2012). Contemporary role of androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Eur Urol*, 61(1), 11-25. doi:10.1016/j.eururo.2011.08.026

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Rep*, 17(10), 1374-1395. doi:10.15252/embr.201642195

Palapattu, G. S., Sutcliffe, S., Bastian, P. J., Platz, E. A., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. (2005). Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*, 26(7), 1170-1181. doi:10.1093/carcin/bgh317

Palma, A., Jarrah, A. S., Tieri, P., Cesareni, G., & Castiglione, F. (2018). Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States. *Front Physiol*, 9, 1659. doi:10.3389/fphys.2018.01659

Papanikolaou, S., Vourda, A., Syggelos, S., & Gyftopoulos, K. (2021). Cell Plasticity and Prostate Cancer: The Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression, Invasion, Metastasis and Cancer Therapy Resistance. *Cancers (Basel)*, 13(11). doi:10.3390/cancers13112795

Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*, 56(1), 45-50. doi:10.1007/s00011-007-6115-5

Partin, A. W., Criley, S. R., Subong, E. N. P., Zincke, H., Walsh, P. C., & Oesterling, J. E. (1996). Standard Versus Age-Specific Prostate Specific Antigen Reference Ranges Among Men With Clinically Localized Prostate Cancer: A Pathological Analysis. *The Journal of Urology*, 155(4), 1336-1339. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)66260-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)66260-8)

Partin, A. W., Hanks, G. E., Klein, E. A., Moul, J. W., Nelson, W. G., & Scher, H. I. (2002). Prostate-specific antigen as a marker of disease activity in prostate cancer. *Oncology (Williston Park)*, 16(8), 1024-1038, 1042; discussion 1042, 1047-1028, 1051.

Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., . . . Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*, 52(2), 192-203. doi:10.1038/s12276-020-0384-2

- Perrotta, C., Cervia, D., Di Renzo, I., Moscheni, C., Bassi, M. T., Campana, L., . . . Clementi, E. (2018). Nitric Oxide Generated by Tumor-Associated Macrophages Is Responsible for Cancer Resistance to Cisplatin and Correlated With Syntaxin 4 and Acid Sphingomyelinase Inhibition. *Front Immunol*, 9, 1186. doi:10.3389/fimmu.2018.01186
- Porta, C., Riboldi, E., Ippolito, A., & Sica, A. (2015). Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin Immunol*, 27(4), 237-248. doi:10.1016/j.smim.2015.10.003
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., . . . Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 7(1), 9. doi:10.1038/s41572-020-00243-0
- Ricote, M., Garcia-Tunon, I., Fraile, B., Fernandez, C., Aller, P., Paniagua, R., & Royuela, M. (2006). P38 MAPK protects against TNF-alpha-provoked apoptosis in LNCaP prostatic cancer cells. *Apoptosis*, 11(11), 1969-1975. doi:10.1007/s10495-006-0086-9
- Robichaud, N., & Sonenberg, N. (2017). Translational control and the cancer cell response to stress. *Curr Opin Cell Biol*, 45, 102-109. doi:10.1016/j.ceb.2017.05.007
- Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y. M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J. M., . . . Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell*, 162(2), 454. doi:10.1016/j.cell.2015.06.053
- Rodvold, J. J., Chiu, K. T., Hiramatsu, N., Nussbacher, J. K., Galimberti, V., Mahadevan, N. R., . . . Zanetti, M. (2017). Intercellular transmission of the unfolded protein response promotes survival and drug resistance in cancer cells. *Sci Signal*, 10(482). doi:10.1126/scisignal.aah7177
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273(10), 5858-5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858
- Rosty, C., Walsh, M. D., Lindor, N. M., Thibodeau, S. N., Mundt, E., Gallinger, S., . . . Buchanan, D. D. (2014). High prevalence of mismatch repair deficiency in prostate cancers diagnosed in mismatch repair gene mutation carriers from the colon cancer family registry. *Fam Cancer*, 13(4), 573-582. doi:10.1007/s10689-014-9744-1
- Roviello, G., Cappelletti, M. R., Zanotti, L., Gobbi, A., Senti, C., Bottini, A., . . . Generali, D. (2016). Targeting the androgenic pathway in elderly patients with castration-resistant prostate cancer: A meta-analysis of randomized trials. *Medicine (Baltimore)*, 95(43), e4636. doi:10.1097/MD.0000000000004636
- Rundle, A., & Neugut, A. I. (2008). Obesity and screening PSA levels among men undergoing an annual physical exam. *Prostate*, 68(4), 373-380. doi:10.1002/pros.20704
- Ryan, C. J., Smith, M. R., de Bono, J. S., Molina, A., Logothetis, C. J., de Souza, P., . . . Investigators, C.-A.-. (2013). Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med*, 368(2), 138-148. doi:10.1056/NEJMoa1209096

