



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**ATİMİK NUDE FARELERDE OLUŞTURULAN PROSTAT
KANSERİ MODELİNDE TOLL LİKE 3 VE TOLL LİKE 9
RESEPTÖRLERİNİN APOPTOZ VE TÜMÖR GELİŞİMİ İLE
İLİŞKİSİNİN İMMUN BOYAMA YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Ayfer Yıldız UYSAL

DOKTORA TEZİ

1.Danışman
Prof. Dr. Serpil DAĞ
2.Danışman
Prof. Dr. Aydan DAĞ

2025-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

ATİMİK NUDE FARELERDE OLUŞTURULAN PROSTAT
KANSERİ MODELİNDE TOLL LİKE 3 VE TOLL LİKE 9
RESEPTÖRLERİNİN APOPTOZ VE TÜMÖR GELİŞİMİ İLE
İLİŞKİSİNİN İMMUN BOYAMA YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI

Arş. Gör. Ayfer Yıldız UYSAL

DOKTORA TEZİ

1.Danışman

Prof. Dr. Serpil DAĞ

2.Danışman

Prof. Dr. Aydan DAĞ

2025-KARS

Bu tez KAÜ-BAP tarafından 2024-TS-25 proje numarası ile desteklenmiştir.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Patoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde **Arş. Gör. Ayfer Yıldız UYSAL** tarafından hazırlanmış olan “**Atimik Nude Farelerde Oluşturulan Prostat Kanseri Modelinde Toll Like 3 ve Toll Like 9 Reseptörlerinin Apoptoz ve Tümör Gelişimi ile İlişkinin İmmun Boyama Yöntemleriyle Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda Jüri Üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim, Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile edilmiştir.

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

	Adı Soyadı	İmza
Başkan:
Üye:
Üye:
Üye:
Üye:

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçlar bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğum,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi durumda aleyhime doğabilecek tüm hak ve kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Arş. Gör. Ayfer Yıldız UYSAL

ÖNSÖZ

Prostat kanseri (PCa), erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türü olup, dünya çapında erkek sağlığını etkileyen önemli bir hastalıktır. Prostat kanseri uzun vadede herhangi bir semptom göstermeden ilerleyebilmektedir. Günümüzde prostat kanserini tespit etmede prostat dokusundan alınan biyopsi örneğinin analizi, prostat spesifik antijen (PSA) testi, dijital rektal muayene (TRUS), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya sağlık taraması yöntemleri kullanılmaktadır ve tedavi seçenekleri arasında kemoterapi, radyasyon tedavisi, hormonal tedavi, cerrahi ve kriyoterapi yer almaktadır. Bu tedavi yöntemleri kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücreleri de beraberinde yok etmektedir. Bu nedenle tümör gelişimini engellemek ve daha az toksik etkileri bulunan yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), konak bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan iyi bilinen bir desen tanıma reseptörleri olup, son çalışmalar, TLR'ler ve kanser arasında ilişkiler olduğunu göstermektedir; ancak, TLR'lerin prostat kanserindeki işlevi ve biyolojik önemi tam olarak aydınlatılmamıştır. Çalışmamızda bağışıklıkta ve tümör gelişiminde önemli etkileri olduğu düşünülen TLR-3 ve TLR-9'un PCa ekspresyonu, apoptozla ve tümör gelişimiyle ilişkisi immunohistokimyasal ve immunofloresan metotlarla incelenerek TLR'lerin PCa; prognostik prognozu belirlemede biyobelirteç ve tedavi seçeneği olarak kullanılıp kullanılmayacağı konusunda fikir sahibi olunması amaçlanmıştır. Bu veriler dışında daha önce prostat kanseri olgularında; apoptoz ve TLR-3 ve TLR-9'un hem immunohistokimyasal hem de immunofloresan olarak değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanılmamış olup, yapılan bu çalışmanın apoptoz ve TLR'ler arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik diğer çalışmalara ışık tutacağı ve literatüre önemli katkılar sunacağı kanaatindeyiz.

Doktora eğitimim boyunca hep yanımda olan ve engin bilgilerini bana aktararak yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Serpil DAĞ'a, çalışmalarım esnasında bana laboratuvar imkânı sunan ve her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ikinci danışmanım Prof. Dr. Aydan DAĞ'a, tez çalışmamın uygulama aşamasında desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Beyza SERVET GÖNCÜ'ye, tez süresi boyunca istatistiksel analizlerde bana yardımcı olan Doç. Dr. Mustafa MAKAV'a, tez sürecinde yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr.

Enver BEYTUT'a Dr. Öğr. Üyesi Hilmi NUHOĞLU'na ve ayrıca anabilim dalımız doktora öğrencisi Mizgin KENGİŞ'e, her zaman yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bana yol arkadaşlığı yapan, desteğini ve sevgisini her daim hissettiğim sevgili eşim Ahmet Salihhan UYSAL'a teşekkür ederim.



ÖZET

Prostat kanseri erkeklerde görülen kanser vakalarının en önemlilerinden biridir. TLR'ler ise makrofajlar ve dendritik hücreler ile bazı tümör hücrelerinde bulunan reseptörler olup, vücuda yabancı her türlü etkeni tanıyıp, proinflatuar doğal immün cevapları uyararak konak savunmasını sağlayan aynı zamanda tümör patogeneğinde rol oynadığı düşünülen transmembran proteinleridir. Yapılan bu tez çalışmasında insan prostat kanseri hücre hattı (LNCaP) verilerek oluşturulan deneysel prostat kanseri modelinde tümör gelişiminde önemli rolleri olduğu düşünülen TLR-3 ve TLR-9'un ekspresyonları, tümör gelişimindeki rolleri ve apoptozla ilişkisi immunohistokimyasal ve immunofloresan yöntemler kullanılarak açıklanması amaçlanmıştır. Çalışmada 24 adet 6-8 haftalık erkek atimik nüde fareler denek olarak kullanıldı. Deney hayvanları; kontrol, 3 haftalık tümör grubu, 5 haftalık tümör grubu ve 7 haftalık tümör grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı ve tümör gruplarına 2×10^6 Androjen bağımlı LNCaP prostat kanseri hücre hattı ortotopik yolla enjekte edilerek deneysel prostat kanseri modeli oluşturuldu. Deney süresi dolan gruplardan alınan dokular ilk olarak makroskopik yönden incelendi ve tümör gelişimi arttıkça dokuların boyutlarında artış şekillendiği, kanama ve nekrozun tümör yüzeyini kapladığı tespit edildi. En son sakrifiye edilen 7 haftalık gruptaki deneklerin 3'ünde iliak lenf düğümlerinde metastaz şekillendiği gözlemlendi. Yapılan histopatolojik incelemelerde tümör hücrelerinin, yuvarlak-oval çekirdekli, belirgin nükleoluslu, eozinofilik sitoplazmalı, solid yapı oluşturdukları, tümör ilerlemesi arttıkça tümöral dokunun içinde komedonekroz alanlarının şekillendiği ve mitotik aktivitenin de arttığı gözlemlendi. Mitotik indeks hesaplamalarında 3 haftalık ve 7 haftalık gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı fark olduğu ($p < 0,05$), bunun yanında 3 haftalık ile 5 haftalık ve 5 haftalık ile 7 haftalık gruplara arasında sayısal olarak mitozda artış şekillenmesine rağmen istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilmediği ($p > 0,05$) saptandı. Yapılan IHC ve IF boyamaları sonucunda TLR-3, TLR-9, Bcl-2, PCNA, VEGF, TGF- β ve FGF ekspresyonlarının tümör ilerlemesine paralel bir artış gösterdiği ve aralarında pozitif bir korelasyon olduğu, Bax ile TLR-3, TLR-9 ve Bcl-2 arasında negatif bir korelasyon olduğu tespit edildi.

Elde edilen veriler sonucunda prostat kanserinde TLR-3 ve TLR-9

aktivasyonunun, tümör hücrelerinde apoptozu inhibe ederek hücre sağkalımını artırabileceklerini ve bu mekanizmanın tümör ilerlemesini desteklediği kanaatine varılmıştır. Bunun dışında anti-TLR-3 ve anti-TLR-9 uygulamalarının prostat kanserinde yeni terapötik ajanlar olarak kullanılabilirliğini ve prognozu belirlemede biyobelirteç olarak tercih edilebileceklerini gözlemledik. Bunun yanında prostat kanseri olgularında; apoptoz ve TLR-3 ve TLR-9'un hem immunohistokimyasal hem de immunofloresan yöntem kullanılarak değerlendirildiği ilk çalışma olması açısından apoptoz ve TLR'ler arasındaki ilişkiyi açıklamaya çalışan diğer çalışmalara ışık tutacağı ve literatüre önemli katkılar sunacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, İmmunofloresan, İmmunohistokimya, Prostat kanseri, Toll like reseptörler,

SUMMARY

Prostate cancer is one of the most important cancer cases seen in men. TLRs are receptors found on macrophages, dendritic cells and some tumor cells. They are transmembrane proteins that recognize all kinds of foreign agents in the body and stimulate proinflammatory natural immune responses, providing host defense in mammals, and are also thought to play a role in tumor pathogenesis. In this thesis study, it was aimed to explain the expressions of TLR-3 and TLR-9, which are thought to have important roles in tumor development, in prostate cancer, their roles in tumor development and their relationship with apoptosis using immunohistochemical and immunofluorescence methods in an experimental prostate cancer model created by giving human prostate cancer cell line (LNCaP). 24 6-8 week old male athymic nude mice were used as subjects in the study. Experimental animals; The patients were divided into 4 groups as control, 3-week tumor group, 5-week tumor group and 7-week tumor group and an experimental prostate cancer model was created by injecting 2×10^6 Androgen-dependent LNCaP prostate cancer cell line orthotopically into the tumor groups. The tissues taken from the groups whose experimental period had expired were first examined macroscopically and it was determined that as tumor development increased, the tissues increased in size and hemorrhage and necrosis covered the tumor surface. Metastasis was observed in the iliac lymph nodes of 3 of the subjects in the 7-week group that were finally sacrificed. In histopathological examinations, it was observed that the tumor cells formed a solid structure with round-oval nuclei, prominent nucleoli, eosinophilic cytoplasm, and that as tumor progression increased, areas of comedonecrosis formed in the tumoral tissue and mitotic activity increased. In mitotic index calculations, it was determined that there was a statistically significant difference between the 3-week and 7-week groups ($p < 0.05$), while there was an increase in mitosis between the 3-week and 5-week and 5-week and 7-week groups, but no statistically significant difference was detected ($p > 0.05$). As a result of IHC and IF staining, it was determined that TLR-3, TLR-9, Bcl-2, PCNA, VEGF, TGF- β and FGF expressions showed an increase parallel to tumor progression and there was a positive correlation between them, and there was a negative correlation between Bax and TLR-3, TLR-9 and Bcl-2. As a result of the obtained data, it was concluded that

TLR-3 and TLR-9 activation in prostate cancer can increase cell survival by inhibiting apoptosis in tumor cells and that this mechanism supports tumor progression. Apart from this, we observed that anti- TLR-3 and anti-TLR-9 applications can be used as new therapeutic agents in prostate cancer and can be preferred as biomarkers in determining prognosis. In addition, we believe that this is the first study in which apoptosis and TLR-3 and TLR-9 were evaluated using both immunohistochemical and immunofluorescence methods in prostate cancer cases, and that it will shed light on other studies trying to explain the relationship between apoptosis and TLRs and make important contributions to the literature.

Keywords: Apoptosis, Immunofluorescence, Immunohistochemistry, Prostate cancer, Toll like receptor

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	II
ÖNSÖZ	III
ÖZET	V
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	IX
SİMGELER VE KISALTALAR	XII
TABLolar DİZİNİ	XV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
RESİMLER DİZİNİ	XVII
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Prostat Bezi	3
2.1.1.Prostat Bezinin Gelişimi	3
2.1.2.Prostat Bezinin Anatomisi.....	4
2.1.3.Prostat Bezinin Histolojisi.....	5
2.1.4.Prostat Bezinin Hastalıkları	6
2.1.5.Prostatit	7
2.1.6.Prostat Bezinin Proliferatif Hastalıkları.....	7
2.1.6.1.Prostatın Preneoplastik Lezyonları	8
2.1.6.1.1. Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PIN).....	8
2.1.7.Prostat Kanseri (PCa)	8
2.1.7.1.Androjen-prostat kanseri ilişkisi	10
2.1.7.2.Androjen-bağımsız prostat kanseri	11
2.1.7.3.Prostat Spesifik Antijen.....	11
2.1.7.4.Serbest/total PSA (s/t PSA)	12
2.1.7.5.Prostat Kanserinin Derecelendirilmesi	12
2.1.7.6.Prostat kanserinin Histolojik Varyantları	16
2.1.7.7.Teşhis yöntemleri.....	19
2.1.7.8.Prostat kanserinde Tedavi	19
2.2.Toll Like Reseptörler.....	20
2.2.1.TLR sinyalizasyonu.....	22

2.2.2.Önemli Toll Like Reseptörleri	24
2.2.3.Toll Like Reseptör-Kanser İlişkisi.....	27
2.2.3.1.TLR ekspresyonlarının çeşitli kanser türlerindeki etkileri	29
2.3.Apoptoz	32
3.MATERYAL ve METOD	37
3.1.Hücrelerin Kültürü ve Hazırlanması.....	37
3.2.Hemositometrik Hücre Sayımı.....	37
3.4.Biyokimyasal Analizler	40
3.4.1.Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELİSA).....	40
3.5.Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal incelemeler	42
3.5.1.Parafin Blokların Hazırlanması	42
3.5.2.Histopatolojik İncelemeler-Hematoksilen-Eozin	42
3.5.3.İmmunohistokimyasal İncelemeler (IHC).....	43
3.5.4.Double İmmunofloresan (IF).....	44
3.6.İstatistiksel analizler	45
4.BULGULAR.....	47
4.1.Canlı Ağırlık Değişimleri ve Hematolojik Bulgular	47
4.2.Biyokimyasal Bulgular	47
4.2.1.ELİSA sonuçları	47
4.3.Makroskobik bulgular.....	48
4.4. Mikroskobik Bulgular.....	52
4.4.1.Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları	52
4.4.2.İmmunohistokimyasal Bulgular ve İstatistiksel Analizler	57
4.4.2.1.PCNA	57
4.4.2.2.TGF- β	59
4.4.2.3.VEGF	61
4.4.2.4.FGF	63
4.4.2.5.Bax	65
4.4.2.6.Bcl-2.....	68
4.4.2.7.TLR-3.....	71
4.4.2.8.TLR-9.....	74
4.4.3.İmmunofloresan Boyama Sonuçları	79

4.4.3.1.Bax-TLR-9.....	79
4.4.3.2.Bax-TLR-3.....	80
4.4.3.3.Bcl-2-TLR-9.....	81
4.4.3.4.Bcl-2-TLR-3.....	82
5.TARTIŞMA.....	84
6.SONUÇ.....	110
7.KAYNAKÇA.....	112
8.EKLER.....	144
Ek1 : Etik Kurul Kararı.....	144



SİMGELER VE KISALTALAR

µl	: Mikrolitre
AAH	: Atipik Adenomatöz Hiperplazi
ABC	: Avidin-Biotin Complex Peroksidaz
ADT	: Androjen Yoksunluk Tedavisi
AP	: Anterior Prostat
AP-1	: Aktivatör Protein
AR	: Androjen Reseptörleri
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma 2
BPH	: İyi Huylu Prostat Hiperplazisi
BPO	: Benign Prostat Obstrüksiyonu
CAF	: Kanserle İlişkili Fibroblastlar
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CRPC	: Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri
CSC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
DAMP	: İç Hasar İlişkili Moleküler Bileşenleri
DC	: Dendritik Hücreler
DLP	: Dorsolateral Prostat
DP	: Dorsal Prostat
DsRNA	: Çift Sarmallı RNA
ECM	: Ekstra Selüler Matriksi
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	: Östrojen Reseptörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktör
IDC-P	: Prostatın İntraduktal Karsinomu
IF	: İmmunofloresan
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
IHC	: İmmunohistokimyasal
ISUP	: Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği
KP/KPAS	: Kronik Prostatit/Kronik Pelvik Ağrı Sendromu

LP	: Lateral Prostat
LPS	: Lipopolisakkaritler
MAPK	: Mitogenle Aktive Edilen Protein Kinazların
MMP-9	: Matris Metalloproteinaz-9
MpMRG	: Multiparametrik Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
MyD88	: Miyeloid Farklılaşma Birincil Tepki 88
NF- κB	: Nükleer Faktörü Kappa
PAMP	: Patojenle İlişkili Moleküler Yapıların
PBS	: Fosfat Buffered Saline
PCa	: Prostat Kanseri
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü
PCNA	: Proliferasyon Yapan Hücre Nükleer Antijeni
pDC	: Plazmasitoid Dendritik Hücreler
PIN	: Prostatik İntraepitelyal Neoplazi
PSA	: Prostat spesifik antijen
PSAP	: Prostat Spesifik Asit Fosfataz
sPSA	: Serbest Prostat Spesifik Antijen
SV	: Seminüler Vezikül
TAK-1	: Aktive Edilen Kinaz 1
TAM	: Tümörle İlişkili Makrofaj
TGF- β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü β
Th1	: T Helper 1
TIR	: Toll/IL-1R
TLR	: Toll Like Reseptör
TME	: Tümör Mikroçevresinde
TNF/Fas	: Tümör Nekroz Faktörü/Fas
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
tPSA	: Total Prostat Spesifik Antijen
Tregs	: Düzenleyici T Hücreleri
TRUS	: Dijital rektal muayene
UGS	: Ürogenital Sinüs

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VP : Ventral Prostat



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. ISUP 2014 gradeleme sistemi	15
Tablo 2. TLR ekspresyonu, lokalizasyonu ve ligandları	26
Tablo 3. IHC ve IF boyamalarında kullanılan Primer ve Sekonder Antikorlar	45
Tablo 4. Deneklerin canlı ağırlık değişimlerinin istatistiki sonuçlar	47
Tablo 5. Serum PSA ölçümlerinin istatistiki analizleri	48
Tablo 6. Tümör hacimlerinin istatistiki analizleri	52
Tablo 7. Gruplardaki denekten alınan tümoral dokuların mitotik aktivitesi ve grup ortalamaları.	56
Tablo 8. Gruplar arasındaki mitotik indeksin istatistiki analizi.....	57
Tablo 9. Tüm gruplara ait ortalama PCNA pozitif hücre sayımlarının istatistiksel karşılaştırılması	59
Tablo 10. Tüm gruplara ait ortalama immunpozitif TGF- β hücrelerinin istatistiksel karşılaştırılması.	61
Tablo 11. Tüm gruplara ait ortalama immunpozitif VEGF hücrelerinin istatistiksel karşılaştırılması.	63
Tablo 12. Grupların immunpozitif FGF ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması	65
Tablo 13. Deneklerden alınan dokuların Bax immunpozitif hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması	68
Tablo 14. Bcl-2 immunpozitif hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması ...	71
Tablo 15. İmmunpozitif TLR-3 hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılma....	74
Tablo 16. İmmunpozitif TLR-9 hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması .	77
Tablo 17. Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 immunohistokimyasal boyamalarının Pearson korelasyon analizi testi sonuçları.....	78
Tablo 18. PCNA, VEGF, TGF- β , FGF, Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 immunohistokimyasal boyamalarının Pearson korelasyon analizi testi sonuçları	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İnsan ve Fare Prostat bezinin şematik gösterimi.	4
Şekil 2: Prostat bezinin histolojik yapısı.....	6
Şekil 3: İnsan ve farede PCa gelişim aşamalarının şematik görünümü	10
Şekil 4: Androjen bağımlı prostat kanserinin moleküler mekanizması	11
Şekil 5: Gleason paterni	14
Şekil 6: TLR sinyalizasyonu	24



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: LNCaP prostat kanseri hücre hattı,.....	38
Resim 2: Deneklerin barındırıldığı kafesler.....	38
Resim 3: LNCaP hücrelerinin ortotopik enjeksiyon aşamaları,	40
Resim 4: ELİSA testi, pozitif reaksiyon	42
Resim 5: Kontrol grubu, Fare prostat dokusu.....	49
Resim 6: 3 haftalık tümör grubu	49
Resim 7: 5 haftalık tümör grubu	50
Resim 8: 7 haftalık tümör dokusu	51
Resim 9: A: Kontrol grubu, prostat dokusu.....	52
Resim 10: 3 haftalık tümör grubu	53
Resim 11: 5 haftalık tümör grubu	54
Resim 12: 7 haftalık tümör grubu	55
Resim 13: İliak lenf düğümü.....	55
Resim 14: Prostat kanseri, PCNA immunohistokimyasal boyama.....	58
Resim 15: İliak lenf düğümü PCNA immunohistokimyasal boyaması.....	58
Resim 16: Prostat kanseri, TGF-beta immunohistokimyasal boyama.	60
Resim 17: Prostat kanseri, VEGF immunohistokimyasal boyaması	62
Resim 18: Prostat kanseri, FGF immunohistokimyasal boyaması	64
Resim 19: Prostat kanseri, Bax immunohistokimyasal boyaması	66
Resim 20: 7 haftalık tümör grubu, iliak lenf düğümü metastazı, Bax immunpozitif reaksiyon alanları IHK.	67
Resim 21: Prostat kanseri, Bcl-2 immunohistokimyasal boyaması	69
Resim 22: 7 haftalık tümör grubu, iliak lenf düğümü metastazı, Bcl-2 immunpozitif reaksiyon alanları IHK.	70
Resim 23: Prostat kanseri, TLR-3 immunohistokimyasal boyaması	72
Resim 24: Metastaz şekillenmiş iliak lenf düğümü, TLR-3 immunohistokimyasal boyaması	73
Resim 25: Prostat kanseri, TLR-9 immunohistokimyasal boyaması	75
Resim 26: Metastaz şekillenmiş iliak lenf düğümü, TLR-9 immunohistokimyasal boyaması	76
Resim 27: Bax-TLR-9 ikili immunofloresan boyaması	80

Resim 28: Bax-TLR-3 ikili immunofloresan boyaması.....	81
Resim 29: Bcl-2-TLR-9 ikili immunofloresan boyaması.....	82
Resim 30: Bcl-2-TLR-3 ikili immunofloresan boyaması.....	83



1.GİRİŞ ve AMAÇ

PCA, erkeklerde en çok rastlanılan kanser türleri arasında yer alıp, tahmini yılda 1.600.000 vakaya ve 366.000 ölüme neden olmaktadır (Wang ve ark. 2018). Prostat kanseri erken evrede asemptomatiktir ve genellikle yavaş seyredir. Kanser teşhisi konulan hastalarda en sık görülen şikâyet sık idrar yapmadır. Hastalığın ileri evrelerinde, aksis ve femur; metastazın en yaygın görüldüğü yer olduğundan idrar retansiyonu ve sırt ağrısı da görülebilmektedir (Rawla 2019).