- Salami, S. S., Hovelson, D. H., Kaplan, J. B., Mathieu, R., Udager, A. M., Curci, N. E., . . . Palapattu, G. S. (2018). Transcriptomic heterogeneity in multifocal prostate cancer. *JCI Insight*, 3(21). doi:10.1172/jci.insight.123468
- Sampson, N., Neuwirt, H., Puhr, M., Klocker, H., & Eder, I. E. (2013). In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 20(2), R49-64. doi:10.1530/ERC-12-0401
- Sanchez-Ortiz, R. F., Troncoso, P., Babaian, R. J., Lloreta, J., Johnston, D. A., & Pettaway, C. A. (2006). African-American men with nonpalpable prostate cancer exhibit greater tumor volume than matched white men. *Cancer*, 107(1), 75-82. doi:10.1002/cncr.21954
- Santos, A. L., Sinha, S., & Lindner, A. B. (2018). The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New Insights on Aging and Aging-Related Diseases from Eukaryotic and Prokaryotic Model Organisms. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 1941285. doi:10.1155/2018/1941285
- Sathianathan, N. J., Philippou, Y. A., Kuntz, G. M., Konety, B. R., Gupta, S., Lamb, A. D., & Dahm, P. (2018). Taxane-based chemohormonal therapy for metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD012816. doi:10.1002/14651858.CD012816.pub2
- Schauer, I. G., & Rowley, D. R. (2011). The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*, 82(4-5), 200-210. doi:10.1016/j.diff.2011.05.007
- Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E. S., Gilligan, L. C., Taylor, A. E., Arlt, W., . . . Storbeck, K. H. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 194, 105439. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105439
- Scholz, C. C., & Taylor, C. T. (2013). Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr Opin Pharmacol*, 13(4), 646-653. doi:10.1016/j.coph.2013.04.009
- Schroeder, A., Herrmann, A., Cherryholmes, G., Kowolik, C., Buettner, R., Pal, S., . . . Jove, R. (2014). Loss of androgen receptor expression promotes a stem-like cell phenotype in prostate cancer through STAT3 signaling. *Cancer Res*, 74(4), 1227-1237. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0594
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *nature*, 404(6779), 770-774. doi:10.1038/35008096
- Scott, T. L., Rangaswamy, S., Wicker, C. A., & Izumi, T. (2014). Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. *Antioxid Redox Signal*, 20(4), 708-726. doi:10.1089/ars.2013.5529
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(11), 698-714. doi:10.1038/s41580-019-0152-0

Sengupta, S., Sevigny, C. M., Bhattacharya, P., Jordan, V. C., & Clarke, R. (2019). Estrogen-Induced Apoptosis in Breast Cancers Is Phenocopied by Blocking Dephosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha (eIF2alpha) Protein. *Mol Cancer Res*, 17(4), 918-928. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-0481

Sezikli, Y. (2016). *U-937 ve THP-1 hücrelerinin diferansiyasyonu ve polarizasyonunda SIK genlerinin rolü*. Üniversitesi, Şuradan ulaşılabilir Veri sağlayıcı Veritabanı ismi database.

Sfanos, K. S., & De Marzo, A. M. (2012). Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*, 60(1), 199-215. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04033.x

Sharma, D. K., Bressler, K., Patel, H., Balasingam, N., & Thakor, N. (2016). Role of Eukaryotic Initiation Factors during Cellular Stress and Cancer Progression. *J Nucleic Acids*, 2016, 8235121. doi:10.1155/2016/8235121

Sharp, B. M. (2013). *Conversion of the U937 Monocyte into "Macrophage-like" Populations Exhibiting M1 or M2 Characteristics*. (text). Üniversitesi, Erişim sağlanan adres
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddu&AN=AAB74F9E7D543910&lang=tr&site=ehost-live> Şuradan ulaşılabilir Veri sağlayıcı Veritabanı ismi database.

Shen, W., Xie, J., Zhao, S., Du, R., Luo, X., He, H., . . . Luo, Y. (2018). ICAM3 mediates inflammatory signaling to promote cancer cell stemness. *Cancer Lett*, 422, 29-43. doi:10.1016/j.canlet.2018.02.034

Shen, Y., Wang, Y., Fu, Z., Ma, Q., Song, Y., Fang, L., & Chen, L. (2021). UPR attenuates the proinflammatory effect of HPDLF on macrophage polarization. *Cell Stress Chaperones*, 26(6), 937-944. doi:10.1007/s12192-021-01234-0

Sheng, X., Arnoldussen, Y. J., Storm, M., Tesikova, M., Nenseth, H. Z., Zhao, S., . . . Saatcioglu, F. (2015). Divergent androgen regulation of unfolded protein response pathways drives prostate cancer. *EMBO Mol Med*, 7(6), 788-801. doi:10.15252/emmm.201404509

Sheng, X., Nenseth, H. Z., Qu, S., Kuzu, O. F., Frahnnow, T., Simon, L., . . . Saatcioglu, F. (2019). IRE1alpha-XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nat Commun*, 10(1), 323. doi:10.1038/s41467-018-08152-3

Shiota, M., Yokomizo, A., & Naito, S. (2011). Oxidative stress and androgen receptor signaling in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Free Radic Biol Med*, 51(7), 1320-1328. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.011

Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Inokuchi, J., Kashiwagi, E., Masubuchi, D., . . . Naito, S. (2010). Castration resistance of prostate cancer cells caused by castration-induced oxidative stress through Twist1 and androgen receptor overexpression. *Oncogene*, 29(2), 237-250. doi:10.1038/onc.2009.322

Shore, N. D., Saad, F., Cookson, M. S., George, D. J., Saltzstein, D. R., Tutrone, R., . . . Investigators, H. S. (2020). Oral Relugolix for Androgen-Deprivation Therapy in

Advanced Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 382(23), 2187-2196. doi:10.1056/NEJMoa2004325

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 70(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21590

Sikkeland, J., Ng, M. Y. W., Nenseth, H. Z., Unal, B., Qu, S., Jin, Y., . . . Saatcioglu, F. (2022). STAMP2 suppresses autophagy in prostate cancer cells by modulating the integrated stress response pathway. *Am J Cancer Res*, 12(1), 327-336. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35141021>

Singer, E. A., Palapattu, G. S., & van Wijngaarden, E. (2008). Prostate-specific antigen levels in relation to consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen: results from the 2001-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. *Cancer*, 113(8), 2053-2057. doi:10.1002/cncr.23806

Singha, P. K., Pandeswara, S., Geng, H., Lan, R., Venkatachalam, M. A., & Saikumar, P. (2014). TGF-beta induced TMEPAI/PMEPA1 inhibits canonical Smad signaling through R-Smad sequestration and promotes non-canonical PI3K/Akt signaling by reducing PTEN in triple negative breast cancer. *Genes Cancer*, 5(9-10), 320-336. doi:10.18632/genesandcancer.30

Siwecka, N., Rozpedek, W., Pytel, D., Wawrzynkiewicz, A., Dziki, A., Dziki, L., . . . Majsterek, I. (2019). Dual role of Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Unfolded Protein Response Signaling Pathway in Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*, 20(18). doi:10.3390/ijms20184354

Small, E. J., Schellhammer, P. F., Higano, C. S., Redfern, C. H., Nemunaitis, J. J., Valone, F. H., . . . Hershsberg, R. M. (2006). Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*, 24(19), 3089-3094. doi:10.1200/jco.2005.04.5252

Smith, D. S., & Catalona, W. J. (1994). Rate of change in serum prostate specific antigen levels as a method for prostate cancer detection. *J Urol*, 152(4), 1163-1167. doi:10.1016/s0022-5347(17)32528-4

Smith, M. R., Saad, F., Chowdhury, S., Oudard, S., Hadaschik, B. A., Graff, J. N., . . . Small, E. J. (2021). Apalutamide and Overall Survival in Prostate Cancer. *Eur Urol*, 79(1), 150-158. doi:10.1016/j.eururo.2020.08.011

Smith, M. R., Saad, F., Chowdhury, S., Oudard, S., Hadaschik, B. A., Graff, J. N., . . . Investigators, S. (2018). Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 378(15), 1408-1418. doi:10.1056/NEJMoa1715546

Sokoll, L. J., Sanda, M. G., Feng, Z., Kagan, J., Mizrahi, I. A., Broyles, D. L., . . . Chan, D. W. (2010). A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(5), 1193-1200. doi:10.1158/1055-9965.Epi-10-0007

Sommer, U., Siciliano, T., Ebersbach, C., Beier, A. K., Stope, M. B., Johrens, K., . . . Erb, H. H. H. (2022). Impact of Androgen Receptor Activity on Prostate-Specific Membrane Antigen Expression in Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 23(3). doi:10.3390/ijms23031046

Song, W., & Khera, M. (2014). Physiological normal levels of androgen inhibit proliferation of prostate cancer cells in vitro. *Asian J Androl*, 16(6), 864-868. doi:10.4103/1008-682x.129132

Soundararajan, R., Paranjape, A. N., Maity, S., Aparicio, A., & Mani, S. A. (2018). EMT, stemness and tumor plasticity in aggressive variant neuroendocrine prostate cancers. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1870(2), 229-238. doi:10.1016/j.bbcan.2018.06.006

Spilka, R., Ernst, C., Mehta, A. K., & Haybaeck, J. (2013). Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer Lett*, 340(1), 9-21. doi:10.1016/j.canlet.2013.06.019

Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*, 25, 101084. doi:10.1016/j.redox.2018.101084

St Hill, C. A., & Lutfiyya, M. N. (2015). An epidemiological analysis of potential associations between C-reactive protein, inflammation, and prostate cancer in the male US population using the 2009-2010 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) data. *Front Chem*, 3, 55. doi:10.3389/fchem.2015.00055

Stark, T., Livas, L., & Kyprianou, N. (2015). Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *Transl Androl Urol*, 4(4), 455-463. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2015.04.12

Stephan, C., Stroebel, G., Heinau, M., Lenz, A., Roemer, A., Lein, M., . . . Jung, K. (2005). The ratio of prostate-specific antigen (PSA) to prostate volume (PSA density) as a parameter to improve the detection of prostate carcinoma in PSA values in the range of < 4 ng/mL. *Cancer*, 104(5), 993-1003. doi:10.1002/cncr.21267

Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discov*, 5(10), 1024-1039. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0507

Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blazquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*, 120(3), 159-167. doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005

Storm, M., Sheng, X., Arnoldussen, Y. J., & Saatcioglu, F. (2016). Prostate cancer and the unfolded protein response. *Oncotarget*, 7(33), 54051-54066. doi:10.18632/oncotarget.9912

Streicher, J. M. (2019). The Role of Heat Shock Proteins in Regulating Receptor Signal Transduction. *Mol Pharmacol*, 95(5), 468-474. doi:10.1124/mol.118.114652

Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3 B 1-A3 B 3. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111