PCa testosteron uyarımının ve tedavi seçenekleri arasında yer alan androjene duyarlı ve androjene duyarsız PCa olmak üzere ikiye ayrılır. PCa'nın tedavi seçenekleri arasında kemoterapi, aktif gözetim, radyasyon tedavisi, hormonal tedavi, cerrahi ve kriyoterapi gibi yöntemler yer almaktadır. Bir hastaya sunulan tedavi seçenekleri tümörün yapısına, PSA seviyesine, derecesine, evresine ve olası nüks ihtimaline bağlıdır (Sekhoacha ve ark. 2022). Anti-androjen tedavileri başlangıçta etkili olsa da hastalar genellikle bu tedavilere direnç geliştirir ve kastrasyona dirençli hale gelirler. Bu aşamaya genellikle metastatik lezyonların gelişimi ve artan mortalite eşlik eder. Hastalığın ileri evresindeki hastalar için çok az tedavi seçeneği bulunmakta olup, bu durum özellikle androjen reseptöründen bağımsız yeni tedavilere ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur (Greulich ve ark. 2021).

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), doğuştan gelen bağışıklıkta önemli rolleri bulunan bir protein ailesidir (El-Omar ve ark. 2008). Yapılan araştırmalar; enfeksiyondan kaynaklanan birden fazla kronik inflamatuvar hastalığın TLR'lerle ilişkili olduğunu, kanser gelişimine yol açtığını ve TLR sinyal yolunun aşağı akış moleküllerinin genellikle tümörojenik inflamatuvar yanıtta yer aldığını göstermektedir. TLR ekspresyonu sıklıkla tümör ilerlemesine yol açarken, TLR aracılı sinyalleme aynı zamanda kanser karşıtı bağışıklığı da artırır. Bu nedenle de kanser tedavilerinde ekspresyonları ve etkileri iyice araştırılmalıdır (So ve Ouchi 2010, Chandrasekar ve ark. 2023). TLR'ler yalnızca bağışıklık hücrelerinde değil, aynı zamanda tümör mikroçevresinde (TME) de bulunmaktadır. TME, kanser hücreleri, normal hücreler, stromal doku ve hücre dışı sitokin karmaşık bir düzenlemesidir. TME'nin başlıca bileşenleri olan stromal hücreler arasında kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler), kemik iliği

kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) ve düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) de bulunur. TME arasında ifade edilen TLR'ler sadece kendi kendine programlanmış hücre ölümünü indüklemekle kalmaz, aynı zamanda tümör ortamında sitokin ve kemokin salgılayarak bağışıklık hücrelerinin daha fazla proinflamatuvar sitokin, proanjiojenik faktör ve büyüme faktörlerini salgılamaya teşvik eder. Örneğin TGF β , IL-8, CXCR4, ICAM-1 ve VEGF, antijen sunan hücrelerin (APC'ler) ve efektör T hücrelerinin anti-tümör fonksiyonunu ve apoptoz yanıtını onarabilir (Sato 2009).

Yapılan bu çalışma ile kanser gelişiminde veya gerilemesinde önemli rolleri olduğu düşünülen TLR'lerin, prostat kanseri dokularındaki ekspresyonları, bu reseptörlerin, apoptoz ve tümör gelişimindeki rolleri açıklanmaya çalışılmıştır. TLR-3 ve TLR-9, apoptoz markerları olan Bax-Bcl-2 ile PCNA, MMP-9, FGF, TGF- β ve VEGF gibi tümör gelişimini gösteren markerlarının ekspresyonlarına; androjen bağımlı LNCaP prostat kanseri hücre hattı verilerek oluşturulan ve 3. hafta, 5. hafta ve 7. haftalarda sakrifikasyonları yapılan tümör gruplarında bakıldı ve karşılaştırmaları yapıldı. Bunun yanında PSA değerleri ELİSA ile ölçülerek gruplar arasındaki seviyesi değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar ışığında prostat kanserinde, toll like reseptörlerinin etkisi açıklanmaya çalışıldı. Böylece ilerleyen süreçlerde erkeklerde önemli bir sağlık sorunu olan PCa vakalarının tespitinde, toll like reseptörlerinin yeni bir prognostik belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı ve yeni bir tedavi seçeneği olup olmayacağı hakkında fikir sahibi olundu.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Prostat Bezi

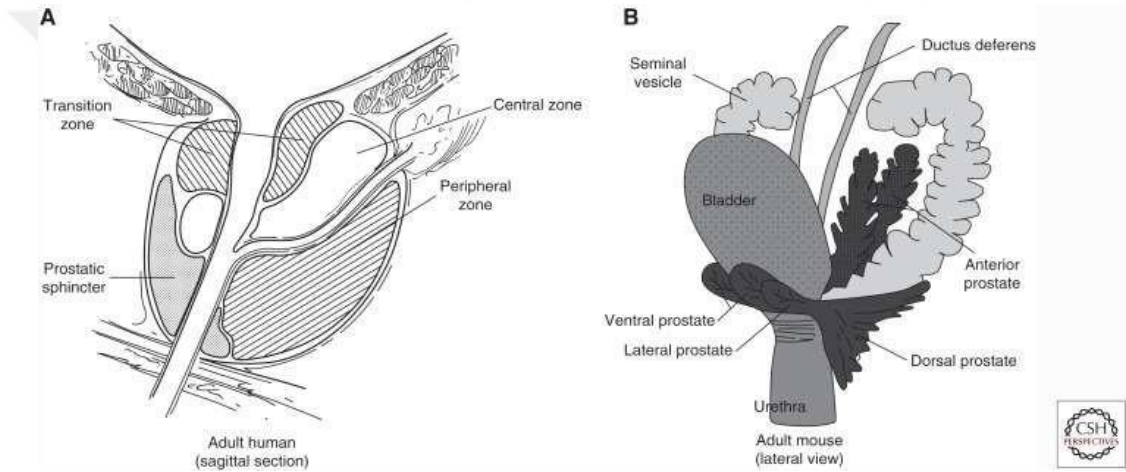
Prostat kelimesi Yunanca 'prohistani' ('önünde durmak' anlamına gelir) kelimesinden türetilmiştir. Prostat, mesanenin hemen altında yer alan eliptik veya üçgen şeklinde, tübüloalvoler yapıda ekzokrin bir bez olup, erkek üremesinde önemli bir role sahiptir. Spermatozoaların normal işlevi için gerekli olan enzimleri, lipitleri ve aminleri salgılar (Kumar ve Majumder 1995, Sharma ve ark. 2017). Bu salgı alkalı olup, vajinanın asidik ortamına karşı spermin canlı kalmasını sağlar ve spermin yumurtayı döllemesi için uygun ortam oluşturur. (Singh ve Bolla 2023). Yenidoğanlarda birkaç gram ağırlığında olan bu bez, 20 yaşına gelindiğinde yaklaşık 15-20 gram ağırlığa ulaşır (Kumar ve Majunder 1995).

2.1.1.Prostat Bezinin Gelişimi

Prostat gelişimi, ürogenital sinüs (UGS) epitelinden prostat tomurcuklarının oluşumuyla başlar ve cinsel olgunluğa erişinceye kadar devam eder. Bu süreç, farelerde gebeliğin 17. gününde, sıçanlarda 19. gününde, insanlarda ise yaklaşık 10. haftada başlar (Huang ve ark 2009, Aaron ve ark. 2016). Erkek cinsel farklılaşması, fetal testisler tarafından üretilen androjenlerin etkisi altındadır (Pletcher ve Shibata 2022). Androjenler; hem prostat epitelinde hem de stromada bulunan bir hormon transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörlerine (AR) bağlanarak etki gösterirler (Francis ve Swain 2018). Testisler tarafından salgılanan testosteron, prostat hücrelerinde bulunan 5 α -redüktaz enzimiyle daha etkili bir enzim olan dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. DHT daha sonra AR'ye bağlanır ve prostat gelişimini destekler. 5 α -redüktaz enzimi eksikliği olan kişilerde, testosteron dihidrotestosterona dönüşemeyeceğinden dolayı prostat bezi tam olarak gelişemez ve rudimenter halde kalır (Zhang ve ark. 2013, Francis ve Swain 2018, Siiteri ve Wilson 1974, Chen ve ark. 2009, Prins 2021).

Prostat morfogenezinde ilk olarak ürogenital sinüs epitelinden (UGE) çevredeki ürogenital sinüs mezenşimine (UGM) doğru epitel tomurcukları oluşur. Prostat tomurcukları, androjenlerin etkisi altında çoğalarak, lobar prostat bölümlerini oluşturmak için belirli bir düzlemde UGM'ye doğru büyüyerek epitel hücre

kordonlarını oluşturur. Kemirgenlerde, prostat kanallarının çoğu doğumda dallanmamıştır. Ancak yenidoğanlarda, bu kanallar UGM içinde uzadıkça çatallanmaya ve yan dallar oluşturmaya başlar. Sonuç olarak, sıçan ve farelerde dallanma morfogenezisi sonucunda dört belirgin prostat lobu oluşur. Bunlar ön prostat (AP; pıhtılaşma bezi olarak da bilinir), dorsal prostat (DP), lateral prostat (LP) ve ventral prostat (Şekil 1) lobu olarak adlandırılırlar. Bu prostat loblarının her birinin kanalları karakteristik bir dallanma düzenine sahiptir. İnsan prostatı ise tek lobüldür ve belirgin loblara sahip değildir, ancak periferik, merkezi ve geçiş bölgeleri içerir. (Marker ve ark. 2003, Giacomini ve ark. 2021).



Şekil 1: İnsan ve Fare Prostat bezinin şematik gösterimi (Ittman 2018).

2.1.2. Prostat Bezinin Anatomisi

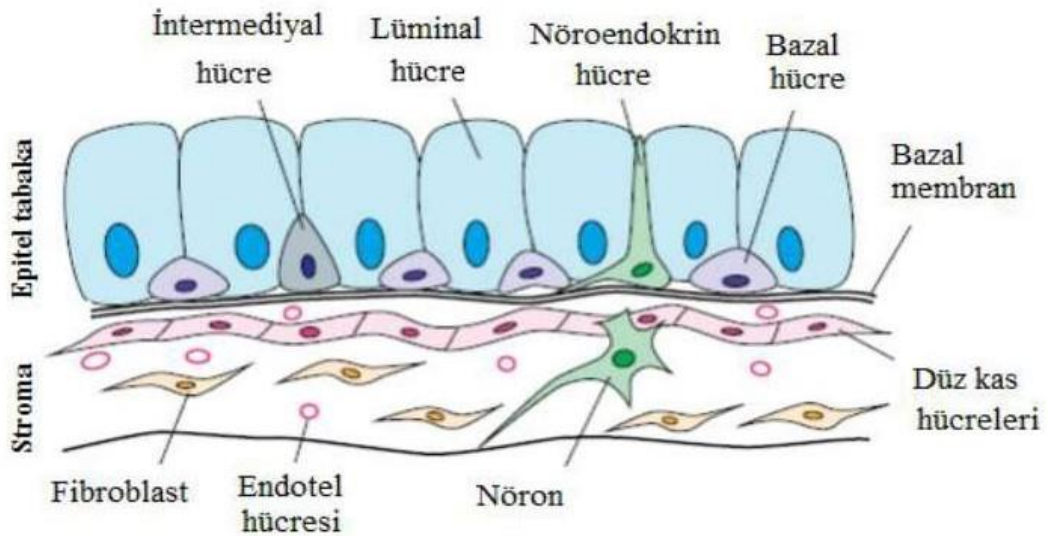
İnsan prostatı, mesane boynu ile genitoüriner membran arasındaki üretrayı çevreleyen, soluk sert ekzokrin bir bez olup, kadınlardaki skene bezinin homoloğu olarak bilinir. Sağlıklı prostat bezi, 4 cm genişliğinde, 3 cm uzunluğunda, 2 cm derinliğinde ve 18-20 g ağırlığındadır (Saunders 1998). Prostat bezi, büyüklük ve şekil bakımından cezive benzetilmekte olup, çevresindeki fasiyal dokudan ayırt edilemeyen, 2-3 mm kalınlığında bir fibromüsküler doku ile çevrilidir (Coakley ve Hricak 2000). Prostat bezi; psödokapsül içinde sıkı bir şekilde kaynaşmış glandüler ve stromal bileşenlerden oluşur. Prostat kapsülünün iç tabakası düz kasla, dış

tabakası ise kollajenle kaplıdır (Bhavsa ve Vera 2014, Çalışkan ve ark. 2019, Henry ve ark. 2019). Henry ve ark. 2018 yılında yapmış oldukları bir çalışmaya göre; insan prostatının bölgesel anatomisi John McNeal tarafından yüzlerce kadavra örneği kullanılarak belirlenmiştir. McNeal'ın şeması yetişkin insan prostatını ön fibromüsküler bölge ve üç glandüler bölgeye ayırır. Merkezi bölge: boşaltıp kanallarını, geçiş bölgesi: üretrayı çevreleyen ve periferik bölge: her ikisini de çevreler (Henry ve ark. 2018). Farelerde ise prostat bezi, üretrayı çevreleyen ve anterior, dorsal, ventral ve lateral olarak adlandırılan dört loba ayrılır. Prostat lobları, çevredeki dokulardan kıvam ve görünüm olarak farklı olup, yarı saydam ve beyaz renktedir (Zingiryan ve ark. 2017). Fare prostatındaki lobların çıplak gözle ayırt edilmesi, birkaç milimetre büyüklüğünde olması ve yağ dokusuyla kaplı olmasından dolayı zordur bu nedenle ancak diseksiyon mikroskobu altında VP, LP, DP ve AP lobları birbirlerinden ayırt edilebilirler (Hu ve ark. 2021). VP; üretranın önünde ve mesanenin kaudalinde bulunur. LP ise VP lobunun ve üretranın her iki yanında bulunur. Kelebek şeklinde olan DP lobları, mesanenin dorsolateralinde yer alan boynuz şeklindeki anatomik yapısı ile kolayca tanınan seminal veziküllerin tabanında yer alır. LP ve DP'ye genellikle dorsolateral prostat (DLP) prostat olarak adlandırılır, fakat histolojik yapılarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Anterior lob ise seminüla vezikülarislerin hemen altında bulunur (Oliveira ve ark. 2016, Ittmann 2018, Hu ve ark. 2021). İnsan ve fare prostatları hücresel benzerliklerin yanı sıra anatomik olarak farklılıklar sergilemektedir. Transkriptome profillerine göre, farelerdeki dorsolateral prostat lobu, insan prostatının periferik bölgesine benzemektedir (Wang ve ark. 2018).

2.1.3.Prostat Bezinin Histolojisi

Prostat salgısı, seminal sıvının yaklaşık %30'unu oluşturur. Üreme için spermatozoanın hayatta kalmasına yardımcı olan enzimleri, çinko ve prostat spesifik antijen (PSA) gibi temel unsurları içerir. İnsan prostat bezi lobüler olup, periferik, geçişli ve merkezi olmak üzere üç bölgeden oluşur. Sıçanlarda dört lob da, zayıf dallanmış, fare prostatına kıyasla geniş ve karmaşık dallanma yapıları sergiler. Dahası, LP farede ilkel olsa da, sıçan LP'si belirgin LP1 ve LP2 olarak dallanmış yapılara sahip olup, embriyolojik ve histolojik olarak insan prostatına daha çok benzediği düşünülmektedir (Huang ve ark. 2007). Tüm loblar; salgı epitel hücreleri,

bazal hücreler ve az sayıda nöroendokrin hücrelerden oluşur (Oliveira ve ark. 2016). Yine tüm prostat lobları bir mezotelyum ile çevrili olup birbirlerinden lifli ve yağlı bağ dokusuyla ayrılırlar. Prostat loblarını oluşturan asiniler, fibromüsküler bir tunika ile çevrilidir ve birkaç stromal hücre ve kolajen lifi içeren gevşek bir bağ dokusuna gömülüdürler (Oliveira ve ark. 2016). Prostat bezinde lobların histolojisi, hücrelerin organizasyonu ve salgısı loptan loba değişir (Toivanen ve Shen 2017, Wang ve ark. 2001, Bonkhoff ve Remberger, 1998, Alan ve ark. 2007, Deger 2015). Histolojik olarak anterior loblar, sık epitelyal kıvrımlara ve güçlü eozinofilik salgı yapan orta ve büyük asinüslere sahiptir. Dorsal loblar, eozinofilik salgıya sahip ön loblar gibi görünür ancak anterior loplardan çok daha küçük asinüslere ve daha az epitelyal kıvrımlara sahiptir. Lateral loblar ise karakteristik olarak düz lüminal sınırları olan ve eozinofilik salgıya sahip olan asinüsları küçük ila büyük olabilir. Ventral loblar, lateral loblara yapısal olarak benzer olmakla birlikte soluk, eozinofilik olmayan bir salgıya sahiptir (Nath ve ark. 2018, Ittmann 2018).



Şekil 2: Prostat bezinin histolojik yapısı (Toivanen ve Shen 2017).

2.1.4. Prostat Bezinin Hastalıkları

Prostat bezi, iyi huylu ve kötü huylu birçok hastalığın doğrudan hedefidir. Tüm prostat hastalıkları arasında, prostatit doğurganlığı en yüksek düzeyde etkileyen hastalık olup, yapılan incelemeler prostat iltihabının doğurganlık ile doğrudan

bağlantılı olduğunu göstermektedir (Verze ve ark. 2016).

2.1.5.Prostatit

Prostatit, pelvik ve alt karın bölgelerinde yaygın ağrı, obstrüktif ve erektil disfonksiyon dahil olmak üzere çeşitli karmaşık semptomlara sahip prostat bezlerinin inflamatuvar hastalığıdır. Prostatit kendi içinde dört kategoriye ayrılır: akut bakteriyel prostatit, kronik bakteriyel prostatit, kronik prostatit/kronik pelvik ağrı sendromu (KP/KPAS) ve son olarak asemptomatik inflamatuvar prostatit (He ve ark. 2023). Prostatit erkeklerde, iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) ve prostat kanserinden sonra en sık görülen idrar yolu hastalığıdır. Prostat yangısı, hem prostat büyümesine hem de iyi huylu prostat hiperplazisine zemin hazırlaması nedeniyle önem arz etmektedir (Magri ve ark. 2019).

2.1.6.Prostat Bezinin Proliferatif Hastalıkları

Genellikle insanlarda, Bening Prostat Hiperplazisi (BPH) olarak bilinen prostat bezinin iyi huylu hiperplazisi, üriner semptomlar ile kendini gösteren, geçiş bölgesi (TZ) ile periüretral alanın epitelyal ve fibromüsküler dokularının düzensiz hiperplastik büyümesine bağlı olarak şekillenen prostat bezinin proliferatif bir hastalığıdır (Shapiro ve ark. 1992, Devlin ve ark. 2021). Hiperplastik prostatın üretraya uyguladığı mekanik bası sonucu servikal-üretral obstrüksiyona neden olur (benign prostat obstrüksiyonu, BPO) (Vignera ve ark. 2016). Yaşlanma, inflamasyon, büyüme faktörü, epitelyal-stromal etkileşim, androjen reseptörleri, hormonal değişiklikler ve genetik nedenlerle ilişkili şekillenen prostat hipertrofisi, BPH gelişmesine zemin hazırlar (Sciacqua ve ark. 2023). BPH'da prostat bezi, üretra, mesane ve rektuma doğru büyüebilir ve özellikle mesane boynunda meydana getirdiği daralmayla, üreterlerde, mesanede ve böbreklerde patolojik değişikliklere neden olabilir (Bonkhoff ve Remberger, 1998, Emberton ve ark. 2008). BPH'de az miktarda sık sık idrar yapma, azalmış idrar çıkışı, idrar yaparken oluşan ağrı ve mesanenin tam olarak boşaltılamaması hissi görülen bulgulardandır (Sciacqua ve ark. 2023).