Stutzbach, L. D., Xie, S. X., Naj, A. C., Albin, R., Gilman, S., Lee, V. M., . . . Schellenberg, G. D. (2013). The unfolded protein response is activated in disease-affected brain regions in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 1, 31. doi:10.1186/2051-5960-1-31

Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34(3), 497-500. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349599>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. doi:10.3322/caac.21660

Sunila, E. S., Hamsa, T. P., & Kuttan, G. (2011). Effect of Thuja occidentalis and its polysaccharide on cell-mediated immune responses and cytokine levels of metastatic tumor-bearing animals. *Pharm Biol*, 49(10), 1065-1073. doi:10.3109/13880209.2011.565351

Sutcliffe, S., & Pontari, M. A. (2016). Chapter 2 - Inflammation and Infection in the Etiology of Prostate Cancer. In J. H. Mydlo & C. J. Godec (Eds.), *Prostate Cancer (Second Edition)* (Baskı, pp. 13-20). Yayıncı: Yayıncı. (Reprinted from: Tekrar Baskı).

Tameire, F., Verginadis, II, & Koumenis, C. (2015). Cell intrinsic and extrinsic activators of the unfolded protein response in cancer: Mechanisms and targets for therapy. *Semin Cancer Biol*, 33, 3-15. doi:10.1016/j.semcancer.2015.04.002

Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., . . . Investigators, T. A. X. (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*, 351(15), 1502-1512. doi:10.1056/NEJMoa040720

Tascioglu Aliyev, A., Panieri, E., Stepanic, V., Gurer-Orhan, H., & Saso, L. (2021). Involvement of NRF2 in Breast Cancer and Possible Therapeutical Role of Polyphenols and Melatonin. *Molecules*, 26(7). doi:10.3390/molecules26071853

Taskin, A., Ulus, H., Taskin, S., & Tarakçıoglu, M. (2020). Tetrazolium Bazlı Sitotoksikite Testleri Her Zaman Doğru Sonuçları Yansıtmayabilir. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(1), 6-12. doi:10.35440/hutfd.600652

Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B. S., . . . Gerald, W. L. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, 18(1), 11-22. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026

Terakawa, T., Miyake, H., Furukawa, J., Ettinger, S. L., Gleave, M. E., & Fujisawa, M. (2009). Enhanced sensitivity to androgen withdrawal due to overexpression of interleukin-

6 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells. *Br J Cancer*, 101(10), 1731-1739. doi:10.1038/sj.bjc.6605358

Teske, B. F., Wek, S. A., Bunpo, P., Cundiff, J. K., McClintick, J. N., Anthony, T. G., & Wek, R. C. (2011). The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 22(22), 4390-4405. doi:10.1091/mbc.E11-06-0510

Thakor, N., & Holcik, M. (2012). IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2 α -independent manner during stress. *Nucleic Acids Res*, 40(2), 541-552. doi:10.1093/nar/gkr701

Thalmann, G. N., Anezinis, P. E., Chang, S. M., Zhau, H. E., Kim, E. E., Hopwood, V. L., . . . Chung, L. W. (1994). Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res*, 54(10), 2577-2581. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8168083>

Thalmann, G. N., Sikes, R. A., Wu, T. T., Degeorges, A., Chang, S. M., Ozen, M., . . . Chung, L. W. (2000). LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis. *Prostate*, 44(2), 91-103 Jul 101;144(102). doi:10.1002/1097-0045(20000701)44:2<91::aid-pros1>3.0.co;2-l

Titus, M. A., Gregory, C. W., Ford, O. H., 3rd, Schell, M. J., Maygarden, S. J., & Mohler, J. L. (2005). Steroid 5 α -reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 11(12), 4365-4371. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0738

Tran, C., Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., . . . Sawyers, C. L. (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, 324(5928), 787-790. doi:10.1126/science.1168175

Triner, D., & Shah, Y. M. (2016). Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest*, 126(10), 3689-3698. doi:10.1172/JCI84430

Troyer, D. A., Jamaspishvili, T., Wei, W., Feng, Z., Good, J., Hawley, S., . . . Squire, J. A. (2015). A multicenter study shows PTEN deletion is strongly associated with seminal vesicle involvement and extracapsular extension in localized prostate cancer. *Prostate*, 75(11), 1206-1215. doi:10.1002/pros.23003

Trzeciak, A. R., Nyaga, S. G., Jaruga, P., Lohani, A., Dizdaroglu, M., & Evans, M. K. (2004). Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis*, 25(8), 1359-1370. doi:10.1093/carcin/bgh144

Tsao, C. W., Li, J. S., Lin, Y. W., Wu, S. T., Cha, T. L., & Liu, C. Y. (2021). Regulation of carcinogenesis and mediation through Wnt/ β -catenin signaling by 3,3'-diindolylmethane in an enzalutamide-resistant prostate cancer cell line. *Sci Rep*, 11(1), 1239. doi:10.1038/s41598-020-80519-3

Ungefroren, H., Sebens, S., Seidl, D., Lehnert, H., & Hass, R. (2011). Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal*, 9, 18. doi:10.1186/1478-811X-9-18

Urrea, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E., & Hetz, C. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer*, 2(5), 252-262. doi:10.1016/j.trecan.2016.03.007