2.1.6.1.Prostatın Preneoplastik Lezyonları

İnsanlarda prostat bezinde, periferik zondan köken alanlar prostatik intraepiteliyal neoplazi (PİN) ile transizyonel zondan köken alanlar ise atipik adenomatöz hiperplazi (AAH) adı verilen iki adet preneoplastik lezyon tanımlanmıştır.

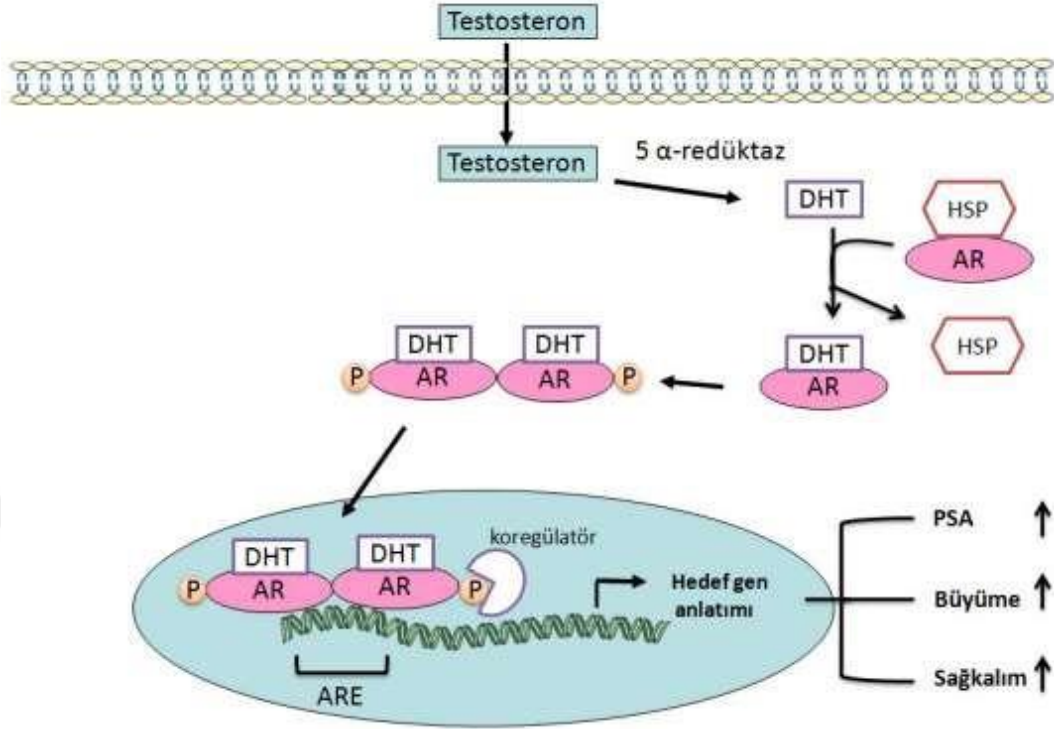
2.1.6.1.1. Prostatik İntraepiteliyal Neoplazi (PIN)

PIN, prostat bez epitellerinin neoplastik olarak çoğalmasını ifade eder. (Ruusuvoori ve ark. 2016). PIN, prostatın fenotipik ve genotipik özelliklerinde meydana gelen değişikliklerle ilişkilidir. PIN biyopsi yoluyla tespit edilmekte ve adenokarsinom için belirteç rolü oynamaktadır (Abd Wahab ve ark. 2020). PİN lezyonları PCA yavaş evrilmektedir ve bu da PCA önlemek için geniş bir zaman aralığı sağlamaktadır (Abu El Maaty ve ark. 2022). Sekretuar hücrelerin sitolojik özelliklerine göre PIN lezyonları, düşük dereceli PIN (DD-PİN) ve yüksek dereceli PIN (YD-PİN) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (McNeal 1969). DD-PİN'i oluşturan hücreler, iri nükleuslu, normal veya düşük düzeyde artmış kromatin içeren, küçük veya göze çarpmayan nükleollere sahip hücrelerdir. YD-PİN ise nispeten uniform, büyük nükleuslu, düzensiz artmış kromatin içerikli ve karsinom hücrelerinininkine benzer şekilde belirgin nükleollü hücrelerle karakterizedir. Mitotik şekiller YD-PİN'de nadirdir ve PİN için bir derecelendirme kriteri olarak kabul edilmemektedirler (McNeal ve Bostwick 1986, Humphrey ve ark. 2016). YD-PİN, invaziv prostat karsinomunun ana öncü lezyonu olarak kabul edilmiştir (Zhou 2018). YD-PİN'de sitolojik olarak invaziv karsinomunu taklit eder, ancak duktal ve glandüler bileşenleri daha sınırlıdır (Goeman 2003, De Marzo ve ark 2016).

2.1.7.Prostat Kanseri (PCa)

PCa erkeklerde en sık rastlanılan ikinci neoplastik hastalıktır (Riabov ve ark. 2015). PCa, teşhisi; prostat bezi biyopsi örneğinin histopatolojik analizi, prostat spesifik antijen (PSA) testi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), dijital rektal muayene veya sağlık taraması ile yapılmaktadır. Prostat kanseri, epidemiyolojik ve genetik temeli olan heterojen bir hastalık olup; risk faktörleri arasında aile, yaş,

obezite ve diğerk çevresel faktörler yer almaktadır (Sekhoacha ve ark. 2022). PCa vakalarının %95'inden fazlasını adenokarsinomlar oluşturur ve bunların çoğuş asiner kökenliyken, az bir kısmı ise duktal kökenlidir. Prostat adenokarsinomlarının yaklaşık %80'ni, prostat dokusunun büyük bir bölümünü oluşturan periferik bölgedeki lüminal veya bazal (daha az yaygınlıkta) epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır (Wang ve ark. 2018). Prostatta kötü huylu bir tümörün gelişimi, prostat intraepitelyal neoplazi (PIN) ile başlayan, sonrasında lokalize prostat kanseri ve daha sonra lokal invazyonla ileri prostat adenokarsinomuna dönüşen ve son olarak metastatik prostat kanserine evrimleşen çok aşamalı bir süreci içerir. PCa'nin temel özelliğı, hormon duyarlılığıdır ve ilk olarak kastrasyonun prostat kanseri hastalarında tümör gerilemesine yol açtığını bildirilmiştir. Androjen yolunu bloke eden ajanların kullanıldığı, androjen yoksunluk tedavisi (ADT), PCa için standart bir tedavi yöntemi haline gelmiştir. Tümörün ilerlemesiyle birlikte ADT'ye direnç gelişebilir ve bunun sonucunda birincil kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) veya metastatik CRPC (mCRPC) gelişir (Wang ve ark. 2018). PCa'da ölüm çoğuşlukla kanser hücrelerinin retroperitoneal ve pelvik lenf düğümlerine, omurilik, rektum, mesane, kemik, akciğerk ile beyin gibi bölgelere metastaz yapması sonucunda gerçekleşir (Schatten 2018).



Şekil 4: Androjen bağımlı prostat kanserinin moleküler mekanizması

2.1.7.2. Androjen-bağımsız prostat kanseri

Hemen hemen tüm prostat kanserleri androjene bağımlı olarak başlar ve bu nedenle hastalara ilk olarak androjen yoksunluk tedavisi uygulanır. Fakat bazı kanser hücreleri tedavi sırasında kalan tümör hücrelerinden androjenden bağımsız prostat kanseri gelişebilir. Bu noktada, androjen bağımsız prostat kanserine yönelik tedaviler yetersiz kaldığından dolayı hastalık çoğunlukla ölümcüldür (Saraon ve ark. 2014, Riaz ve ark. 2023).

2.1.7.3. Prostat Spesifik Antijen

Prostat spesifik antijen (PSA), prostat epiteli ve periüretral bezler tarafından üretilen bir serin proteazı olup, kanser için en sık kullanılan serum belirteçidir ve prostat kanseri hastalarında serumdaki düzeyi 105 kata kadar artabilmektedir (Balk ve ark. 2003, Han ve ark. 2004, Gao ve ark. 2022). İlk olarak 1979 yılında Wang ve arkadaşları PSA'nın varlığını bildirmiş ve takibinde Papsidero ve arkadaşları (1980) yaptıkları bir çalışmada, prostat kanseri hastalarından alınan kan örneklerinde

PSA'nın varlığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın ardından tüm dünyada serum PSA düzeyi, PCa taramalarında, tümör agresifliğinin objektif bir şekilde değerlendirilmesi, uygun tedavi stratejilerine karar verilmesi ve tedavi sonuçlarının yorumlanmasında önemli bir belirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır (Wang ve ark. 1979, Papsidero ve ark. 1980, Ito ve ark. 2014). PSA geninin transkripsiyonu normalde androjenler tarafından androjen reseptörü (AR) aracılığıyla düzenlenir ve genellikle, iyi differensiyel PCa hücreleri AR'ye bağımlı ve PSA pozitifken, zayıf differensiyel PCa hücreleri AR'den bağımsız ve PSA negatiftir (Sasaki ve ark. 2016).

2.1.7.4.Serbest/total PSA (s/t PSA)

PCa için önemli bir serum belirteci olan PSA, prostatit ve BPH vakalarında da artış göstermektedir. PSA düzeyleri 4-10 ng/mL arasında olan hastaların sadece %25'inde PCa rastlanılmakta olup, bu sonuç PSA'nın özgüllüğünü azaltmakta ve gereksiz biyopsilere neden olmaktadır. Bu nedenle; PSA dansitesi, transizyonel zon hacmi ile uyumlu PSA dansitesi (PSATZ dansitesi), serbest/total PSA oranı gibi PSA'nın özgüllüğünü arttıracak farklı değerlere başvurulmuştur. Bunlar arasından serbest PSA (sPSA)/total PSA (Tpsa) oranı PCa için önem arz etmektedir (Sahillioğlu ve ark. 2008). sPSA, PCa tanısında kullanılan önemli belirteçlerdendir. Gri zondaki (4,1-10 ng/mL) düşük sPSA/ tPSA değerleri PCa'a bağlı PSA artışına işaret etmektedir. İmmunoassay tanı yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte sPSA/tPSA oranlarının PCa hastalarında daha düşük olduğu saptanmış olup, düşük sPSA/tPSA değerlerinin daha agresif PCa ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Serbest PSA/total PSA oranı 0.25 olanların çoğunda %8 oranında PCa görülmektedir (Kutlu ve Köksal 2012).

2.1.7.5.Prostat Kanserinin Derecelendirilmesi

Prostat adenokarsinomları; biyolojik olarak düşük differensiyel tümörlerden yüksek dereceli, agresif malignitelere kadar değişen, geniş bir morfoloji ve klinik davranış spektrumuna sahip kanser türleridir. Patologlar tarafından prostat kanserinin teşhis edilip, derecelendirilmesinin doğru bir şekilde yapılması, hasta yönetimi ve tedavi planlamasında kritik bir role sahiptir (Baraban ve Epstein2022). PCa'nın histopatolojik değerlendirilmesi için, 1966 ve 1974 yılları arasında Donald Gleason

ve Veterans Administration Kooperatif Ürolojik Araştırma Grubu tarafından gleason skorlaması geliştirilmiştir. (Epstein ve ark. 2006). Daha sonra 1974, 1977 ve 2005 yıllarında bu skorlama modifiye edilmiş ve 2014 yılında, Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP) tarafından son düzenlemeleri yapılarak günümüzde kullanılan güncel hali oluşturulmuştur (Epstein 2018, Compérat 2019). Evrelemede ise kanserin organla sınırlı olması (T evresi), lenf düğümlerine yayılım göstermesi (N evresi) ve uzak dokuya metastaz yapması (M özellikleri) baz alınmıştır. Bu skor esas olarak morfoloji, histoloji ve patolojiye dayanarak kanser ilerlemesinin normal dokuya göre derecesini karşılaştırır ve klinik evre, hastalık progresyonu ile sağkalım oranını belirler (Schatten 2018). Skorlama sistemine göre PCa histolojik özellikleri bakımından en iyi differansiyeden en kötü diferansiyeye doğru beş kategoriye ayrılır (Epstein ve ark. 2006). Gleason skorlaması şu şekilde yapılmaktadır; en sık ve ikinci sık gözlenen paternler toplanır ve sonuç 2 ile 10 arasında bir değer alır. Eğer tümör tek bir histolojik paternde gözlenmişse o zaman patern iki ile çarpılır ve skora ulaşılır. Eğer ikiden fazla histolojik paterne sahipse tümoral dokuda en sık izlenen histolojik patern ile en yüksek dereceli paternin toplanması sonucunda Gleason skoruna ulaşılır. Kısacası Gleason skoru 1'den oluşan tümörleri temsil eden 2 (1+1=2) ile tamamen farklılaşmış agrasif tümörleri temsil eden 10 (5+5=10) arasında değişen bir skora sahiptir (Şekil 5), (Epstein 2010, Humphrey ve ark. 2016, Bahçivan 2021).

Gleason Paterni



Şekil 5: Gleason paterni (Cooperberg ve ark. 2005).

Büyük ölçüde revize edilmiş bu derecelendirme sisteminde grade 1; Gleason skoru <6, grade 2; Gleason skoru 3 + 4 = 7, grade 3; Gleason skoru 4 + 3 = 7, grade 4; Gleason skoru 8 ve grade 5; Gleason skoru 9-10'dur. (Epstein ve ark. 2016). Son yıllarda 2 ile 10 arasındaki ölçeğe dayanarak, hekimler artık biyopsilerde bulunan kanserler için 5 veya daha düşük Gleason skorlarını kullanmıyor, bunun yerine düşük dereceli PCa ifade etmek için en düşük puan olarak skor 6'ı kullanmaya başlamışlardır. Gleason skoru 7, hücrelerin orta derecede farklılaştığını ve sağlıklı hücrelere kıyasla patolojik bir görünüme sahip olmadığını gösterirken, Gleason skoru 8, 9 ve 10 ise, hücrelerin az diferensiyel olduğunu gösterir (Baydar ve Epstein 2009).

Prostat karsinomunun kesin tedavisine yönelik karar; klinik evre, hasta yaşı, ameliyat öncesi PSA seviyesi, hastanın genel sağlığı, yaşam beklentisi gibi birden fazla faktöre dayanırken, iğne biyopsisindeki Gleason derecesi, hastaları farklı tedavi yöntemlerine yönlendirmeye yardımcı olabilecek başka bir değişkendir (Baydar ve Epstein 2009, Schatten 2018, van Leenders ve ark. 2020).

Tablo 1. ISUP 2014 gradeleme sistemi (Baydar ve Epstein 2009).

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

Gleason Patern 1 (Grade 1): Birbirlerinden eşit mesafelerle ayrılmış aynı boyut ve şekildeki yuvarlak asinuslerden oluşan sınırları belirgin nodüler yapılarıdır. Günümüzde Gleason 1+1=2 skor prostatik adenokarsinomunun bulunmadığı, skor 2 olarak belirlenen vakaların günümüzde atipik adenomatöz hipeplazi (adenozis) olarak isimlendirilebileceği düşünülmektedir (Cooperberg ve ark. 2005).

Gleason Patern 2 (Grade 2): Gleason patern 2, Gleason patern 1 gibi düzenli bir oluşum sergileyen, dışa doğru neoplastik olmayan, prostat bez lümenlerine doğru çıkıntılanma sergileyen, düzgün, sınırlı nodüller görülmektedir. Bezler daha gevşek bir yapıya sahiptir. Asinusların şekil ve boyutunda az da olsa heterojenite gözlenir.

Gleason Patern 3 (Grade 3): PCa da sık görülen paterndir. Asinuslar stroma içinde, çoğunlukla normal duktuslar arasında düzensiz dağılmış olup, bezler arasındaki mesafe değişkendir. Tümöral nodülün sınırları belirgin değildir. Neoplastik bezler birbirinden farklı şekil ve boyuttadır (Baydar ve Epstein 2009).

Gleason Patern 4 (Grade 4): Düzensiz, büyük, elek benzeri bezlerden veya belli belirsiz lümenlere sahip iyi sınırlanmamış bezlerden oluşur. Kribriiform veya glomerüloid şekil sergileyen tüm bezlerin şekline ve boyutuna bakılmaksızın patern 4 olarak kabul edilir.

Gleason Patern 5 (Grade 5): Stroma içinde tek tek infiltrasyon gösteren hücreler, hücre kordonları oluşturmayan solid hücre yapısı sergileyen tümörlerdir. Normal yapılar tamamen ortadan kalkmıştır. Komedonekroz sergileyen kribriiform bezler de bu patern içinde değerlendirilmektedir (Baydar 2017, Baydar ve Epstein 2009).

Prostat kanseri nispeten insana özgü bir kanser türü olup, farede doğal olarak

oluşan bir prostat kanserine rastlanılmamıştır. Araştırmacılar prostat kanserinin önlenmesi, teşhisi ve tedavisi için yeni stratejiler, bu hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan spesifik moleküler mekanizmaların belirlenmesi amacıyla çeşitli deneysel modeller tasarlamışlardır. Bu modeller arasında en çok tercih edilen atimik nüde farelere insan prostat kanseri hücre hattı verilerek oluşturulan ksenograft modellerdir. İnsan ve fare prostat dokusunun anatomik ve histolojik olarak farklılık göstermesi nedeniyle oluşan tümöral kitlelerin histolojisinde de az da farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar insan prostat kanserinin derecelendirilmesinde kullanılan gleason skorunun farelere tam olarak uygulanamamasına neden olmuştur (Wu ve ark. 2006).

2.1.7.6.Prostat kanserinin Histolojik Varyantları

Prostat kanseri; asiner adenokarsinom, duktal, nöroendokrin, müsinöz ve taşlı yüzük benzeri karsinom olmak üzere beş histolojik varyanta ayrılır. En sık rastlanılan histolojik varyant asiner adenokarsinomken nadir olarak da diğer varyantlar görülmektedir (Siech ve ark. 2024).

Asiner Adenokarsinomun Varyantları

Prostat adenokarsinomlarının %90'ından fazlasını asiner tipte gözlemlenir ve infiltratif büyüme gösteren küçük bezlerin proliferasyonu ile karakterizedir. Asiner prostatik adenokarsinomun alt varyantları ise şunlardır: Atrofik, psödohiperplastik, mikrokistik, köpüksü, müsinöz (kolloid), taşlı yüzük benzeri, pleomorfik dev hücreli ve sarkomatoittir. İlk dört oluşum (atrofik, psödohiproplastik, mikrokistik ve köpüksü) mikroskobik olarak benign görünürlere ve teşhisleri oldukça zordur. Son üç varyant ise (taşlı yüzük benzeri, pleomorfik dev hücreli ve sarkomatoid) ise kötü prognoza sahiptir (Humphrey 2012).

Atrofik: Atrofik varyantta bulunan bezler oval ya da yuvarlak yapıda olup normal bezlere oranla daha küçüktürler. Atrofik patern adenokarsinomlarının çoğunun, Gleason paterni 3 olarak kabul edilir. Atrofik özelliklerin varlığı prognoz açısından iyi olarak değerlendirilir (Singh ve ark. 2020). Atrofik adenokarsinom ile patolojik organ atrofi arasındaki fark kritik öneme sahiptir. Patolojik bez atrofisinde infiltratif büyüme, nükleer atipi ve bazal hücrelerin yokluğu görülmezken, atrofik

adenokarsinomda ise bu bulgular görülmektedir (Humphrey 2018).

Mikrokistik adenokarsinom: Asiner PCa'nın iyi prognozlu alt tipidir. Mikrokistik adenokarsinomda kistik olarak genişlemiş neoplastik bezler bulunmaktadır. Mikrokistik asiner adenokarsinom, küçük asiner adenokarsinom bezlerinin 10 katı büyüklüğünde olan orta büyüklükteki bezlerle karakterizedir. Mikroskopik olarak, lüminal boşlukların genişlemesi sonucunda bezler yuvarlak bir yapı oluşturur ve bazal membran tabakası düzdür, atrofik değişiklikler görülebilir. Gleason paterni 3'tür. Radikal prostatektomide tespit edilme oranı%11'dir (Humphrey 2018, Siech ve ark. 2024).

Psödohiperplastik adenokarsinom: İyi huylu hiperplastik bezleri taklit eden dallanma ve papiller uzanımlar gösteren, kistik dilatasyonlarla karakterize adenokarsinom türüdür. Bazı vakalarda; çekirdekler yuvarlak ve tipik olarak belirgin nükleollere sahiptir. Özellikle köpüklü sitoplazmik özelliklere sahip hücrelerde nükleer atipi görülebilir (Sarı ve ark. 2006). Psödohiperplastik adenokarsinomların Gleason patern 3 olup, psödohiperplastik görünüm patolojik evreyi etkilememektedir (Humphrey ve ark. 1998).

Köpüklü bez adenokarsinomu: Köpüklü bez adenokarsinomu, bol köpüklü sitoplazma, infiltratif bez yapısı ve pembe homojen salgularla karakterizedir. Nükleer atipinin olmaması, özellikle teşhiste zorluk yaratabilir. Mikroskopik olarak, köpüklü bez adenokarsinomun sık görülen histolojik yapısı, hücrelerde piknotik çekirdeklerle birlikte bol miktarda köpüklü veya ksantomatöz tip sitoplazmanın bulunmasıdır. Çoğu köpüklü bez adenokarsinomunun Gleason skor genellikle 6 veya 7'dir, fakat bazı vakalarda Gleason skor 8-10 olarak da değerlendirilir (Nelson ve ark. 1996).

Müsinöz adenokarsinomlar: Tipik olarak prostat parankimasından köken alırlar ve prostat spesifik asit fosfataz (PSAP) ve PSA ile pozitif boyanırlar. Tümöral alanın en az %25'i hücre dışı müsin gölcüklerinden oluşur. Tüm prostatik adenokarsinomların ancak %0,3'ünü oluştururlar. Histopatolojik olarak tümör hücreleri müsin içinde bulunur. Gleason skorları genellikle 7'dir ancak nadiren de olsa veya 8'de olabilir (Marcus ve ark. 2012).

Prostatın sarkomatoid karsinomu: Hem epitel hem de mezenkimal bileşenlerden oluşan nadir görülen fakat agresif neoplazmalardır. Prostatın kötü

huyulu tümörlerinin %0,1'inden azını oluştururlar. Lokal olarak büyür ve oldukça kısa bir süre içinde distal bölgelere metastaz yaparlar. Lokalize hastalık ameliyat ve/veya radyoterapi ile tedavi edilebilirse de bu hastaların prognozu çoğunlukla kötüdür (Nazım ve ark. 2013, Jayasinghe, ve Abeysinghe 2022). Karsinomatöz bileşenler hemen hemen her zaman asiner tipte olmakla birlikte nadiren de duktal adenokarsinom, skuamöz veya adenoskuamöz karsinom ve karışık ürotelyal skuamöz bileşenler de bulunabilir. Sarkomatoid kısım ise kemik ve kırık gibi belirli mezenkimal hücrelerin farklılaştığı heterolog yapılar şeklinde olabilir. Gleason skoru 6 veya 8 olarak bildirmiştir (Zizi-Sermpetzoglou ve ark. 2010, Humphrey 2018). Nadir bir varyant olan **pleomorfik dev hücreli adenokarsinom**, pleomorfik tuhaf, dev hücrelerin varlığıyla karakterizedir. Pleomorfik dev hücreli PCa genellikle düzenli çekirdek yapısına sahiptir, bu nedenle bu varyantta nükleer atipi nadirdir. Bu tümörler çok agresiftir (Cimadamore ve ark. 2020).

Duktal adenokarsinom: Asiner adenokarsinom, prostatın tüm primer karsinomlarının %90'ından fazlasını oluştururken, prostat karsinomunun ikinci en sık görülen histolojik alt tipi duktal adenokarsinom olup, prostat asiner adenokarsinomundan daha agresif davranış sergilerler. (Kobayashi ve ark. 2023) İlk olarak 1967'de Melicow ve Pachter tarafından tanımlanmıştır (Ranasinha ve ark. 2021). Hastalarda, klinik olarak hematüri, idrar tıkanıklığı, idrar akımında azalma veya idrar retansiyonu görülebilir. Sistoskopik incelemede; üretradan dışarı doğru çıkıntı yapan, villöz veya frajil polipoid lezyon görülebilir. Tümör uzun, psödostratifiyeye, sütunlu epitelden oluşur. Çekirdekler bazal yerleşimlidir ve belirgin nükleoller, mitotik figürler ve lümende nekrotik hücreler görülebilir. Papiller, elek şeklinde, solid veya glandüler yapı sergileyebilirler. Genellikle bir tanesi baskın olsa da birkaç histolojik yapı bir arada da görülebilir. Papiller histoloji, gerçek fibromusküler yapı ile karakterize iken, elek benzeri desen sırt sırta büyük bezler ve yarık benzeri lümenler oluşturan, intraepitelyal köprüleşme gösterir. ISUP 2005 Gleason derecelendirme sisteminin modifiye edilmesiyle, komedonekroz mevcut olmadığı sürece saf bir DAC'nin GS 4+4=8 olarak kabul edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Seipel ve ark. 2016, Amin 2018, Ranasinha ve ark.2021).

İntraduktal Karsinom: Prostatın intraduktal karsinomu (IDC-P) genellikle yüksek dereceli, agresif asiner adenokarsinomlarla ilişkilidir. IDC-P' nun prostat

kanalları boyunca yayılması sonucu oluşan ve bazal hücrelerin korunduğu, yoğun elek benzeri desenlerin olduğu ya da belirgin nükleer atipi (nükleer boyutun normalden 6 kat fazla veya daha büyük olması) ile komedonekrozun görüldüğü yapılarıdır (Ortiz-Rey ve ark. 2022). İntraduktal karsinom Gleason derecesine sahip değildir. İntraduktal karsinom hem patolojik hem de klinik sonuçlarına göre değerlendirildiğinde agresif prostat kanseri ile bağlantılıdır. Mikroskopik olarak, prostatik duktuslar ve asiniler, sağlıklı prostat bezine kıyasla 2 kat daha fazla genişlemiştir. Tümöral kitle gevşek, solid, mikropapiller ya da yoğun kribriform patern sergileyebilirler. İntraduktal karsinomada gleason skoru, intraduktal karsinomla beraber bulunan invaziv karsinom alanları baz alınarak hesaplanır. İntraduktal karsinomlar, radikal prostatektomilerde %20-40 oranında tespit edilirler ve periferel zonda yüksek dereceli, hacimli ve ileri evre asiner adenokarsinomlarla beraber bulunurlar. Biyopsilerde ve radikal prostatektomilerde bu varyantın tespit edilmesi, kötü bir prognozun belirtisidir (Robinson ve ark. 2012, Divatia ve Ro 2016, Tolkach ve Kristiansen 2019).

2.1.7.7. Teşhis yöntemleri

Prostat kanseri yavaş gelişim gösteren bir kanser türü olup, lokalize prostat kanserlerinin (T1-2) büyük çoğunluğu asemptomatiktir. Semptomatik olan hastalarda üriner sistem semptomları, hematüri, hematospermi, ağrı veya idrar yaparken yanma şikayetleri görülür. Transrektal ultrason (TRUS) eşliğinde biyopsi, PSA, PRM ve multiparametrik manyetik rezonans görüntüleme (mpMRG) PCa teşhisinde kullanılan yöntemlerdir (Yencilek ve ark. 2018).

2.1.7.8. Prostat kanserinde Tedavi

PCa için tedavi seçenekleri, kemoterapi, radyasyon tedavisi, hormonal tedavi, cerrahi ve kriyoterapidir. Bir hastaya sunulan tedavi seçenekleri tümörün doğasına, PSA seviyesine, derecesine ve nüks ihtimaline bağlıdır. Örneğin, prostat ve yakındaki dokuların çıkarılmasını içeren bir cerrahi seçenek olan radikal prostatektomi, çoğunlukla radyasyon tedavisiyle kombine edilerek kullanılır. Mevcut tedavi seçenekleri pahalı olup, ciddi yan etkilere neden olur (Sekhoacha ve ark. 2022).

Radikal Prostatektomi: Radikal prostatektomi, prostat bezinin açık ve/veya laparoskopik cerrahi ile tıbbi olarak çıkarılması prosedürüdür. Prosedür, karında veya perineum yoluyla küçük kesiler yapılarak gerçekleştirilir (Sekhoacha ve ark. 2022).

Kriyoterapi: Bu yöntem, ultrason eşliğinde prostat içine kriyoprobların cerrahi olarak yerleştirilmesini kapsar. Prostat bezi yaklaşık 10 dakika boyunca -100 °C ila -200 °C arasındaki bir sıcaklığa kadar dondurulur. Ancak, idrar tutamama ve idrar retansiyonu, erektil disfonksiyon, fistül ve rektal ağrı dahil olmak üzere çeşitli komplikasyonlar ortaya çıkabilir (Mouraviev ve ark. 2006).

Brakiterapi: Brakiterapi, TRUS eşliğinde enjeksiyonlar veya teller yardımıyla radyoaktif maddelerin doğrudan prostat bezine verilmesini içerir ve genellikle iki farklı teknikle yapılır. Bunlar; düşük doz ve yüksek doz oranlarıdır. Düşük doz oranı, radyoaktivitesini kademeli olarak kaybeden prostat dokusuna tohumların kalıcı olarak implantasyonunu ifade eder ve ikincisi, diğer çevre organlara sızıntı riski önemli olan prostat dokularına bir doz radyasyon verilmesini ifade eder. Brakiterapinin avantajı, bir gün veya daha kısa sürede işlemin tamamlanabilmesidir. Dezavantajları ise genellikle genel anestezi gerektirmesi, akut idrar retansiyonu riskleridir (Wallner ve ark. 1997).

2.2.Toll Like Reseptörler

TLR'ler, enfeksiyonlara ve hücresel hasara karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan tip I transmembran proteinleridir (Takeda ve ark. 2003, Dajon ve ark. 2017). Toll, başlangıçta *Drosophila* embriyosunun dorsal-ventral eksenini kontrol eden bir gen olarak keşfedilmiştir, ancak daha sonraki çalışmalar, yetişkin sineklerde antifungal bağışıklıkta rol oynadığını ortaya koymuştur (El-Zayat ve ark. 2019). *Drosophila* Toll'un sitoplazmik bölgeleri ile memeli IL-1 reseptörü arasındaki benzerliğin belirlenmesini takiben, memelilerde benzer reseptörlerin araştırılmasına yönlendirmiş ve bu durum insanlarda TLR'lerin (daha sonra TLR-4 olarak adlandırıldı) keşfine yol açmıştır (Medzhitov ve ark. 1997 Pandey ve Agrawal 2006). *Drosophila* Toll reseptörü memelilerde ilk defa 1997 yılında Medzhitov ve meslektaşları tarafından hToll (şimdi TLR-4 olarak adlandırılmaktadır) olarak tanımlanmıştır (Medzhitov vd., 1997). Daha sonraki çalışmalar, TLR-4 ile yapısal olarak ilişkili birkaç proteini tanımlamış ve bunlar Toll benzeri reseptörler (TLR'ler)

olarak adlandırılmıştır (Akira ve ark. 2001, Takeda ve Akira 2015). TLR'ler; canlının, patojenleri tanınmasını ana moleküllerdir. Tanınan patojene ait bilgiler hücre zarı boyunca iletilir ve nihayetinde sinyal çekirdeğe ulaştırılır ve böylece patojene karşı uygun yanıtı başlatmak için belirli gen bölgeleri etkinleştirilir (Warren ve Shaw 2005). Bugüne kadar TLR'nin insanlarda 10, farelerde 12 alt tipi tespit edilmiştir. Keşfedilen bu reseptörlerden bazıları (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 ve TLR-11) plazma membranında yer alırken bazıları (TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9) ise endosomlarda bulunmaktadır (Aluri ve ark. 2021, Shafeghat ve ark. 2022). Tüm TLR'ler üç bölümden oluşur, Bunlar; lösin açısından zengin bir N-terminal ligand bağlanma alanı, ikincisi tek geçişli bir transmembran alanı ve üçüncü alan ise esas olarak MyD88 olmak üzere çeşitli adaptör proteinlerle etkileşime giren korunmuş bir C-terminal hücre içi toll/IL-1R (TIR) sinyal alanıdır (Nouri ve ark. 2021). Değişken N-terminal ligand bağlanma alanı patojenle ilişkili moleküler yapıların (PAMP) tanınmasında rol oynarken, hücre içi TIR (Toll/IL-1R) alanı ise sinyal yolaklarını aktive etmektedir (Zhang ve Liang 2016). TLR'ler makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler (DC'ler), doğal katil (NK) hücreleri, mast hücreleri, T ve B hücreleri ile farklı tümör hücrelerince eksprese edilirler (Pahlavanneshan ve ark. 2021). Bu hücreler dışında tüm TLR'lerin transkriptomik veya proteomik düzeyde de birçok organda (deri, iskelet kasları, beyin, omurilik, kalp, böbrek, mesane, tükürük bezi, ince bağırsak, kolon, karaciğer, pankreas, dalak, trakea, bronşlar, akciğer, plasenta, uterus, yumurtalıklar, prostat, testis, timus, tiroid bezi ve adrenal bezi) varlığı tespit edilmiştir (Kutikhin 2011). TLR'ler, hem PAMP'leri hem de iç hasar ilişkili moleküler bileşenleri (DAMP'ler) tanıyıp bağışıklık reaksiyonunu başlatırlar (PRR) (Yuk ve Jo 2011). DAMP'ler, hücrelerde normalde bulunan ve nekroz sırasında salınan, inflamasyona katkıda bulunan endojen moleküllerdir. Bunlar arasında; ATP, sitokin IL1 α , ürik asit, kalsiyum bağlayıcılar, sitoplazmik proteinler S100A8 ve S100A9 ve DNA bağlayıcı, nükleer protein HMGB1 sayılabilir. Buna karşılık, PAMP'ler patojen kaynaklıdır, genellikle patojen etkenlerin hayatta kalması için gereklidir. PAMP'ler arasında bakteriyel ve viral nükleik asitler, fungal β -glukan ve α -mannan hücre duvarı bileşenleri, bakteriyel protein flagellin, peptidoglikan bakteri hücre duvarı bileşenleri ve Gram-negatif bakterilerden lipopolisakkaritler (LPS) sayılabilir (Newton ve Dixit 2012).

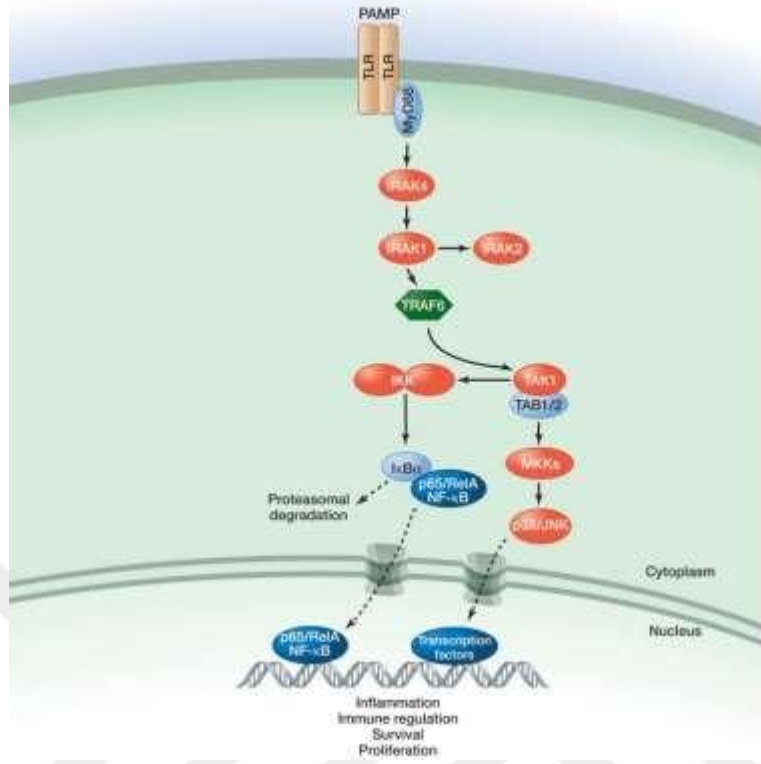
Farklı TLR'ler farklı DAMP ve PAMP sınıflarını tanırlar. TLR-1 ve TLR-6 lipopeptidleri, TLR-2 Gram-pozitif ve Gram negatif bakterilerin spesifik hücre duvarı bileşenlerini, TLR-3 viral çift sarmallı RNA'yı TLR- 4, Gram-negatif bakteriyel lipopolisakkaritin (LPS) spesifik bileşenlerini, TLR-7 ve TLR-8, viral tek sarmallı RNA'yı ve son olarak TLR-9 endosomlardaki viral ve bakteriyel DNA'yı tanıyıp yanıt oluştururlar (Keating ve Bowie 2009, Xie ve ark. 2009).

2.2.1.TLR Sinyalizasyonu

TLR'ler de oluşan uyarılar sonucunda; inflamatuvar yanıt için gerekli olan sitokinler, kemokinler, antimikrobiyal moleküllerin (örneğin hidrolitik enzimler, peptitler, proteazlar) ve adaptif bağışıklık aktivasyonu için gerekli olan yardımcı uyarıcı moleküller de dahil olmak üzere çok sayıda genin ekspresyonunu başlatır (Moresco ve ark. 2011). TLR sinyalizasyonu, miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88'e (MyD88) bağımlı sinyal yol ve MyD88'den bağımsız sinyal yolu olarak ikiye ayrılır. TLR sinyalizasyonunun başlaması, dört adaptör proteine bağlı olup bu proteinler; MyD88, TIRAP (TIR alanı içeren adaptör proteini), TRIF (TIR alanı içeren adaptör, interferon β 'yi indükleyen) ve TRAM (TRIF ile ilişkili adaptör molekülü)'dır (Keating ve Bowie 2009). TLR-3 ve TLR-4 sinyallenmesi hariç diğer tüm TLR'lerin hücre içi sinyalizasyonu , MyD88'e bağımlı olup, MyD88' in fosforilasyonu sonucunda başlar. TLR-3 ve TLR-4 ise MyD88 bağımsız sinyal yolunu kullanarak aktivasyon sağlar ve bu sinyal yolunda TLR-3, TRIF üzerinden TRAF ve IRF3'ü uyararak tip 1 interferon cevabı oluştururken, TLR-4, TRAM üzerinden TRIF'ı uyararak bu tepkiye neden olur. Her iki yol da NF-kB, AP1, CREB, IRF3/7 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar ve bunlar da sırasıyla tip I ve III interferonlar (IFN), inflamatuvar sitokinler/kemokinler, kostimülatör ve adhezyon molekülleri ile antimikrobiyal mediyatörlerin ekspresyonunda görev alan genlerin transkripsiyonunu destekler (Keating ve Bowie 2009, Veneziani ve ark. 2023). TLR'ler tarafından desteklenen inflamasyon, makrofajların ve nötrofillerin aktivasyonu sonucunda meydana gelir. TLR ligandları, makrofajlar tarafından; tümör nekroz faktörü (TNF)- α , IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine yol açarlar. Üretilen bu sitokinler; vasküler endotelin geçirgenliğini artırarak, nötrofillerin mikrovasküler endotel yüzeyine bağlanmasını

ve vasküler sistemden dışarı çıkma eğilimini artırır. TLR'ler nötrofillerin, antimikrobiyal peptitlerin, lökotrienler (inflamasyonun lipid medyatörleri) ve reaktif oksijen türleri gibi küçük moleküllerin salınmasına neden olarak inflamasyonu artırır (Şekil 6), (Moresco ve ark. 2011, Lim ve Staudt 2013). TLR'lerin hastalıklardaki rolleri henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da hastalığına karşı reaksiyonların başlamasında ve ilerlemesinde belirli TLR'lerin rollerini destekleyen önemli in vitro ve in vivo veriler bulunmaktadır (Hennessy ve ark. 2010). Örneğin; 2012 yılında Shi ve ark. TLR-11 ve TLR-5 'in Salmonella enfeksiyonlarındaki rolünü araştırmış ve TLR-11'in Salmonella enfeksiyonlarında TNF- α indüksiyonuna ve sistemik inflamasyona aracılık ettiğini, TLR-5'in ise tam tersi etki göstererek enfeksiyonu baskıladığını bildirmişlerdir (Shi ve ark. 2012). Lim ve Staudt 2013 yılında yayınladıkları bir çalışmada TLR'lerin tekrarlayan bakteriyel veya viral enfeksiyonlara karşı hassas olduklarını gözlemlemişlerdir (Lim ve Staudt 2013). 2013 yılında Weinkopff ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise *Leishmania braziliensis* ile deneysel oluşturulmuş enfeksiyonunda TLR-9 ekspresyonunun etkisini araştırmış ve çalışmada TLR-9 eksikliği olan farelerde, enfeksiyon sonrası lezyon boyutlarında ve parazit yükünde artış olduğunu saptamıştır ve TLR-9'un enfeksiyonun erken döneminde parazit kontrolünde önemli olacağı kanısına varmışlardır (Weinkopff ve ark. 2013).

TLR'ler enfeksiyona karşı koruyucu bağışıklık için gerekli olsa da, fazla miktarda üretilen TLR yanıtları akut ve kronik inflamasyon ile sistemik otoimmün hastalıkların oluşmasında da rol oynarlar. Örneğin; kronik TLR-7 ve/veya TLR-9 aktivasyonu olan bireylerde sistemik otoimmün hastalıkların şekillendiği bildirilmiştir (Kawai ve Akira 2010, Lim ve Staudt 2013).



Şekil 6: TLR sinyalizasyonu Moresco ve ark. 2011).

2.2.2.Önemli Toll Like Reseptörleri

TLR-2; çeşitli mikroorganizmalara karşı, doğuştan gelen bağışıklık reaksiyonunda önemli bir rol oynayan TLR ailesinin bir üyesidir. Monositler, makrofajlar, granülositler, dendritik hücreler, endotel ve epitel hücreleri tarafından eksprese edilirler. Çeşitli bakteriyel, fungal, protozoal ve viral bileşenler TLR-2 ekspresyonunun artmasına neden olur (Texereau ve ark. 2005). MyD88 bağımlı sinyal yolunu kullanarak proinflamatuvar sitokinlerin üretimine ve mitogenle aktive edilen protein kinazların (MAPK) aktivasyonuna yol açarak hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını kontrol eder. TLR-2 sinyalizasyonu, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, astım ve multiple skleroz gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda önemli olduğu tespit edilmiştir (Colleselli ve ark. 2023).