Van Nieuwenhove, S., Van Damme, J., Padhani, A. R., Vandecaveye, V., Tombal, B., Wuts, J., . . . Lecouvet, F. E. (2022). Whole-body magnetic resonance imaging for prostate cancer assessment: Current status and future directions. *J Magn Reson Imaging*, 55(3), 653-680. doi:10.1002/jmri.27485

Vander Griend, D. J., Litvinov, I. V., & Isaacs, J. T. (2014). Conversion of androgen receptor signaling from a growth suppressor in normal prostate epithelial cells to an oncogene in prostate cancer cells involves a gain of function in c-Myc regulation. *Int J Biol Sci*, 10(6), 627-642. doi:10.7150/ijbs.8756

Vaupel, P., & Mayer, A. (2014). Hypoxia in tumors: pathogenesis-related classification, characterization of hypoxia subtypes, and associated biological and clinical implications. *Adv Exp Med Biol*, 812, 19-24. doi:10.1007/978-1-4939-0620-8_3

Velazquez-Caldelas, T. E., Alcala-Corona, S. A., Espinal-Enriquez, J., & Hernandez-Lemus, E. (2019). Unveiling the Link Between Inflammation and Adaptive Immunity in Breast Cancer. *Front Immunol*, 10, 56. doi:10.3389/fimmu.2019.00056

Venkatachalam, S., McFarland, T. R., Agarwal, N., & Swami, U. (2021). Immune Checkpoint Inhibitors in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(9). doi:10.3390/cancers13092187

Verma, S., Shankar, E., Kalayci, F. N. C., Mukunda, A., Alassfar, M., Singh, V., . . . Gupta, S. (2020). Androgen Deprivation Induces Transcriptional Reprogramming in Prostate Cancer Cells to Develop Stem Cell-Like Characteristics. *Int J Mol Sci*, 21(24). doi:10.3390/ijms21249568

Vinay Kumar, A. K. A. J. C. A. (2015). *Robbins and Cotran's Pathological Basis of Disease* (Vol. 2). Yayınlandığı Yer: Yayıncı.

Vo, B. T., Morton, D., Jr., Komaragiri, S., Millena, A. C., Leath, C., & Khan, S. A. (2013). TGF-beta effects on prostate cancer cell migration and invasion are mediated by PGE2 through activation of PI3K/AKT/mTOR pathway. *Endocrinology*, 154(5), 1768-1779. doi:10.1210/en.2012-2074

Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086. doi:10.1126/science.1209038

Wang, D., Montgomery, R. B., Schmidt, L. J., Mostaghel, E. A., Huang, H., Nelson, P. S., & Tindall, D. J. (2009). Reduced tumor necrosis factor receptor-associated death domain expression is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res*, 69(24), 9448-9456. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1903

Wang, G., Liu, X. M., Kreis, W., & Budman, D. R. (1997). Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between

androgen receptor and steroid receptor-binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells. *Cancer Res*, 57(4), 714-719.

Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol*, 5, 614. doi:10.3389/fimmu.2014.00614

Wegiel, B., Bjartell, A., Culig, Z., & Persson, J. L. (2008). Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer*, 122(7), 1521-1529. doi:10.1002/ijc.23261

Wei, C., Yang, X., Liu, N., Geng, J., Tai, Y., Sun, Z., . . . Zhong, H. (2019). Tumor Microenvironment Regulation by the Endoplasmic Reticulum Stress Transmission Mediator Golgi Protein 73 in Mice. *Hepatology*, 70(3), 851-870. doi:10.1002/hep.30549

Weisser, S. B., McLarren, K. W., Kuroda, E., & Sly, L. M. (2013). Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages. *Methods Mol Biol*, 946, 225-239. doi:10.1007/978-1-62703-128-8_14

Werny, D. M., Thompson, T., Saraiya, M., Freedman, D., Kottiri, B. J., German, R. R., & Wener, M. (2007). Obesity is negatively associated with prostate-specific antigen in U.S. men, 2001-2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(1), 70-76. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0588

Wesierska-Gadek, J., Schreiner, T., Maurer, M., Waringer, A., & Ranftler, C. (2007). Phenol red in the culture medium strongly affects the susceptibility of human MCF-7 cells to roscovitine. *Cell Mol Biol Lett*, 12(2), 280-293. doi:10.2478/s11658-007-0002-5

Whongsiri, P., Pimratana, C., Wijitsettakul, U., Sanpavat, A., Jindatip, D., Hoffmann, M. J., . . . Boonla, C. (2019). Oxidative stress and LINE-1 reactivation in bladder cancer are epigenetically linked through active chromatin formation. *Free Radic Biol Med*, 134, 419-428. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.031

Wilmer, J. W. G. M., Woutersen, R. A., Appelman, L. M., Leeman, W. R., & Feron, V. J. (1989). Subchronic (13-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-hour intermittent versus 8-hour continuous exposures. *Toxicology Letters*, 47(3), 287-293. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-4274\(89\)90147-1](https://doi.org/10.1016/0378-4274(89)90147-1)

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., . . . Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, 49(5), 1304-1313. doi:10.1038/ki.1996.186

Wong, C. P., Bray, T. M., & Ho, E. (2009). Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. *Cancer Lett*, 276(1), 38-46. doi:10.1016/j.canlet.2008.10.025

Wu, H. C., Hsieh, J. T., Gleave, M. E., Brown, N. M., Pathak, S., & Chung, L. W. (1994). Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer*, 57(3), 406-412. doi:10.1002/ijc.2910570319