TLR-3; çift sarmallı RNA'lara (dsRNA) bağlanan bir endosomal reseptördür. Antiviral yanıtta rol oynar ve aynı zamanda pro-apoptotik etkileri de bulunmaktadır (Trejo-de la ve ark. 2011, Muresan, ve ark. 2022). TLR-3'ü uyaran poli(IC) gibi

yüksek doz TLR agonistleri, hem tümör hücrelerini hem de tümör mikroçevresinde bulunan vasküler endotelial hücreleri doğrudan yok edebilir. TLR-3 aktivasyonu, ayrıca vasküler geçirgenliği artırarak doğrudan veya dolaylı olarak lökositlerin tümör alanına gelmesini sağlayıp, tümörün gerilemesine, NK ve sitotoksik T hücreleri tarafından tümörün lizisine neden olur (Javaid ve Choi 2020). Ayrıca TLR-3, tümör hücrelerini doğrudan uyararak veya apoptoz inhibitörü ve anti-apoptotik XIAP, FLIP ve Bcl-xL gibi proteinlerin ekspresyonunu azaltarak tümör hücrelerinin apoptozuna da neden olduğu bildirilmiştir (Dajon ve ark. 2017).

TLR-4; memelilerde keşfedilen ilk TLR reseptörü olup, hem hücrenin dış zarında hem de endosomlarda bulunur. TLR-4, TNF ile diğer proinflamatuvar sitokinleri kodlayan hedef genleri aktive etmek için MyD88'e ve TRIF'e bağımlı yollar aracılığıyla sinyal veren bir reseptördür. TLR-4, immünoisitlerin, epitel ve diğer stromal hücrelerin dışında, akciğer kanser hücrelerinde, servikal skuamöz epitel hücrelerinde ve kolon kanseri hücrelerinde de tespit edilmiştir. TLR-4, MAPK ve NF- κ B yolağını aktive etme yeteneğine sahiptir ve bu da TLR4 sinyalizasyonunun, özellikle tümör hücrelerinin proliferasyonu, apoptoz inhibisyonu ve metastaz yoluyla karsinogenezin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir (Bhatelia ve ark. 2014, Korneev ve ark. 2017).

TLR-7/TLR8' in ligandları yapı olarak birbirine benzemektedir. Her iki reseptörde tek zincirli viral RNA'yı tanır. TLR-7/8'in ligandlarını birbirinden ayıran nokta ise uyarılmaları sonucunda farklı sinyal yollarını aktive etmeleridir (Takeda ve ark. 2003). TLR-7 aktivasyonu, plazmasitoid dendritik hücreler (pDC'ler) ve antijen sunan hücrelerden, IFN- α ve TNF- α 'nın üretimine ve salınımına neden olur (Chaudhari ve ark. 2022). TLR-8 ise miyeloid dendritik hücrelerden ve monositlerden proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonuna neden olur (Sun ve ark. 2022).

Tablo 2. TLR ekspresyonu, lokalizasyonu ve ligandları (Latz vd. 2004).a

TLR Ailesi	Klasik ligandlar	Dağılım ve hücre lokalizasyonu	Transkripsiyon Faktörleri	Sitokin indüksiyonu
TLR-1	Mikobakteri: tri-açil peptidleraa	İnsan ve farelerde hücre membranında ekspre edilir.	NF-kB	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs.),
TLR-2	Gram pozitif peptigoglikan, lipoprotein, ısı şok proteinleri	İnsan ve farelerde hücre membranından ekspre edilir.	NF-kB	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs.),
TLR-3	Virusler: çift sarmal DNA (dsDNA) Sentetik: polinosik polisitilik asid	İnsan miyeloid dendritik hücrelerinde (mDC) ve fare monosit ve mesengial hücrelerinde hücre içi Ekspresyon	NF-Kb, IRF3,7	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs.), IFN-1
TLR-4	Gram-negaitf bakteri: LPS (korereseptör CD14, LBP, MD-2)	Yaygın yüzey ekspresyonu Sindirim sistemi epitellerinde hücre içi ekspresyon	NF-kB, IRF3,8	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs.), IFN-2
TLR-5	Bakteri: flagellin	Sindirim sistemi epiteli dahil insan ve farede yaygın membran ekspresyonu	NF-kB	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs.),
TLR-6	Mikoplazma: diaçil lipoproteinler	Öncelikle insan ve farede mDC, mast hücreler ve B hücrelerinin membranında eksprese edilir	NF-kB	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs.),
TLR-7	Virüsler: tek sarmal RNA Sentetik: imidazoquinolinler	İnsanlarda plasmasitoid Dendritik hücreleri (pDC) ve B hücrelerinde endosomal ekspresyon farede mDCde ekspresyon	NF-kB, IRF3,6	İnflamatuvar sitokinler
TLR-8	Virüsler: tek sarmal DNA Sentetik: imidazoquinolinler	İnsan miyeloid, NK ve T hücrelerinde endosomal ekspresyon farelerde fonksiyonel değil	NF-kB, IRF3,7	(TNF, IL-6 vs., IFN- 1),
TLR-9	Virüsler ve bakteri: çift sarmal DNA Sentetik: CpG olidodeoksinükleotidler	İnsanlarda pDC, B hücreleri ve NK hücrelerinde endosomal ekspresyon farelerde daha yaygın olarak doku ekspresyonu	NF-kB, IRF3,8	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs., IFN- 1),
TLR- 10	Bilinmiyor	İnsan pDC ve B hücre yüzeyinde eksprese edilir, farelerde bulunmaz	Bilinmiyor	Bilinmiyor
TLR- 11	Toxoplasma gondii: profilin üropatojen bakteri	Fare üroepitel yüzeyinde eksprese edilir insanlarda bulunmaz	NF-kB	İnflamatuvar sitokinler (TNF, IL-6 vs.),

TLR-9; hücre içi endosomal bir reseptördür. TLR-9, IRAK-TRAF6 sinyal yolunun aktivasyonunu ve aktivatör protein 1 (AP-1) ve NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasını tetikler, NF-κB fosforilasyonuna neden olarak, sitokinlerin, kemokinlerin, CD80 ve CD86 gibi yardımcı uyarıcı moleküllerin aktivasyonunu başlatır. TLR-9 stimülasyonu ayrıca doğal katil hücrelerinin, T ve B hücreleri ile pDC aktivasyonunu da indükler. Böylece sitotoksik T lenfositlerin sitotoksitesini, proinflamatuvar ve T Helper 1 (Th1) sitokinlerinin ekspresyonunu artırır (Fehri ve ark. 2022). TLR-9, nötrofiller, monositler, T-B ve NK hücreleri ile DC'ler dahil olmak üzere birçok ücre tipinde eksprese edilmektedir (Krysko ve ark. 2011). TLR-9'un bu hücreler dışında, meme, beyin, mide, akciğer, yemek borusu, prostat ve böbrek kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde de yüksek düzeylerde eksprese edildiği bildirilmiştir (Väisänen ve ark. 2013). Meme ve prostat kanser hücrelerinde TLR-9 aktivasyonu ile MMP-13 ekspresyonu arasında pozitif ilişki tespit edilmiş olup, bununda metastaza yol açtığı bildirilmiştir (Väisänen ve ark. 2010, Kutikhin ve ark. 2011). Luo ve ark. 2015 yılında yapmış oldukları bir çalışmada radikal prostatektomi uygulanan hastalarda yüksek Gleason skoru ile nüks olasılığı olan hastalar arasında pozitif bir ilişki olduğunu saptamışlardır (Luo ve ark. 2015).

2.2.3. Toll Like Reseptör-Kanser İlişkisi

Kanser hücreleri, vücudumuzdaki normal hücrelerin aksine kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücreler olup, bir hücrenin, tümör hücresine dönüşümü, tümör baskılayıcı genlerin aşağı regülasyonu ile proto-onkogenler ve ilişkili sinyal yollarının yukarı regülasyonuna bağlıdır. Dahası, çeşitli hücreler ve moleküler mekanizmalar tümör hücrelerinin, vücudun kendi doğal bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olurlar (Javaid ve Choi 2020). Kanser hücrelerinin yaşaması, tümör mikroçevresinde (TME) bağışıklık sistemini aktive eden sinyallerin azalmasına ve/veya yokluğuna bağlıdır. Kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler), kemik iliğinden türetilen baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) ve düzenleyici T hücreleri (Tregs) TME'nin ana bileşenleridir (Zhou ve ark. 2009, Cen ve ark. 2018). TME'de aktive hale gelmiş kanserle ilişkili fibroblastlar, TME'de ekstra selüler matriksi (ECM) sentezleyerek tümör

mikroçevresinin yapısını oluşturur ve tümör gelişimi üzerinde önemli etkiler gösterir. Bunun yanında yetersiz damarlaşma ise hipoksiye neden olarak terapötik etkileri kısıtlayarak tümör gelişimini teşvik eder. Bu nedenle, tümör hücreleri ile TME'deki bileşenler arasındaki etkileşimler, tümör gelişimini, metastazı ve terapötik aktiviteyi etkiler (Yang ve ark. 2020). TME'ni oluşturan hücrelerden eksprese edilen TLR'ler ise inflamasyona bağımlı veya bağımsız bir şekilde tümör hücrelerine etki ederler (Shi ve ark. 2016). TLR'lerin kanser hücrelerindeki inflamasyona bağlı etkileri, nükleer faktör-Kappa B yolağının aktivasyonu sonucunda şekillenir. Bu sinyal yolağının aktivasyonu ile üretilen kemokin ve sitokinler tümör alanına, transforme edici büyüme faktörü β (TGF β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), MMP-9 ve PCNA gibi pro- inflamatuvar, pro-anjiyogenik moleküllerin sekresyonunu artırır (Sato 2009, Zhou ve ark. 2009, Bhatelia ve ark. 2014, Cen ve ark. 2018). Bunun yanında yüksek düzeydeki TLR ekspresyonu da kronik inflamasyona neden olarak, onkogenlerin aktivasyonuna, tümör baskılayıcıların inhibisyonuna ve immünosupresyonuna neden olarak servikal, akciğer, özofagus, gastrik, kolorektal, karaciğer ve mesane malignitelerinin ve bir dizi başka kanserin gelişimine yol açabilir (Kutikhin 2011, Yang ve ark. 2023). TLR'lerin kanser hücreleri üzerindeki diğer bir etkisi ise apoptoz mekanizması üzerinden meydana gelmektedir. TME 'den salınan tümörle ilişkili antijenler, TLR sinyal yolunu veya aşağı yöndeki adaptör proteinlerini aktive etmek için DAMP görevi görür ve kanser hücrelerine karşı farklı apoptoz mekanizmalarının başlamasına neden olurlar (Eckle ve Eltzschig, 2011, Ouyang ve ark. 2012). TLR'ler tarafından uyarılan apoptozis; ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki yolak ile gerçekleştirilir. Ekstrinsik yol, MyD88'e bağımlı yolak olup, MyD88 ve TIRAP'ın etkileşimiyle başlar. MyD88 daha sonra IL-1R ile ilişkili kinazların iki üyesiyle (IRAK4 ve IRAK1) ve E3 ubiquitin ligazı TRAF6 ile bir kompleks oluşturur. Aktive edilmiş TRAF6, TGF- β ile TAK1-TAB1/2/3 kompleksini uyararak kanonik NF- κ B yolunun ve MAP kinazlarının aktivasyonuna yol açar (Salaun ve ark. 2007). Sonrasında Kaspaz-8'in aktivasyonu için Fas ile ilişkili ölüm bölgesini (FADD) ve pro-kaspaz-8'i devreye sokar ve son olarak pro-kaspaz-3'ün aktif kaspaz-3'e proteolizine yol açarak apoptozu indükler. Öte yandan, mitokondriyal pro-enzimlerin kontrolü altında şekillenen, içsel yol, mitokondriyal zarlardan sitozole içsel sitokrom c salınımını teşvik eder ve daha sonra Apaf-1 ve

pro-kaspaz- 9'u devreye sokar. Bu da aşağı akış kaspaz-9/3 sinyal kaskadını aktive eder ve daha sonra apoptoz şekillenir. TLR ile ilgili günümüzde çok sayıda araştırma yapılmak fakat tam mekanizmaları net bir şekilde açıklanamamıştır (Cen ve ark. 2018).

2.2.3.1.TLR ekspresyonlarının çeşitli kanser türlerindeki etkileri

Tümör dokularında TLR aktivasyonu ve etkileri iki ucu keskin bir kılıca benzetilmektedir. Hem tümör gelişimini teşvik edici hem de antitümöral etki gösterirler ve bu pro veya antitümör etkileri, TLR'lerin türü ile TLR'yi eksprese eden hücreye ve bu hücrelerdeki aşağı akış sinyallenme kaskadına bağlıdır (Javaid ve ark. 2020). Farklı TLR'lerin ekspresyon düzeyleri ve tümör gelişimi ile ilişkisinin incelendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur (de Oliveira ve ark. 2012, Yang ve ark. 2014)

Tümör gelişimini destekleyen TLR'lere örnek olarak;

de Oliveira ve arkadaşları (2012), kronik gastritli vakalar ile mide kanseri vakalarında PCR yöntemiyle yürüttüğü bir çalışmada, TLR-2'nin ekspresyonunu incelemiştir. Çalışma neticesinde, mide kanseri vakalarında TLR-2 ekspresyonunun kontrol ve kronik gastrit vakalarına göre daha yüksek olduğu ve ayrıca sağ kalım oranı ile TLR-2 ekspresyonu arasında negatif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (de Oliveira ve ark. 2012). Diğer başka bir çalışmada Yang ve arkadaşları (2014) mide kanseri vakalarında yürüttüğü bir çalışmada, TLR-2 aktivasyonunun, IL-8, PGE2 ve COX-2 üretimini indükleyerek mide kanseri hücrelerinin invazivliğini ve mide dokusunun vaskülarizasyonunu artırarak tümörün büyümesine neden olduğunu, TLR-5 aktivasyonunun ise, IL-8 ve TNF- α üretimine yol açarak tümör hücrelerinin çoğalmasına neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Yang ve ark. 2014).

Meme kanseri vakalarında yürütülen başka bir çalışmada, TLR-4 aktivasyonu sonucunda NO, IL-6, IL-12, VEGF ve MMP ekspresyonunun arttığını ve bu durumun tümör gelişimini desteklediğini bildirmişlerdir (Chandraseka ve ark 2023). Chen ve arkadaşları (2015) yapmış oldukları bir çalışmada, 60 meme tümörü vakasında TLR-4 ekspresyonunu immunohistokimyasal ve PCR yöntemleriyle araştırmışlardır. Araştırma sonucunda özellikle aksiller lenf nodu metastazı olan hastalarda TLR-4'ün ekspresyonunun daha yüksek olduğunu ve lokal metastazla

arasında bir pozitif bir ilişki bulunduğunu saptamışlardır (Chen ve ark. 2015).

Gu ve arkadaşları (2018), akciğer kanseri vakalarında yürüttükleri bir çalışmada TLR- 7 ve TLR-8 ekspresyonu ile apoptoz arasındaki ilişki incelenmişlerdir. TLR-7 ve TLR-8 aktivasyon artışının hücre çoğalmasının/canlılığının artmasına, antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin ekspresyonunun artmasına, nükleer faktörü kappa (NF-κB) aktivasyonuna, inflamasyona ve kemoterapiye dirence yol açarak tümör gelişimini desteklediğini saptamışlardır (Gu ve ark. 2018). Droemann ve arkadaşları (2005), farklı akciğer tümör hücre hatlarında in vitro olarak yürüttükleri çalışmalarında; immünohistokimyasal, konfokal mikroskopi, in situ hibridizasyon, RT-PCR ve DNA dizilemesi yöntemlerini kullanarak tümör hücre hatları ile TLR-9 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda malignitesi düşük olan tümör hücre hatlarında TLR-9 ekspresyonunun düşük seviyede olduğunu tespit etmişlerdir. Düşük TLR-9 ekspresyonuyla ilişkili olarak monosit kemotaktik protein-1 salgılanması ve TNF-alfa ile indüklenen apoptozu azalttığını ve bu durumun tümör gelişimine katkı sağladığını bildirmişlerdir (Droemann ve ark. 2005). Prostat kanseri dokularında yürütülen bir çalışmada; TLR-9 aktivasyonu ile NF-κB ve c-Myc ekspresyonu arttığı ve bu ilişkinin prostat kanser hücrelerinin çoğalması desteklediği raporlanmıştır. (Javaid ve ark. 2020). Kalantari ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ise 180 prostat kanseri vakasını inceleyerek skorlamışlardır. İmmünohistokimyasal olarak yürüttükleri bu çalışmada yüksek gleason skoruna sahip hastalarda TLR-9 ve MMP-13 ekspresyonlarının daha yüksek olduğunu, lenf düğümü metastazı olan vakalarda ekspresyon şiddetinin daha da arttığını bildirmişlerdir (Kalantari ve ark. 2019). Zhang ve arkadaşları (2014), normal özofagus dokusu ile özofagus kanser dokularında TLR-9 ekspresyonunu RT-PCR, Western blot, akış sitometrisi ve immünohistokimyasal yöntemlerle analiz etmişlerdir ve analizleri sonucunda TLR-9 ekspresyonunun normal özofagus dokusuna kıyasla özofagus tümörü dokularında daha yüksek seviyelerde bulunduğunu saptamışlardır. Bunun yanında in vitro ortamda, özofagus kanser hücreleri üzerine TLR-9 agonisti CpG oligonükleotidlerinin (CpG ODN) ve inhibitör klorokinin (CQ) etkisini de araştırmışlardır ve araştırma sonucunda CpG ODN, NF-κB aktivasyonuna ve matris metalloproteinaz (MMP)-2, MMP-7 ve siklooksijenaz-2

(COX-2) mRNA ekspresyonunun artmasına yol açtığını ve bunun sonucunda CpG ODN hücre proliferasyonu ile farklılaşmasında rol oynadığı ve TLR-9'un özofagus kanserlerinde yeni bir terapötik seçenek olabileceği sonucuna varmışlardır (Zhang ve ark. 2014). Urban-Wojciuk ve arkadaşları (2019) ile Chandraseka ve arkadaşları (2023) özofagus kanser vakalarında; TLR- 3, TLR-4, TLR-7 ve TLR-9 ekspresyonlarını araştırmış ve araştırma sonucunda normal dokulara kıyasla özofagus kanser dokularında TLR-3, TLR-4, TLR-7 ve TLR-9 ekspresyonlarının çok daha şiddetli olduğunu ve lenf nodu metastazları ve kötü prognozla bağlantılı olduğu bildirmişlerdir. Özellikle TLR-9'un ileri evre, kötü differansiye ve yüksek proliferasyonla ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir (Urban-Wojciuk ve ark. 2019, Chandraseka ve ark.2023).

TLR'lerin antitümöral etkilerine yönelik yapılan çalışmalar da literatürde bulunmaktadır (Bianchi ve ark. 2020, Ye ve ark. 2022).

Ye ve arkadaşları (2022) yürüttüğü bir çalışmada; deneysel olarak oluşturulan pankreas kanseri modelinde, TLR-7/8 agonisti kombinasyonunu tedavi olarak uygulamışlardır. Tedavi grubunda sadece radyoterapi uygulanan gruba kıyasla antitümöral etkinin daha iyi şekillendiği ve tümöral dokunun belirgin bir şekilde sınırlandığını rapor etmişlerdir (Ye ve ark. 2022). Paone ve arkadaşları (2008) LNCaP ve PC3 tümör hücre hattı verilerek oluşturulan prostat kanser modelinde, TLR-3 ekspresyonunu Western Blot yöntemiyle incelemiş ve TLR- 3 agonisti poli (I:C)' nin mitogenle aktive olan protein kinazları aktive ettiğini ve kaspaz bağımlı apoptozu indükleyerek antitümöral etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (Paone ve ark. 2008). Ultimo ve arkadaşları (2016) yapmış oldukları bir çalışmada TLR-3'ü dsRNA-konjuge mezogözenekli silika nanopartiküllerle hedeflemenin meme kanseri hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu tetikleyerek antitümöral etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Ultimo ve ark. 2016). Bianchi ve arkadaşları (2020) yaptığı bir çalışmada, in vitro ortamda TLR-3 ekspresyonunda meydana gelen artışın, akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisini PCR ve TÜNEL yöntemleriyle incelemişlerdir. İncelemeler sonucunda TLR-3'ün kanser hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonuna yol açarak apoptozu indüklediğini ve tümör gerilemesine neden olduğunu tespit etmişlerdir (Bianchi ve ark. 2020).

2.3.Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda, hücre üretimi ile hücre yıkımı arasında homeostatik bir denge mevcut olup ve bu dengeyi korumak için vücutta çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır (Arcy 2019). Programlanmış hücre ölümü (PCD) olarak adlandırılan bu mekanizmalar, organizmanın gelişiminde büyük rol oynamaktadır. Bugüne kadar yaklaşık 15 farklı PCD tipi tanımlanmış olup, bunlar arasında apoptoz, en yaygın olan PCD tipidir (Savitskaya ve Onishchenko 2015). “Apoptoz” kelimesi eski Yunanca apo’pto’sis sözcüğünden gelmektedir ve ‘bir çiçekten taç yapraklarının dökülmesi’ veya ‘sonbaharda bir ağaçtan yaprakların dökülmesi’ anlamına gelmektedir.

Bu isim 1972'de ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından; bir hücrede oluşan “apoptotik cisimciklerin” morfolojik özelliklerini açıklamak için kullanılmıştır (Elmore 2007). Apoptozis büyüme, gelişme ve vücut savunmasını düzenleme ile organizmadaki gereksiz veya anormal hücreleri yok etmede önemli rol oynar. Bunun yanında canlıların sağlıklı bir şekilde yaşamlarını sürdürmeleri için gerekli olan hücre sayısının da stabil kalmasını sağlamaktadır (O'Reilly ve Strasser 1999, Obeng 2021, Morana ve ark. 2022). Apoptozis ile ilgili çalışmalar; bazı hastalıkların oluşumunda; apoptozun çok yüksek düzeylerde etki ettiği (örn. nörodejeneratif hastalıklar, Parkinson, Alzheimer, spinal kaslar atrofi, AIDS) ve bazı hastalıklarda ise apoptozisin düşük seviyelerde (örn. kanser [virüs enfeksiyonu veya p53 ve Bcl-2 gibi DNA mutasyonları) etki ettiğinin tespit edilmesinden sonra ortaya çıkmıştır (Lawen 2003, Obeng 2021). Apoptozis, gen düzeyinde hassas bir şekilde düzenlenir ve DNA'da meydana gelen bozukluklar sonucunda oluşan hasarlı hücrelerin kontrollü bir şekilde yok edilmesini sağlar (Pistritto ve ark. 2016). Apoptozisi aktive eden, fizyolojik ve patolojik çeşitli uyaranlar ve koşullar bulunmaktadır (Elmore 2007). Apoptotik hücrede; sitoplazma, çekirdek ve plazma zarını içeren morfolojik değişiklikler ile birlikte biyokimyasal değişikliklerde şekillenir. Apoptozun erken dönemlerinde hücre yuvarlaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını kaybeder ve küçülür. Sitoplazmada, endoplazmik retikulum genişler ve sisternalar şişerek veziküller ve vakuoller oluşturur. Çekirdekte kromatin yoğunlaşır, çekirdek kıvrımlı bir hal alır ve hücre çeşitli boyutlarda apoptotik

cisimlere ayrılır. Apoptoza giden hücrelerde, hücre zarı sağlam kaldığı için, apoptoz olayı yangı şekillenmeden gerçekleşir. Nekrozda ise, çekirdek ve hücre membranının parçalanması ve yangı şekillenmesi söz konusu olduğu için apoptozdan morfolojik olarak oldukça farklılık gösterir (Lawen 2003, Xu ve ark. 2009, Wong 2011, Xu ve ark. 2019). Apoptozisin başlatılması ve devamlılığı reseptörler, sinyal molekülleri, enzimler ve gen düzenleyici proteinlerinde içinde bulunduğu bir dizi yapının iş birliğini sonucunda gerçekleşir. Bunlar arasında, apoptozis proteini inhibitörü (IAP), Bcl-2 ailesi proteinleri ve kalpain gibi çeşitli moleküller tarafından düzenlenen kaspaz kaskad sinyal sistemi apoptozis sürecinde hayati öneme sahiptir (Fan ve ark. 2005). Apoptozis memeli hücrelerinde esas olarak kaspazlar adı verilen sistein proteaz ailesi tarafından düzenlenir (Roh 2001).

Bugüne kadar insanlarda 11 kaspaz türü tespit edilirken, farelerde 10 kaspaz türü (kaspaz-1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12 ve 14) bulunmuştur. Kaspazlar; apoptotik sinyalleme kaskadındaki pozisyonlarına karşılık gelen prodomainlerinin uzunluklarına göre başlatıcı (kaspaz-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) olmak üzere kendi içinde ikiye ayrılır (Li ve Yuan 2008). Kaspazlar zimogenler veya pro-kaspazlar olarak üretildikten sonra, başlatıcı kaspazlar, kendine özgü adaptör molekülleriyle reaksiyona girerler ve oto-proteoliz yoluyla aktive olurlar (Kashyap ve ark. 2021). Apoptozisin başlatıcısı olan prokaspaz-8, adaptör FADD aracılığıyla aktif hale gelir ve kaspaz-8'e dönüşür. Kaspaz-8, prokaspaz-3, -6 ve -7 dahil olmak üzere doğrudan aşağı akış etkili kaspazları aktive eder. Ayrıca Kaspaz-8 Bid'i parçalar ve sitokrom c salınımına yol açan mitokondriyal hasarı tetikler. Sitoplazmadaki sitokrom c, Apaf-1'e bağlanır ve bu da prokaspaz-9'u aktive eder. Aktif hale gelen Kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktive eder ve böylelikle apoptoz şekillenir (Wong 2011).

Kaspazlar, apoptotik sürecin başlıca uygulayıcıları olmalarına rağmen, B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesi üyeleri bu sürecin ana düzenleyicileridirler. Bcl-2 proteinlerinin hücre ölümünü düzenlediği mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir, ancak işlevlerinin çoğunlukla mitokondrinin zarlar arası boşluğundan (IMS) protein salınımını düzenlemelerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Gross 2005). Apoptozda esas olarak içsel ve dışsal olmak üzere iki temel apoptotik yol tanımlanmıştır. İçsel apoptotik yol, pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin

aktivasyonunu içerir ve bu da dış mitokondriyal membranın (OMM) geçirgenliğinin artmasına neden olur ve bunun sonucunda sitokrom-c (Cyt-c) ve diğer IMS proteinleri salınır. Dışsal yolda, apoptozis tümör nekroz faktörü/Fas (TNF/Fas) reseptör ailesinin üyelerinin aktivasyonu yoluyla başlatılır (McDonne ve ark. 1998). Kaspazların aktivasyonu, Bcl-2 ailesinin antiapoptotik molekülleri (Bcl-2, Bcl-xL) tarafından engellenebilirken, proapoptotik molekülleri tarafından ise aktive edilir. Bcl-2 ailesi proteinleri, Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyeleriyle (Bax, Bak) heterodimerleşir ve oluşan proteinler (Bid, Bik) sitokrom c'nin salınımını engeller (Lee ve ark. 2008). Normal koşullar altında pro-apoptotik proteinler ile antiapoptotik proteinler arasında bir denge mevcuttur. Anti-apoptotik Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax, arasındaki bu denge, hücrenin apoptoza uğrayıp uğramadığını belirlemede kritik bir rol oynar (Ashkenazi ve ark. 2017). Bcl-2 geni, p53 tarafından doğrudan aktive edilen ilk apoptotik gen olup, apoptoz sırasında hücrenin hayatta kalmasında önemli rol oynar (Al-Zubaidy ve ark. 2022). Bax aktivasyonunun temel işlevi, sitokrom c gibi çeşitli proapoptotik sinyal moleküllerinin salınmasına neden olarak dış mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırmaktır (Grosser ve ark. 2021). Bax proteini apoptozu desteklerken Bcl-2 proteini apoptozis baskılayıcı olarak etki eder. Bcl-2, dış mitokondriyal zar üzerindeki reseptörlere bağlanarak mitokondriyal zarın bütünlüğünü korumaya yardımcı olur. Hücre apoptozis indükleyici ajanlara maruz kalırsa, Bax sitoplazmadan mitokondriyal membrana taşınır ve dış membranın geçirgenliğini değiştirir. Bu değişiklikler sonucunda sitokrom c ve diğer apoptozis indükleyici faktörler mitokondriden serbest bırakılır ve sonunda DNA'nın parçalanmasına neden olur (Vardıyan ve ark. 2020). Kanser hücreleri; proapoptotik Bax proteinini inhibe etmek için antiapoptotik Bcl-2 proteininin ekspresyonunu artırır ve böylece apoptozu engellerler (Lopez ve ark. 2022). Bax ile kanser arasındaki ilişki sadece kanser oluşumuyla değil, aynı zamanda kanser prognozuyla da ilgilidir. Bax proteininin ekspresyonunun azalması, mitokondriyal apoptotik yolun başarısızlığına, tümör gelişimine, ilerlemesine, ilaç direncine ve prognozun kötüleşmesine yol açmaktadır (Feng ve ark. 2018). Bax proteininin düşük ekspresyonu; meme, kolorektal, over, prostat, özofagus, baş ve boyun kanseri gibi çeşitli tümörlerde kötü prognozun belirtisi olarak kabul edilmektedir (Choi 2007). Giatromanolaki ve arkadaşları (2001), ameliyatla tedavi edilen kolorektal

adenokarsinomlu 268 hastadan alınan tümör dokularında Bax, Bcl-2 ve P53 ekspresyonlarını immunohistokimyasal olarak değerlendirmiş ve 1. ve 2. evre tümörlerde Bax ekspresyonu yüksek iken, evre 3 gibi daha agresif tümörlerde Bcl-2 ekspresyonunun daha şiddetli olduğunu bildirmişlerdir (Giatromanolaki ve ark. 2001). Kymionis ve arkadaşları (2001), primer meme karsinomu olan yüz otuz hastadan alınan tümör dokularında, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun prognozu belirlemede bir belirteç olup olmadığını immunohistokimyasal yöntemle araştırmış ve Bax ekspresyonunun olumlu prognostik faktör ve daha iyi klinik sonuçlarla ilişkili olduğunu, Bcl-2 ekspresyonunun ise kötü prognoza işaret ettiğini tespit etmişlerdir (Kymionis ve ark. 2001).

Benzer şekilde Tsamandas ve arkadaşları (2007), rektal adenokarsinomlu hastalardan alınan tümör örneklerini incelemiş ve agresif tümörlerde Bcl-2 ekspresyonunun Bax ekspresyonundan daha yüksek olduğunu saptamışlardır (Tsamandas ve ark. ve 2007). Lopez ve arkadaşları (2022), yapmış olduğu bir çalışmada meme kanserinde, Bax protein ekspresyonunda artış, Bcl-2 protein ekspresyonunda azalma meydana geliyorsa bunun iyi prognozun bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (Lopez ve ark. 2022). Bcl-2 proteini ayrıca prostat tümörlerinin androjen bağımsız bir yol izlemesinde önemli bir rol oynar. Prostat kanserinde Bcl-2'nin ekspresyonu, androjen yoksunluk tedavisinden sonra artar ve androjen yoksunluğu tedavisi başarısız olan hastalarda yüksek seviyelerde seyrederek (Bylund ve ark. 1998, Khorve ark. 2006). Bunun yanında insan prostat kanseri hücrelerinde Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, diğer tümör hücreleri gibi, radyasyona karşı direnci ve radyasyon sonucunda tetiklenen apoptoz oluşumunu geciktirerek kanser gelişimini artırır (Mackey ve ark. 1998). Kısacası apoptotik yollarda meydana gelen bozukluklar artık nörodejeneratif bozukluklardan maligniteye kadar uzanan bir dizi hastalığın oluşumuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Scott ve ark. 2000).

Kanserin oluşumu takiben şekillenen apoptozis, tümör hücrelerinin çoğalmasını engelleyen ilk mekanizmadır (Liao ve ark. 2019, Kashyap ve ark. 2021). Prekanseröz lezyonlarda, DNA hasarı sonucu apoptozisin indüklenmesi, potansiyel olarak hasarlı hücrelerin yok edilmesine neden olarak tümör gelişimini engelleyebilir. Apoptozis sürecinde meydana gelen bir aksama, kontrolsüz hücre çoğalmasına, kanser gelişimine, ilerlemesine ve kanser hücrelerinin ilaç tedavilerine

karşı direnç geliştirmesine neden olabilir. Bu nedenle, apoptozis mekanizmalarında oluşan herhangi bir düzensizlik karsinogeneizde hayati bir rol oynamaktadır (Plati ve ark. 2008). Hasarlı bir hücrenin apoptoza gidişinin veya apoptoz direncinin azalmasının farklı yolları vardır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulması azalmış kaspaz fonksiyonu ve bozulmuş ölüm reseptörü sinyalleme nedenlerinden biri sonucunda kanser hücreleri apoptozdan kaçabilir (Wong 2011).



3.MATERYAL ve METOD

Bu çalışma kapsamında kullanılan deneklere ait Etik Kurul Belgesi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan 26.12.2023 tarihinde, 2023- 63-2 no' lu karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.1.Hücrelerin Kültürü ve Hazırlanması

LNCaP hücre serisinin büyütülmesi için RPMI-1640 kültür medyumunu kullanıldı. Kullanılan kültür medyumunun içerisine final konsantrasyonları %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 100 µg/mL primosin eklendi. Kriyojenik olarak dondurulmuş hücreler, hızlı çözündürme tekniği uygulanarak çözündürüldü ve hücre kültür plaklarına taze medyum ile karıştırılarak kültüre alındı. Hücrelerin gelişimi her gün ışık mikroskobu ile kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğu %80'in üzerine çıktığı zaman tripsinizasyon metodu ile pasajlandı. Her pasajlama işleminde, inkübatörden alınan hücrelerin üstlerindeki besiyeri serolojik pipet yardımıyla çekilerek atıldı ve flaskın yüzeyi 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine %0,25 tripsin/%0,03 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu eklenerek inkübatör içerisinde 3 dk bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop yardımıyla kontrol edildi. İnkübasyon sonrası tripsinin etkisini inhibe etmek için, eklenen tripsin/EDTA solüsyonu hacminin iki katı kadar kültür medyumunu eklendi. Hücre süspansiyonu 15 mL'lik falkon tüplere alındıktan sonra 150 x g'de 5-7 dk santrifüj edildi.

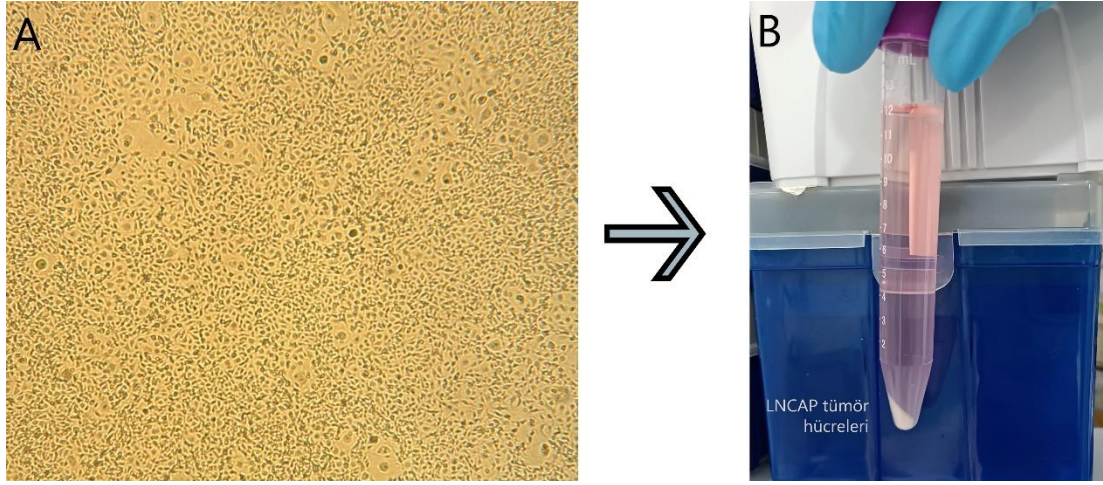
3.2.Hemositometrik Hücre Sayımı

Canlı hücre sayımı, invitrogen countess 3 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsin ile muamele edilip kaldırıldıktan sonra santrifüj edilerek pellet elde edildi. Elde edilen bu pelletin üzerine 1 ml hücre besiyeri eklenerek süspanse edildi. Hazırlanan süspansiyondan 10µl alındı ve 10µl tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılıp, toma lamı ve lameli arasındaki boşluğa eklendi. Hücre sayım cihazına konularak canlı hücre sayısı hesaplandı (Resim 1).

Her bir grup için;

$18 \times 2 \times 10^6 : 36 \times 10^6$ hücre $18 \times 50 \mu\text{L} : 900 \mu\text{L}$ 1XPBS içinde süspanse edilerek

enjeksiyona hazır hale getirildi.



Resim 1: LNCaP prostat kanseri hücre hattı, **A:** LNCaP hücre serisinin flakstaki mikroskopik görüntüsü, **B:** Hücrelerin santrifüj edildikten sonra tüp içerisindeki görüntüsü

3.3.Deney Modelinin Oluşturulması

Çalışmamızda materyal olarak; 24 adet, 8-10 haftalık erkek Atimik nude fare kullanıldı. Denekler, muhafaza edildikleri kafeslerde 12 saat gece, 12 saat gündüz olmak üzere, 20 °C sıcaklığa ve %40 nem ayarlı odalarda barındırıldı (Resim 2).



Resim 2: Deneklerin barındırıldığı kafesler.

Her kafeste 6 hayvan olmak üzere toplamda 4 grup oluşturuldu. Gruplar;

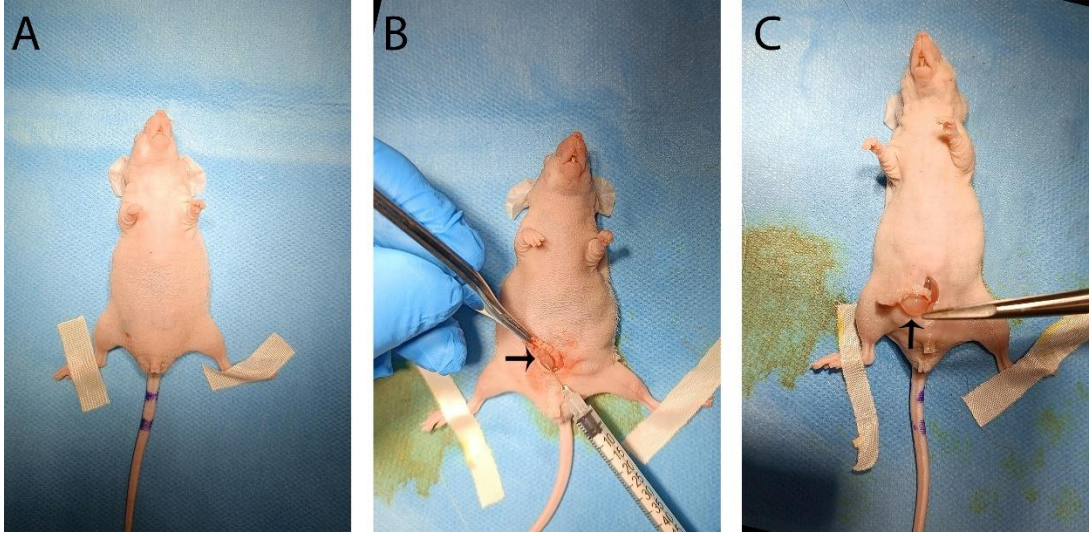
I.Grup: Kontrol grubu (Herhangi bir işlem yapılmadı)

II.Grup: Androjen Bağımlı LNCaP tümör hücre hattı uygulanan ve 3. hafta da ötanazisi ve nekropsisi yapılan grup

III:Grup: Androjen Bağımlı LNCaP tümör hücre hattı uygulanan ve 5. hafta da ötanazisi ve nekropsisi yapılan grup

IV.Grup Androjen Bağımlı LNCaP tümör hücre hattı uygulanan ve 7. hafta da ötanazisi ve nekropsisi yapılan grup

Tüm deney gruplarındaki hayvanlar ortotopik enjeksiyon öncesi anesteziye alındı ve ekstremiteler sabitlenmiş şekilde sırtüstü pozisyonda yatırıldı (Resim 3A). Karın bölgesi dezenfekte edildi ve karın boşluğuna Metzenbaum makası kullanılarak linea alba boyunca bir kesit atıldı. Mesane ve seminal veziküller (SV'ler) diseksiyon forsepsi ile kaldırılarak prostat dokusu ortaya çıkarıldı. Steril koşullar altında gruplarda bulunan her bir denegin prostat bezinin sol anterior lobuna ortotopik enjeksiyon yoluyla, 50 µL 1X PBS içinde 2×10^6 Androjen Bağımlı LNCaP prostat kanser hücreleri enjekte edildi (Resim 3B-C). Preoperatif ve postoperatif dönemde, tüm gruplardaki denekler haftada üç defa tartıldı, deney başında ve sonunda iki kez olmak üzere facial venden kan örnekleri alındı. Çalışma süresi boyunca denekler, ağırlık, enfeksiyon, tümör gelişimi ve sağ kalım yönünden takip edildi. Deney süresi boyunca deneklerde herhangi bir komplikasyon görülmedi. Deney sürelerini takiben grupların nekropsileri yapıldı ve alınan prostat dokularının ilk olarak makroskopik incelemeleri ile tümöral kitlelerin kumpasla ölçümleri yapıldı, ardından %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi.