Wu, S., Lu, H., & Bai, Y. (2019). Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Med*, 8(5), 2252-2267. doi:10.1002/cam4.2101

Xu, J., Lowey, J., Wiklund, F., Sun, J., Lindmark, F., Hsu, F. C., . . . Gronberg, H. (2005). The interaction of four genes in the inflammation pathway significantly predicts prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(11 Pt 1), 2563-2568. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0356

Yang, L., Dai, F., Tang, L., Le, Y., & Yao, W. (2017). Macrophage differentiation induced by PMA is mediated by activation of RhoA/ROCK signaling. *J Toxicol Sci*, 42(6), 763-771. doi:10.2131/jts.42.763

Yang, L., Xie, S., Jamaluddin, M. S., Altuwaijri, S., Ni, J., Kim, E., . . . Chang, C. (2005). Induction of androgen receptor expression by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt downstream substrate, FOXO3a, and their roles in apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 280(39), 33558-33565. doi:10.1074/jbc.M504461200

Yao, Y., Xu, X. H., & Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*, 10, 792. doi:10.3389/fimmu.2019.00792

Yoshimoto, M., Cunha, I. W., Coudry, R. A., Fonseca, F. P., Torres, C. H., Soares, F. A., & Squire, J. A. (2007). FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer*, 97(5), 678-685. doi:10.1038/sj.bjc.6603924

Yuan, F., Hankey, W., Wu, D., Wang, H., Somarelli, J., Armstrong, A. J., . . . Wang, Q. (2019). Molecular determinants for enzalutamide-induced transcription in prostate cancer. *Nucleic Acids Res*, 47(19), 10104-10114. doi:10.1093/nar/gkz790

Yuan, T. C., Veeramani, S., Lin, F. F., Kondrikou, D., Zelivianski, S., Igawa, T., . . . Lin, M. F. (2006). Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocr Relat Cancer*, 13(1), 151-167. doi:10.1677/erc.1.01043

Yuri, P., Hendri, A. Z., & Danarto, R. (2015). Association between tumor-associated macrophages and microvessel density on prostate cancer progression. *Prostate Int*, 3(3), 93-98. doi:10.1016/j.pnrl.2015.06.002

Zacho, H. D., Fonager, R. F., Nielsen, J. B., Haarmark, C., Hendel, H. W., Johansen, M. B., . . . Petersen, L. J. (2020). Observer Agreement and Accuracy of (18)F-Sodium Fluoride PET/CT in the Diagnosis of Bone Metastases in Prostate Cancer. *J Nucl Med*, 61(3), 344-349. doi:10.2967/jnumed.119.232686

Zhang, S., Yang, X., Wang, L., & Zhang, C. (2018). Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells. *Oncol Lett*, 16(1), 679-686. doi:10.3892/ol.2018.8716

Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., & Li, Y. (2021). Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 263. doi:10.1038/s41392-021-00658-5

Zhao, S., Geybels, M. S., Leonardson, A., Rubicz, R., Kolb, S., Yan, Q., . . . Stanford, J. L. (2017). Epigenome-Wide Tumor DNA Methylation Profiling Identifies Novel Prognostic Biomarkers of Metastatic-Lethal Progression in Men Diagnosed with Clinically Localized Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 23(1), 311-319. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0549

Zhifang, M., Liang, W., Wei, Z., Bin, H., Rui, T., Nan, W., & Shuhai, Z. (2015). The androgen receptor plays a suppressive role in epithelial- mesenchymal transition of human prostate cancer stem progenitor cells. *BMC Biochem*, 16, 13. doi:10.1186/s12858-015-0042-9

Zhou, M., Zhang, Q., Zhao, J., Liao, M., Wen, S., & Yang, M. (2017). Phosphorylation of Bcl-2 plays an important role in glycochenodeoxycholate-induced survival and chemoresistance in HCC. *Oncol Rep*, 38(3), 1742-1750. doi:10.3892/or.2017.5830

Zhu, X.-F., Li, W., Ma, J.-Y., Shao, N., Zhang, Y.-J., Liu, R.-M., . . . Wang, S.-M. (2015). Knockdown of heme oxygenase-1 promotes apoptosis and autophagy and enhances the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Oncology Letters*, 10(5), 2974-2980. doi:10.3892/ol.2015.3735

Zurth, C., Koskinen, M., Fricke, R., Prien, O., Korjamo, T., Graudenz, K., . . . Gieschen, H. (2019). Drug-Drug Interaction Potential of Darolutamide: In Vitro and Clinical Studies. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 44(6), 747-759. doi:10.1007/s13318-019-00577-5

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Fatih HUNÇ
Doğum Yeri ve Tarihi	
İletişim Adresi	
Telefon	
E-Posta	
Eğitim Bilgileri	• Doktora: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2016-2022) • Lisans: Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi (2006-2012)
Mesleki Deneyim/İş Yeri Bilgileri	• Araştırma Görevlisi: Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı (2015-) • Araştırma Görevlisi: Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı (2014-2015) • Pratisyen Hekim: Düzce Atatürk Devlet Hastanesi (2012-2013)
Yabancı Dil Bilgileri	İngilizce (İleri Seviye)
Üye Olduğu Mesleki / Sosyal Kuruluşlar	• Türk Biyokimya Derneği • Moleküler Kanser Araştırma Derneği • Hücre Ölümü Derneği • Türk İmmünoloji Derneği
Bilimsel Etkinlikler	
Makaleler	• Çakın Memik Nursu*, Hunç Fatih*, Kalaycı Şeyma, Demir Necmettin, Şentürk Elif, Yıldız Gündoğdu Özlem, Dillioğlugil Meltem Özlen (2022). Assessment of Plasma-Endogenous Opioid Neuropeptide Levels and Psychometric Properties of Non-Suicidal Self-Injury in Adolescents. Archives of Suicide Research, Doi: 10.1080/13811118.2022.2066494 (Yayın No: 7687337) SCI-EXPANDED *Eş-katkılı yazarlık (Co-firstauthorship) • Rabia Tasdemir; Esra Acar; Tuncay Colak; Fatih Hunç; Belgin Bamac; Hale Maral Kır & Fatma Ceyla Eraldemir (2021). Investigation of Possible Oxidative Damage Caused by Formaldehyde Exposure in the Rat's Heart and Aorta

	Tissue. Int. J. Morphol., 39(4):1042-1047, 2021 SCI-EXPANDED • Acar Esra, Taşdemir Rabia, Hunç Fatih, Çolak Tuncay, Özsoy Özgür Doğa, Bamaç Belgin, Maral Kır Hale (2021). Investigation Of The Effect Of Formaldehyde Inhalation On TXNIP and Nf-KB Levels in Rat Kidney (2021). The Journal of Animal & Plant Sciences, Doi: 10.36899/japs.2021.3.026131(3): 2021, Page: 708-718 SCI-EXPANDED • Acar Esra, Hunç Fatih, Kum Tuğba, Eraldemir Fatma Ceyla, Maral Kır Hale, Baydemir Canan (2019). Comparison of Total Bilirubin Values Measured with ABL 735 Blood Gas Analyzer and Roche Cobas C8000 Chemistry Analyzer in Age-Segregated Pediatric Patients. Revista Romana de Medicina de Laborator, 27(2), 137-145. (Yayın No: 5893832) SCI-EXPANDED • Acar Esra, Hunç Fatih, Maral Kır Hale (2020). Evaluation of incompatibility in measurement of erythrocyte sedimentation rate by two different modes of automated analyzer and demonstration of surpassing with a manipulation. International Journal of Medical Biochemistry, 3(3), 143-149., Doi: 10.14744/ijmb.2020.29974 (Kontrol No: 6613858) TR-DİZİN
Projeler	• U937 monosit hücrelerinde kimyasal uyarımla M0, M1 ve M2 makrofaj hücre diferansiasyonunun gerçekleştirilmesi- Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Fatih Hunç, 2021 (Devam Ediyor) (ULUSAL) • Androjen reseptör inhibitörü apalutamidin hormon duyarlı prostat kanseri hücre hattı (LNCaP) üzerine olan terapötik etkinliğinin, enflamasyon ve katlanmamış protein yanıtıyla olan değişiminin incelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Fatih Hunç, 01/04/2021 (Devam Ediyor) (ULUSAL) • Yüksek ve Düşük Fosforlu Diyetin Cinsiyet Farkına Göre PTH, D Vitamini ve Kemik Turnover Belirteçleri Üzerine Etkisinin Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Fatih Hunç, 01/11/2018-31/05/2020 (ULUSAL) • Kendine zarar verme davranışında endojen opioidler, Araştırma Projesi, Araştırmacı: Fatih Hunç, 01/12/2019

	(Devam Ediyor) (ULUSAL) • Gebelikte Maruz Kalınan Kalıcı Organik Kirleticilerin Obstetrik Komplikasyonlarla İlişkisi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Fatih Hunç, 24/10/2014-03/04/2019 (ULUSAL)
Uluslararası Bildiriler	• Hunç Fatih, Köle Emre, Maral Kır Hale, Acar Esra, Dillioğlugil Meltem Özlen, Özkan Sabriye (2021). Posters. 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, Ljubljana, Slovenia, July 3–8, 2021, DOI: 10.1002/2211-5463.13205 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:7487490) • Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Maral Kır Hale (2019). Evaluation of 25 hydroxy D3 vitamin levels in obese patients through laboratory data. FEBS OPEN BIO, 9(S1), 65-431., DOI: 10.1002/2211-5463.12675 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:6496193) • Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Maral Kır Hale (2018). Evaluating 25 hydroxy D3 vitamin levels among cerebrovascular stroke patients. FEBS OPEN BIO, 8(null), 222-222. (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4370069) • Acar Esra, Maral Kır Hale, Hunç Fatih (2018). Comparison of Erythrocyte Sedimentation Rate Measurement Reliability in Three Different Modes by Automated Autoanalyzer. 5th EFLM-UEMS European Joint Congress In Laboratory Medicine (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4392285) • Yeşildağlı Berkay Umut, Emir Büşra, Hunç Fatih, Arslanbaş Demet, Yücesoy Gülseren, Dillioğlugil Meltem Özlen, Filiz Serdar, Günlemez Ayla, Civan Mihriban (2018). PCB Levels in Maternal Blood Serum. ULUSLARARASI MARMARA FEN VE SOSYAL BİLİMLER KONGRESİ, 1(1) (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4664846) • Acar Esra, Taşdemir Rabia, Hunç Fatih, Çolak Tuncay, Özsoy Özgür Doğa, Bamaç Belgin, Maral Kır Hale (2018). Demonstration of formaldehyde toxicity on renal tissue with oxidative markers. FEBS OPEN BIO, 8(null), 231-231., DOI: 10.1002/2211-5463.12449 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4370155) • Taşdemir Rabia, Acar Esra, Çolak Tuncay, Hunç Fatih, Bamaç Belgin, Maral Kır Hale, Eraldemir Fatma Ceyla (2018). INVESTIGATION OF POSSIBLE OXIDATIVE DAMAGE CAUSED BY FORMALDEHYDE EXPOSURE