Resim 3: LNCaP hücrelerinin ortotopik enjeksiyon aşamaları, **A:** Deneğin anesteziye alınması, **B:** Ortotopik enjeksiyon için prostat dokusunun bulunması ve prostat dokusunda, SV altında bulunan sol anterior lobuna Androjen bağımlı LNCaP tümör hücrelerinin enjekte edilmesi, **C:** Enjeksiyon yapılmış atimik nude fare

3.4.Biyokimyasal Analizler

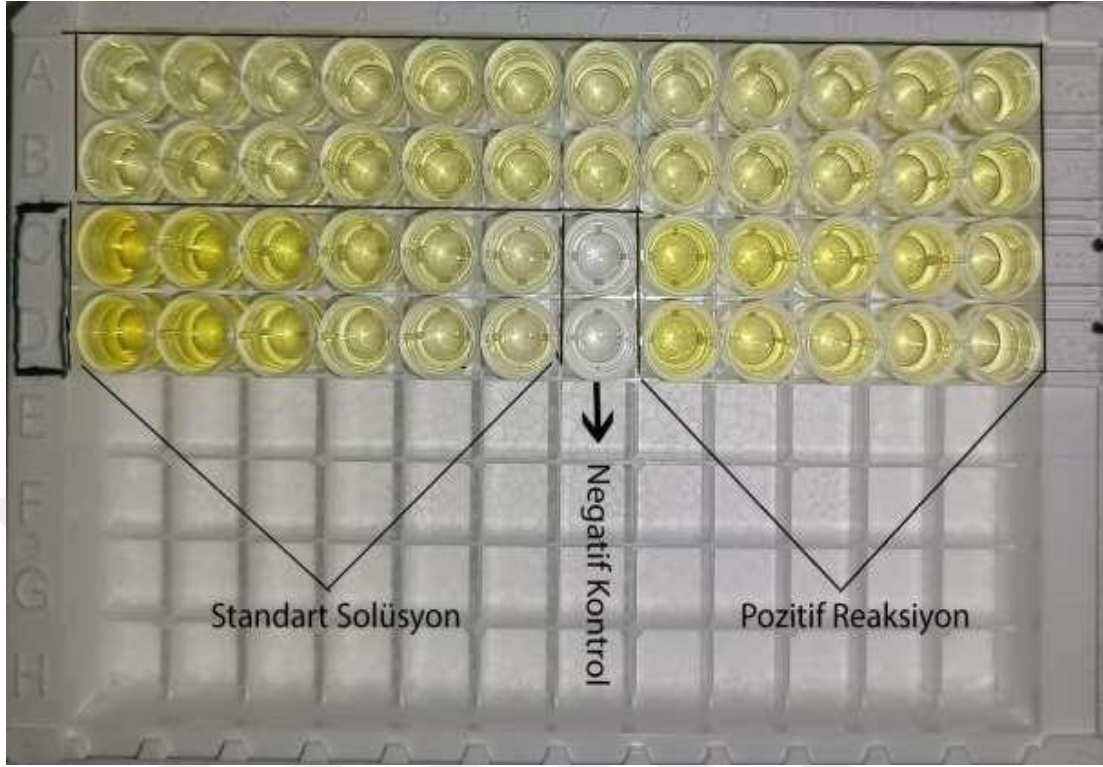
Biyokimyasal analizler için, facial venden alınan kan örnekleri EDTA'lı mor kapaklı steril mikro kan toplama (0.5ml) tüplerine konuldu. Takibinde alınan kan örneklerinden tam kan sayımı, VG-MS4e® (Melet Schloesing, Fransa) cihazı kullanılarak yapıldı ve kan örnekleri total lökosit sayısı (WBC x103/μL), lenfosit yüzdesi (LYM %), monosit yüzdesi (Mon %), granülosit yüzdesi (Gra %), lenfosit sayısı (LYM x103 /μL), monosit sayısı (Mon x103 /μL), granülosit sayısı (Gra x103 /μL), eritrosit sayısı (RBC x106 /μL), ortalama eritrosit hacmi (MCV fL), hematokrit yüzdesi 52 (HCT %), hemoglobün konsantrasyonu (HGB g/dL) yönünden değerlendirildi. Kan sayımı yapıldıktan sonra alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmaları ayrıştırılarak -80 °C' de muhafaza edildi.

3.4.1.Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELİSA)

ELİSA testi; Fare Prostat Spesifik Antijeni, PSA ELISA Kiti (BT-LAP-E0571Mo) kullanılarak, üretici firmanın göndermiş olduğu protokole göre yapıldı.

Test Prosedürü

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler verilen talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
2. Gerekli olan şerit sayısı belirlendi ve ayarlanan şeritler kullanım için çerçevelere yerleştirildi.
3. Standart kuyuya 50ul standart eklendi. Standart solüsyon biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyuya antikor eklenmedi.
4. Numune kuyularına 40ul numune eklendi ve numune kuyularına 10ul Fare PSCA antikoru eklendi. Daha sonra numune kuyularına ve standart kuyulara 50ul streptavidin-HRP eklenip, iyice karıştırıldı. Plakanın üzeri sızdırmazlık ile örtülüp, 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. Sızdırmazlık maddesi çıkartıldı ve plaka yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı. Her yıkama için kuyular 30 saniye ila 1 dakika boyunca 300ul yıkama tamponuyla ıslatıldı. Otomatik yıkama için, her kuyu boşaltıldı ve aynı işlem 5 kez tekrarlandı. Her kuyuya 50ul substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyuya 50ul substrat solüsyonu B eklendi. Plaka yeni bir sızdırmazlık maddesiyle kapatılarak karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
6. Her kuyuya 50ul Durdurma Solüsyonu eklendi ve reaksiyon gerçekleşen numunelerde mavi renk hemen sarıya döndü (Resim 4).
7. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucusu kullanarak hemen her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.



Resim 4: ELİSA testi, pozitif reaksiyon

3.5.Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal incelemeler

3.5.1.Parafin Blokların Hazırlanması

Sakrifikasyon sonrası deneklerden alınan tümöral dokular tespit edilmesi için %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda 24-48 saat bekletildi ve ardından kasetlere alındı. Yeni bir formaldehit solüsyonun da tekrardan 24-48 saat tespit edildikten sonra 8 saat akarsu altında kalarak formaldehit solüsyonu uzaklaştırıldı. Dokulardan formaldehit solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra her birinde 30 dk olmak üzere sırasıyla düşükten başlayıp yükseğe doğru seyreden alkol serilerinden (%70, %80 %90, %96 ve %100'luk) geçirilerek kasetlenen dokular dehidre edildi. Sonrasında 3 ayrı xyloldan geçirilerek, 56 °C etüvde erimiş haldeki parafinle bloklandı.

3.5.2.Histopatolojik İncelemeler-Hematoksilen-Eozin

Hazırlanan parafin bloklardan Hematoksilen-Eozin boyaması 5 mikron

kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler ilk olarak etüvde 70 °C iki saat bekletildi ve ardından iki ayrı ksilolden geçirilerek deparafinize edildi. Kesitler, yüksekten başlayarak düşük dereceye doğru hazırlanmış olan alkol serisinden (%100, %96, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrasyonları sağlandı ve çekirdek boyaması için hematoksilende 10 dk bekletildi. Ardından, asit alkol ve amonyaklı sudan geçirilerek hematoksilin fazlalığı uzaklaştırıldı ve kalan boya sabitlendikten sonra alkolik eozin ile hücrelerin sitoplazmaları boyandı. Kesitler son olarak düşükten başlayarak yüksek dereceli alkol serilerinden (%96, %100) geçirilerek dehidre edildi ve ksilolden geçirilerek şeffaf bir görünüm almaları sağlandı. Alkolu uzaklaştırılan kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskobu (Olympus Bx53) altında incelendi ve Cell ^P programı (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4) vasıtasıyla fotoğrafları çekildi.

Deneklerden alınan tümöral dokuların mitotik endeks hesaplaması için 40X'lik büyütmede mitotik figürlerin en yoğun bulunduğu 3 saha belirlendi. Bu 3 saha da bulunan mitotik figürlerin ortalaması o vakanın ortalama mitotik endeksi olarak kabul edildi (Erdem ve ark. 2025).

3.5.3.İmmunohistokimyasal İncelemeler (IHC)

İmmunohistokimyasal ve immunofloresan boyamalar için parafin bloklardan 3 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitlere TLR-3, TLR-9, Bax, Bcl-2, VEGF, PCNA, MMP-9, TGF-beta ve FGF immunohistokimyasal boyamaları yapıldı. İmmunohistokimyasal boyamalar için Streptavidin-biotin yöntemi kullanıldı. Alınan seri kesitler, üç ayrı ksilolden geçirilerek deparafinize edildi ve ardından yüksekten düşüğe doğru hazırlanan alkol serisinden (%100, %96, %90, %80, %70) geçirilerek hidrasyonu sağlandı. Daha sonrasında kesitler, %3'lük H₂O₂ ile 20 dakika inkübe edildi. Tüm immunohistokimyasal boyamalarda antijenik bağlanma bölgelerini açığa çıkarmak için tüm kesitler Citrate Buffer'a (pH:6.0) alındı ve 10 dk mikrodalga (800W) fırında kaynatıldı. 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğutma işlemi sonrasında kesitler 3x5 dk Phosphat Buffered Saline (PBS) (pH: 7.2) solüsyonuyla yıkandı ve kesitlerin çevresi pappen ile çizilerek sınırlandırıldı. Primer antikor aşamasından önce kesitler blocking solüsyonunda (Thermo UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (TP-

125-HL) 10 dk inkübe edildi ve TLR-3, TLR-9, Bax, Bcl-2, VEGF, PCNA, MMP-9, FGF ve TGF- β (Tablo 3) primer antikorlarıyla gece boyunca buzdolabında 4 °C de inkübe edildi. Ertesi gün inkübasyondaki kesitler ilk olarak 3x5 dk PBS solüsyonuyla yıkandı. Sonrasında sırasıyla uygun biyotinize sekonder antikorlar (Thermo UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (TP-125-HL) ve peroksidaz enzimi ile oda ısısında 10 dk inkübe edildiler (Thermo UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (TP- 125-HL) ve her iki solüsyon arasında kesitler tekrar 3x5 dk PBS solüsyonuyla yıkandı. Kromojen olarak AEC ile 10-15 dk inkübe edilen kesitler hematoksilende bir dakika bekletildikten sonra akan su altında beş dakika yıkandı ve takibinde su bazlı yapıştırıcı (Mount quick acquoso) ile kapatıldı. Yapılan boyamalarda kullanılan negatif kontrol dokularına primer antikor yerine PBS solüsyonu damlatıldı.

3.5.4. Double İmmunofloresan (IF)

İmmunofloresan boyamada Double IF boyama tekniği kullanıldı. Alınan kesitler etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyon işlemi için iki farklı ksilol serisinden ve dehidrasyon için yüksekte başlayıp düşüğe doğru hazırlanmış dereceli alkoller ile distile sudan geçirildi. Ardından kesitler, %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dakika inkübe edilerek endojen peroksidaz aktiviteleri bloke edildi. Üç farklı PBS tampon solüsyonunda 5'er dakika tutulduktan sonra, antijenik noktaları açığa çıkarmak için citrate buffer saline (pH 6.0) solüsyonunda mikrodalga fırında 10 dakika (600W) kaynatıldı ve kesitler soğuması için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Soğuyan kesitler PBS solüsyonunda 3x5 dk inkübasyonu takiben, kesitlerin kenarları kurulanıp, pappen ile çizildi ve sonra arka plan boyamasını engellemek için blocking solüsyonunda (Thermo UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (TP-125-HL) 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Kesitler PBS uygulanmaksızın uygun dilusyonlarda hazırlanan primer antikor damlatılarak gece boyunca buzdolabında 4-6 °C de inkübe edildi. Ertesi gün kesitler PBS solüsyonunda 5x5 dk yıkandıktan sonra primer olarak TLR-3 ve TLR-9 antikorları kullanılan kesitler için Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Fitch işaretli sekonder antikor (Alexa Flour 488, A-11008); Bax ve Bcl-2 primer antikorları kullanılan kesitlerde ise Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Alexa Flour 555, A-21422)

Texas Red işaretli sekonder antikorlar ile oda ısısında 60 dakika karanlıkta inkübe edildiler. Bu inkübasyon işleminin ardından kesitler distile suya alındı. Ardından distile suda 5 dakika bekletildi ve DAPI damlatılarak 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında lamelle kapatılarak floresan mikroskopunda incelendi.

Tablo 3. IHC ve IF boyamalarında kullanılan Primer ve Sekonder Antikorlar

Primer ve sekonder antikorlar	Kodu	Dilüsyon
TLR -3 Polyclonal Antibody (immunohistokimyasal+ immunofloresan boyamalarda)	PA5-88251	1/200
TLR-9 Polyclonal Antibody (immunohistokimyasal+ immunofloresan boyamalarda)	PA5-89960	1/100
Bax (immunohistokimyasal+ immunofloresan boyamalarda)	STJ97729	1/100
Bcl-2 (immunohistokimyasal+ immunofloresan boyamalarda)	Ab-BF9103	1/100
VEGF Polyclonal Antibody (immunohistokimyasal boyama)	MA5-32038	1/100
FGF2 Polyclonal Antibody (immunohistokimyasal boyama)	PA5-116495	1/100
TGFB1 Polyclonal Antibody (immunohistokimyasal boyama)	E-AB33090	1/100
PCNA Polyclonal Antibody (immunohistokimyasal boyama)	SC-56	1/100
MMP-9 Monoclonal Antibody (immunohistokimyasal boyama)	BT-MCA2606	1-100
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A-11008	1/500
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	A-21422	1/500

3.6. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ve GraphPad 8.1 (San Diego, CA, ABD) programları kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. İmmunohistokimyasal yöntemle boyanan doku örnekleri mikroskop altında iki bağımsız patolog tarafından

analiz edildi. İmmunpozitif hücrelerin yüzdesi ve yoğunluğu dikkate alınarak, sitoplazmik immün boyanma yüzdesi 0-%25 arası ise 1, %26-%75 arasında ise 2, %76'dan büyükse 3 olarak değerlendirildi. Boyama yoğunluğu ise yok veya zayıf: 1; güçlü: 2 ve çok güçlü: 3 şeklinde puanlandı (Çobanoğlu ve ark. 2015). Her iki parametrenin toplamı tüm denekler için hesaplanıp gruptaki hayvan sayılarına bölünerek grupların immunohistokimyasal skoru belirlenerek istatistiki olarak değerlendirildi. Yine aynı şekilde deneyin başında ve sonunda alınan kan plazma örneklerinden PSA değerleri ELİSA yöntemiyle hesaplanarak gruplar arasındaki karşılaştırılması istatistiksel olarak yapıldı.

PCNA indeksi;

İmmunohistokimyasal boyama sonunda boyanma yoğunluğu en yüksek olan üç alan seçilerek 40X objektifte fotoğraflandı. Sayılan hücrelerin ortalaması o vakanın PCNA skoru olarak belirlendi (Erdem ve ark. 2025).

4.BULGULAR

4.1.Canlı Ağırlık Değişimleri ve Hematolojik Bulgular

Deneyin ilk gününden başlamak üzere haftada 3 defa tüm deneklerin kiloları not edildi ve sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirildi. Kolmogorov-Smirnov testine göre; kilo verileri normal dağılım göstermektedir ($p>0,05$). Bağımlı gruplar olduğundan dolayı, Bağımlı örnek T testi uygulandı. Test sonucuna göre, deneyin başlangıcı ile deneyin sonundaki kilo değişimleri arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$), (Tablo 4).

Tablo 4. Deneklerin canlı ağırlık değişimlerinin istatistiki sonuçlar

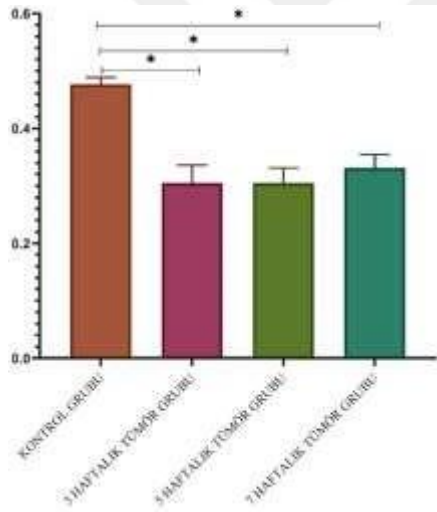
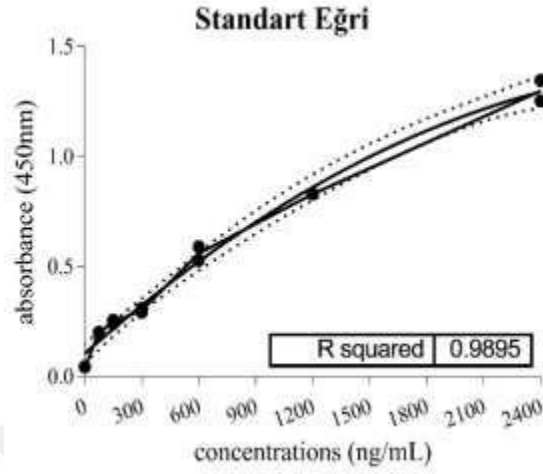
Alt Grupları	Tartım Grubu		
	İlk tartım	Son tartım	P
Canlı ağırlık değişimi	26,58±0,45	23,93±0,59	0,001*

4.2.Biyokimyasal Bulgular

Gruplarda bulunan deneklerden alınan kan örneklerinin biyokimyasal analizlerinde; deney başlangıcında alınan kan örneklerindeki total lökosit sayısı (WBC), lenfosit yüzdesi (LYM %), monosit yüzdesi (Mono %), granülosit sayısı (GRA), eritrosit sayısı (RBC), hemogloblin konsantrasyonu (HGB g/dL), hemotokrit (HCT%) değerlerinin referans değerleri arasında olduğu tespit edildi. Deney sonunda yapılan ölçümde ise ölçülen kan parametrelerinin düştüğü ancak referans değerleri arasında yer aldığı gözlemlendi.

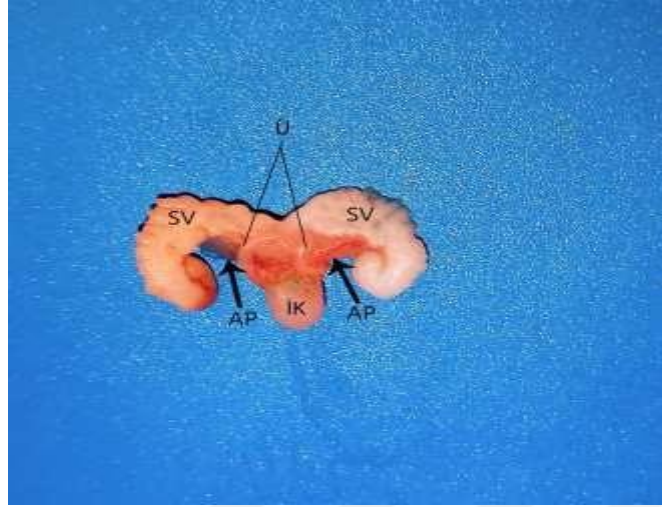
4.2.1.ELİSA sonuçları

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol grubu deneklerinden alınan doku örnekleri ile 3 haftalık, 5 haftalık ve 7 haftalık tümör grubu deneklerinden alınan doku örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bunun yanında 3 haftalık, 5 haftalık ve 7 haftalık tümör grupları arasında PSA seviyesinde sayısal olarak artış meydana gelmiş olmasına rağmen meydana gelen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$), (Tablo 5).

Tablo 5. Serum PSA ölçümlerinin istatistiki analizleri

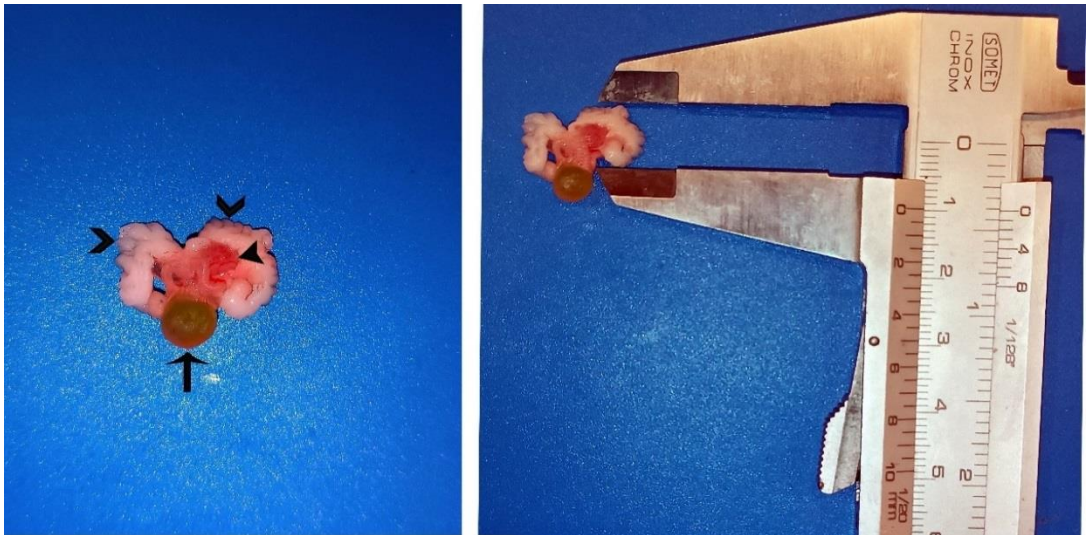
4.3.Makroskobik bulgular

Deney süresi dolan gruptaki deneklerin sistemik nekropsileri yapıldı. Kontrol grubundaki hayvanların prostat dokusunda makroskobik olarak herhangi bir patolojik lezyona rastlanılmadı. Anterior prostat lobu (AP) yarı saydam bir görünüme sahip olup, semina vezikularise (SV) bilateral olarak bağlıydı (Resim 5).