	IN THE RAT'S HEART AND AORTA TISSUE. XXVI International Symposium on Morphological Sciences (ISMS) (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:5064683)
Ulusal Sözlü Bildiriler	• Hunç Fatih, Mekik Çakın Nursu, Dillioğlugil Ozlen Meltem (2022). PLAZMA NİTRİK OKSİT SEVİYELERİ İLE KENDİNE ZARAR VERME DAVRANIŞI ARASINDAKİ İLİŞKİLİNİN ARAŞTIRILMASI (Sözlü Sunum/Özet bildiri) VII. Türkiye İn vitro Diyagnostik Sempozyumu: Enflamasyon 27.04.2022 Ulusal • Hunç Fatih, Yeşildağlı Berkay, Ayaz Tuğba, Koç Şule, Kocakır Ezginur, Dillioğlugil Meltem Özlen, Arslanbaş Demet, Civan Mihriban (2020). Yenidoğanlarda GC-MS Yöntemi ile Poliklorlu Bifenilllerin Tespiti: Tirod Fonksiyonlarının İncelenmesi. V. in vitro Diyagnostik Sempozyumu (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:6111713) • Fatih Hunç, Esra Acar, Pınar Baki Ünver, Şule Koç, Ezginur Kocakır (2020). Examination of oxidative stress biomarkers and cotinine levels and their relationship with cigarette exposure. 3rd International Conference on Biological and Chemical Sciences (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:7014732) • Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Maral Kır Hale, Koç Şule, Kocakır Ezginur (2019). Kemik Yıkımı Belirteci Olarak Ctx ile 25-ohD3 Düzeyleri Arasındaki İlişkinin Retrospektif Olarak Laboratuvar Verileri Üzerinden İncelenmesi. IV. Türkiye in vitro Diyagnostik (IVD) Sempozyumu, 43(Supplement), 10-10., DOI: 10.1515/tjb-2018-43s106 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5443878) • Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Acar Esra, Maral Kır Hale (2019). İnfantlarda İnflamasyon Belirteçleri Olarak Prokalsitonin, CRP, Neu/Lym, Neu/Plt, MPV Aralarındaki İlişkinin İncelenmesi. İzmir Demokrasi Üniversitesi Uluslararası Tıp Kongresi (IMCIDU) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5594034)
Ulusal Poster Bildiriler	• Hunç Fatih, Duruksu Gökhan, Dillioğlugil Ozlen Meltem (2022). U937 MONOSİT HÜCRELERİNDEN KİMYASAL UYARIMLA FARKLILAŞTIRILAN M1 VE M2 POLARİZE MAKROFAJ HÜCRELERİNİN SİTOKİN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİPoster(Özet Bildiri/Poster) VII. Türkiye İn vitro Diyagnostik Sempozyumu: Enflamasyon 27.04.2022

	Ulusal • Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Maral Kır Hale, Kum Tuğba, Baydemir Canan (2017). Pulmoner Tromboemboli ve Venöz Tromboz Olgularında Plazmad-Dimer Seviyelerindeki Farklılık. Uluslararası Katılımlı XVII. Klinik Biyokimya Kongresi, 129, Doi: P-042 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3767623) • Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Balcı Sibel, Acar Esra, Kum Tuğba (2016). KAN GAZI ANALİZİ VE OTOANALİZÖR KARŞILAŞTIRMASI: SODYUM, POTASYUM VE KLOR. ULUSLARARASI KATILIMLI XVI.KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4372308) • Acar Esra, Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Kum Tuğba (2016). Acil Laboratuvarına Gelen Çocuk Hasta Numunelerinde Bilirubin Değerlerinin Kan Gazı ve Otoanalizör Cihazıyla Karşılaştırılması. XVI. Klinik Biyokimya Kongresi ve IATDMCT Regional Meeting, 14(Supplement), 113 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:2705735) • Acar Esra, Hunç Fatih, Eraldemir Fatma Ceyla, Kum Tuğba (2016). Acil laboratuvarına gelen çocuk hasta numunelerinde bilirubin değerlerinin kan gazı ve otoanalizör cihazıyla karşılaştırılması. ULUSLARARASI KATILIMLI XVI.KLİNİK BİYOKİMYA KONGRESİ (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4372275) • Yeşildal Nuray, Yılmaz Muammer, Hunç Fatih, Güneş Abdullah, Kılıç Kadriye, Köklü Nurhan, Kaya Ahmet Cemal (2013). Tıp Fakültesi Çalışanlarında Elektromanyetik Radyasyon Riski Algısı Ve Koruyucu Uygulamalar. 16.Ulusal Halk Sağlığı Kongresi (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:7279311)
--	---