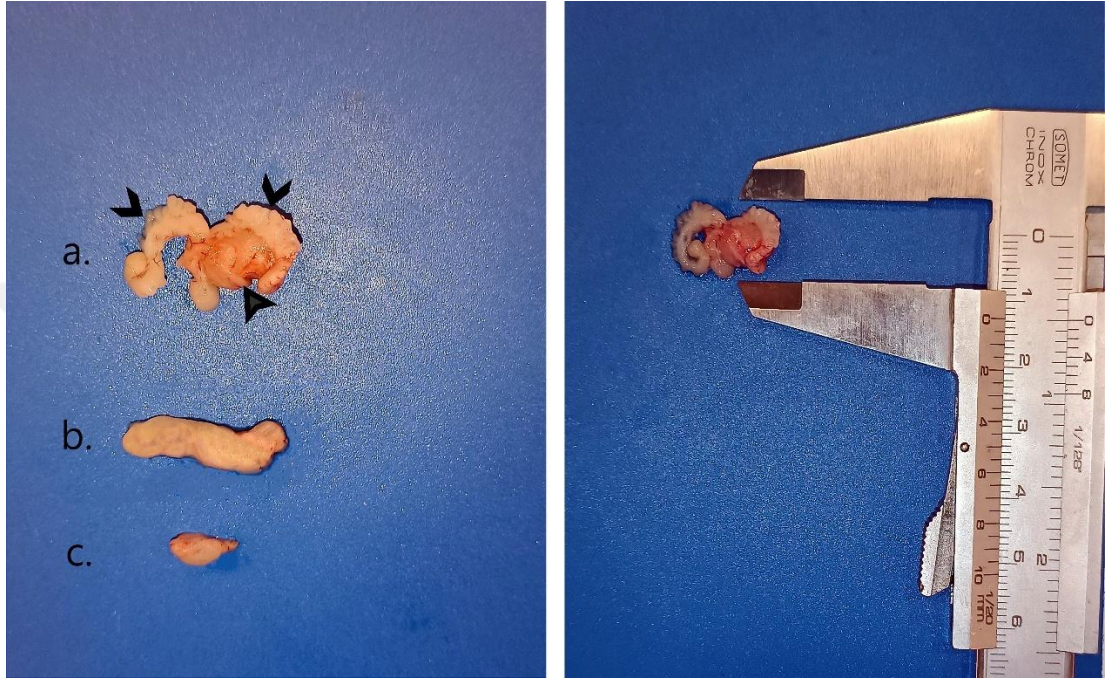
Resim 5: Kontrol grubu, Fare prostat dokusu; **SV:** Seminüla vezikülarisler, **AP:** Anterior prostat lobu, **İK:** İdrar kesesi, **Ü:** Üreterler

Androjen bağımlı LNCaP hücre serisi verilen ve 3. hafta da nekropsisi yapılan II. gruptaki deneklerin prostat dokusunun sol anterior lobunda toplu iğne başı büyüklüğünde, iyi sınırlanmış, yuvarlak, dış yüzeyi pürüzsüz, kırmızı renkli, sert kıvamlı tümöral kitleye rastlanıldı. Enjeksiyon yapılmayan sağ taraftaki anterior prostat lobunda herhangi bir tümöral yapıya rastlanılmadı (Resim 6).



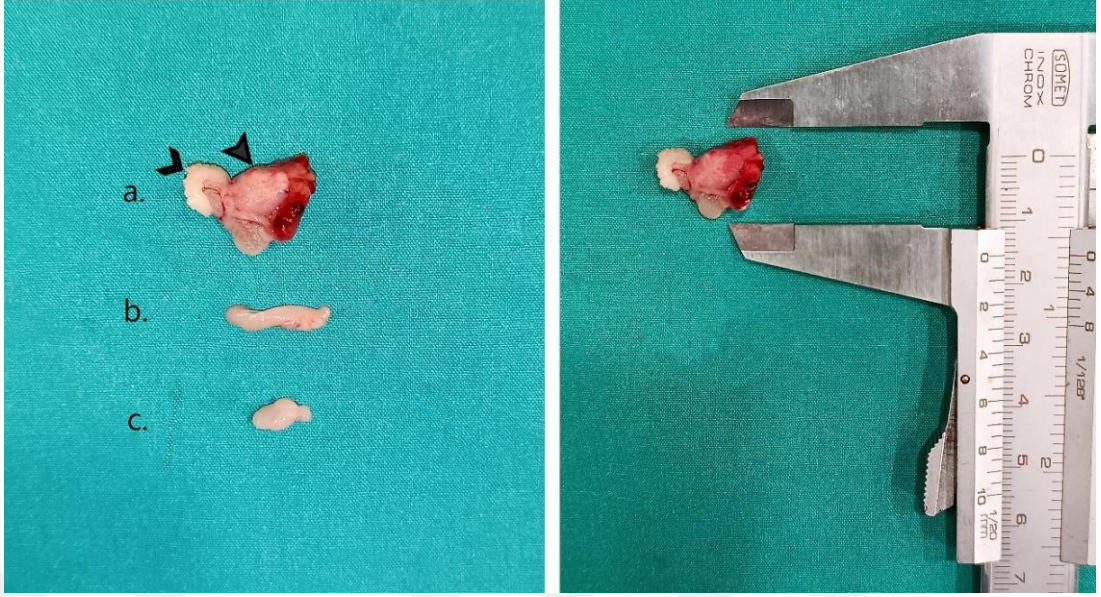
Resim 6: 3 haftalık tümör grubu, **ok:** idrar kesesi, **ok başı:** tümöral kitle, **şeritler:** veziküla seminalisler.

Sakrifikasyon işlemi 5. haftada yapılan III. grupta, prostat dokusunun sol anterior lopunda mercimek tanesi büyüklüğünde, sınırları keskin, dış yüzeyi pürüzsüz, kırmızı- kahverengimsi renkte tümöral yapı tespit edilirken, 6 hayvanın 3 tanesinin sadece iliak lenf düğümlerinde, 2 tanesinde ise hem iliak hem de mezenterial lenf düğümlerinde büyüme meydana geldiği tespit edildi (Resim 7).



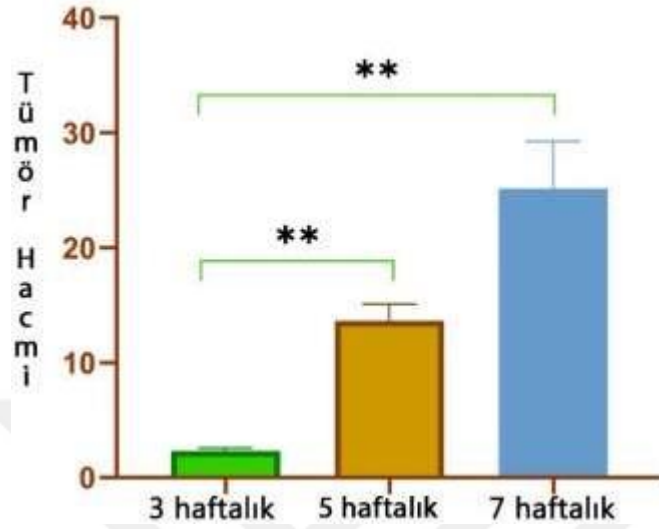
Resim 7: 5 haftalık tümör grubu, **a:** prostat dokusu, **ok başı:** tümöral kitle, **şeritler:** veziküla seminalis, **b:** mezenteriyal lenf düğümlerinde büyüme, **c:** iliak lenf düğümlerinde büyüme.

Nekropsisi 7 haftada yapılan IV. grupta ise II. ve III. gruplara benzer şekilde prostat dokusunun sol anterior lobu ve sol prostat dokusunun tamamını kaplayan aynı zamanda seminula vezikularislere uzanan, nohut büyüklüğünde, kanamalı tümöral kitleye rastlanıldı. Gruptaki tüm hayvanların mezenteriyal ve iliak lenf düğümlerinde büyüme tespit edildi (Resim 8).



Resim 8: 7 haftalık tümör dokusu, **a:** prostat dokusu, **ok başı:** tümöral doku, **şerit:** veziküla seminalis, **b:** mezenteriyel lenf düğümü, **c:** iliak lenf düğümü

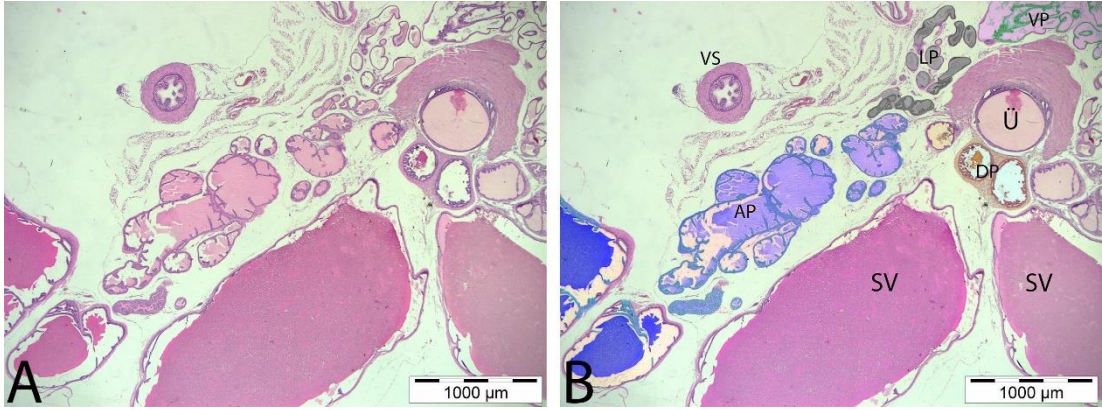
Deneklerden alınan tümöral dokuların kumpasla uzunluk ve genişlikleri ölçüldü ve Faustino-Rocha ve ark. (2013) geliştirmiş olduğu tümör hacim hesaplama formülü ($V = (W^2 \times L) / 2$) kullanarak tümöral dokuların hacimleri hesaplandı ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Shapiro-Wilk testine göre; tümör hacmi verileri normal dağılım göstermemektedir ($p < 0,05$). Dolayısı ile Kruskal Wallis testi uygulandı. 3., 5. ve 7. hafta olmak üzere farklı zamanlarda ölçülen tümör hacimleri Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldığında, ortalama sıra değerlerine göre tümör hacmi; 3. haftalık grupta 3,50; 5. haftalık grupta 10,08; 7. haftalık grupta ise 14,92 olarak bulunmuş olup, 3. haftalık tümör grubu ile 5 haftalık ve 7 haftalık tümör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p < 0,05$), 5 haftalık ile 7 haftalık grubun tümör hacminde artış şekillenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Analizler sonucunda tümör hacmi 3. haftada en düşük, 7. haftada en yüksek düzeydedir. Yani haftalar ilerledikçe tümör hacminde önemli bir şekilde artış meydana gelmektedir (Tablo 6).

Tablo 6. Tümör hacimlerinin istatistiki analizleri

4.4. Mikroskopik Bulgular

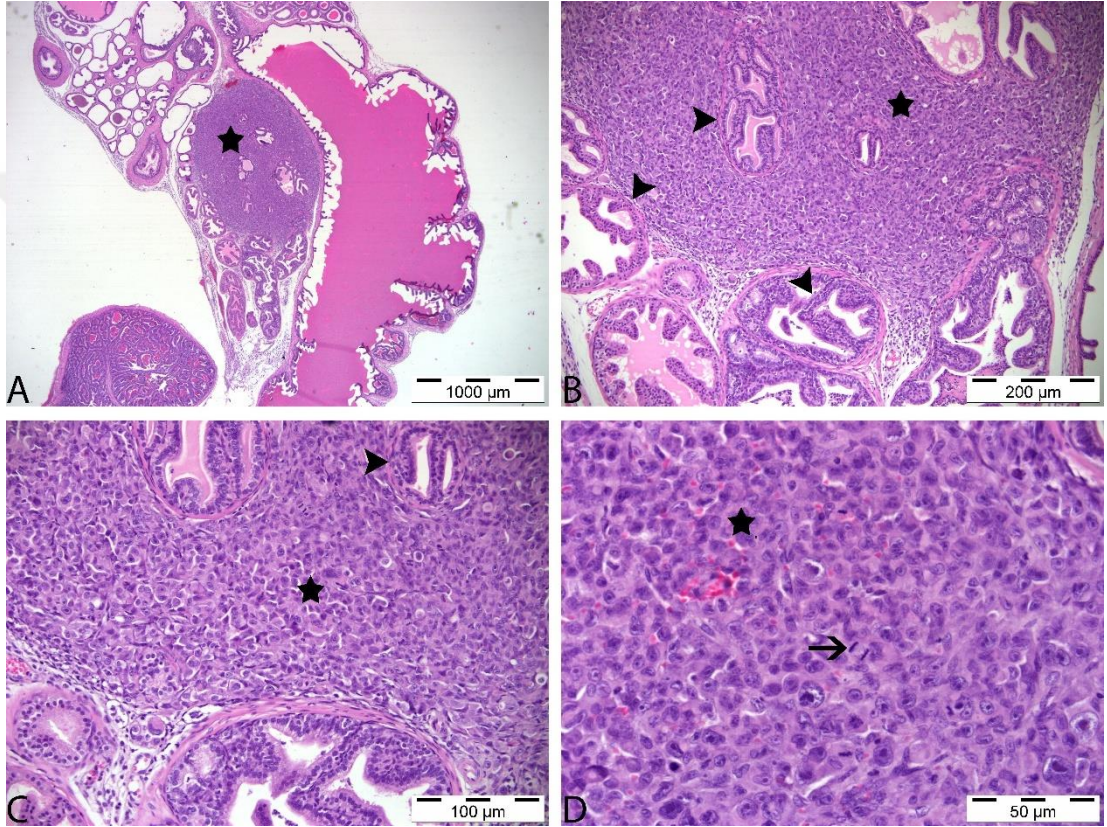
4.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları

Kontrol grubundan alınan dokuların histopatolojik incelemesinde herhangi bir patolojik lezyona rastlanılmamış olup prostat dokularının normal histolojik yapılarını koruduğu tespit edilmiştir (Resim 9).



Resim 9: A: Kontrol grubu, prostat dokusu, B: SV: seminulo vezikularis, VS: vas deferens, Ü: üretra, AP: anterior prostat lobu (mor alan), DP: dorsal prostat lobu (turuncu alan), LP: lateral prostat lobu (gri alan), VP: ventral prostat lobu (pembe alan), H&E, Bar= 1000 µm.

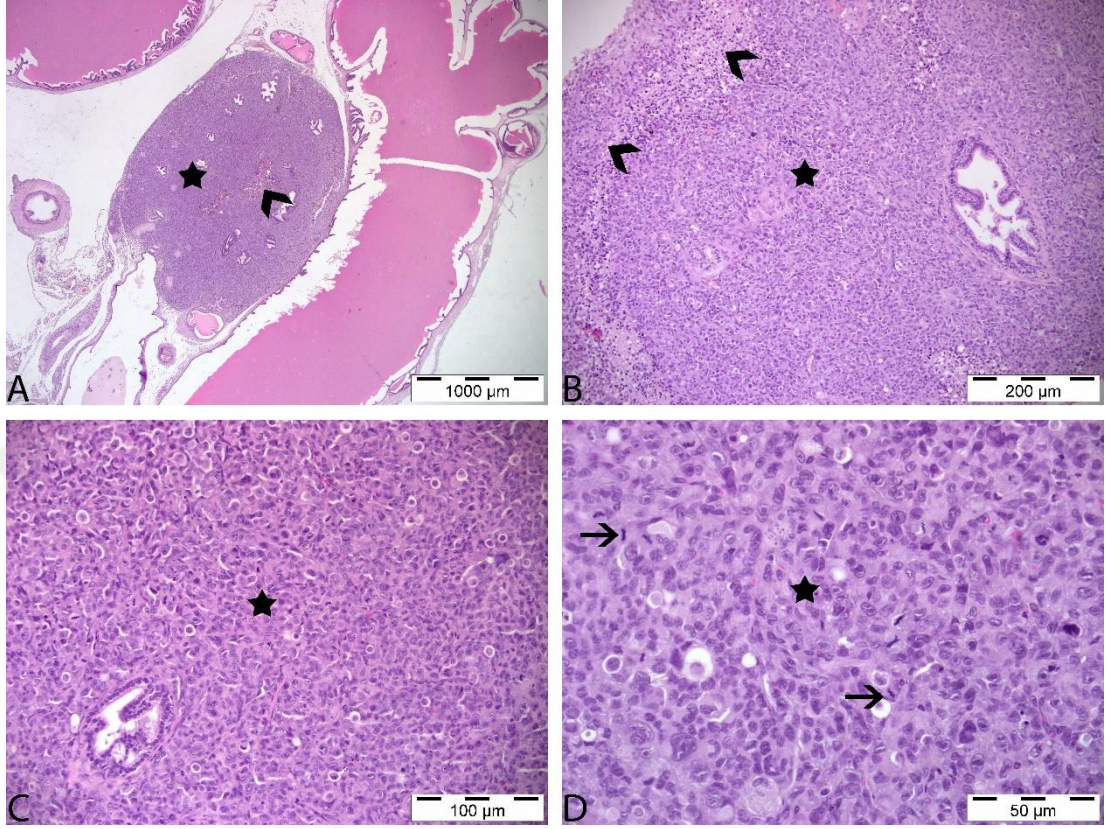
Üç haftalık tümör grubunda ise enjeksiyonun yapıldığı anterior prostat lobunda soluk, oval-yuvarlak çekirdekli, belirgin nükleoluslu, eozinofilik sitoplazmalı tümör hücreleri içeren solid tümöral bir kitleye rastlanıldı. Tümör hücrelerinin bazılarında mitotik figürler tespit edildi. Bazı bez epitel hücrelerinde papiller proliferasyonlar, elek benzeri desenler, küçük, düzensiz bez yapılarına rastlanıldı. İliak ve mezenteriyal lenf düğümlerinde herhangi bir patolojik lezyona rastlanılmadı (Resim 10).



Resim 10: 3 haftalık tümör grubu, **A-B-C-D:** Farklı magnifikasyonlarda tümöral doku, **yıldız:** tümöral doku, soluk, oval-yuvarlak çekirdekli, belirgin nükleoluslu, eozinofilik sitoplazmalı tümör hücreleri, **ok başı:** bez epitel hücrelerinin papiller-elek benzeri proliferasyonu, **ok:** mitotik figür, H&E.

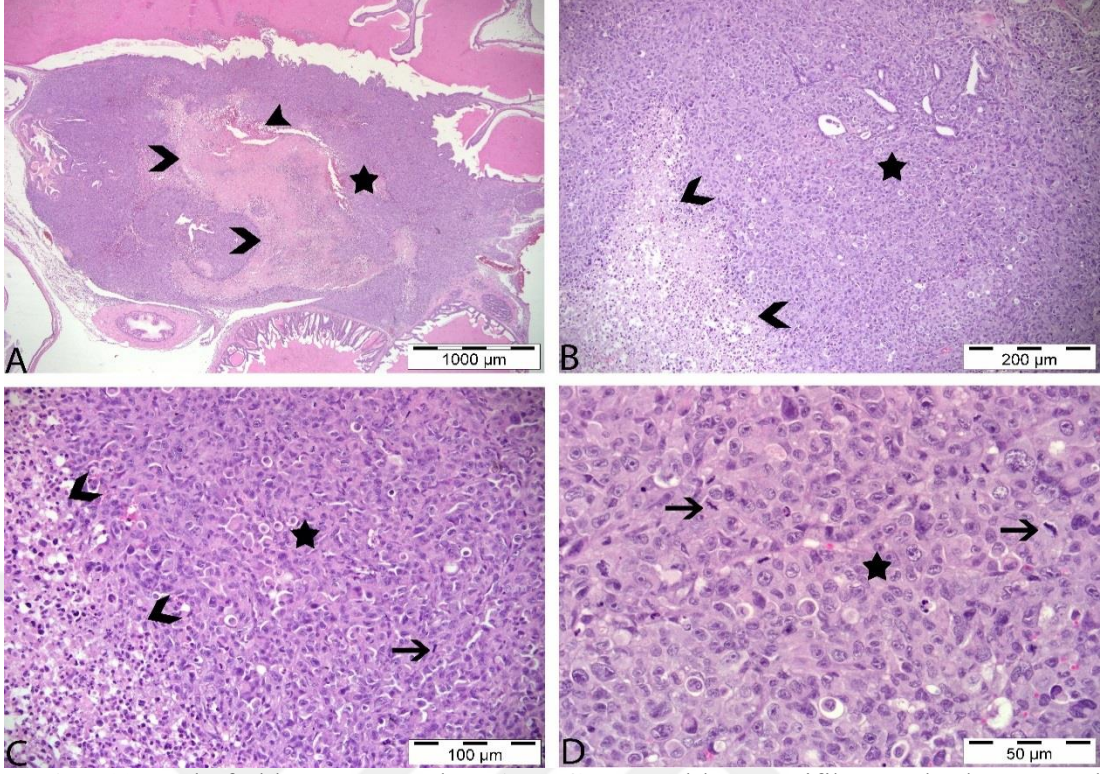
Beş haftalık tümör grubunda ise 3 haftalık tümör grubuna benzer şekilde; yuvarlak-oval çekirdekli, belirgin nükleoluslu, eozinofilik sitoplazmalı tümör hücrelerinin solid yapı oluşturulduğu tespit edildi. Solid tümöral dokunun içinde bez yapılarına da rastlanıldı. 3 haftalık tümör grubuna kıyasla mitotik figürlerin daha fazla olduğu gözlemlendi. Tümör hücrelerinde pleomorfizm gözlenen bulgulara

arasındaydı. Bunun yanında iki denekten alınan tümöral dokuda komedonekroz ve kanama saptandı (Resim 11).



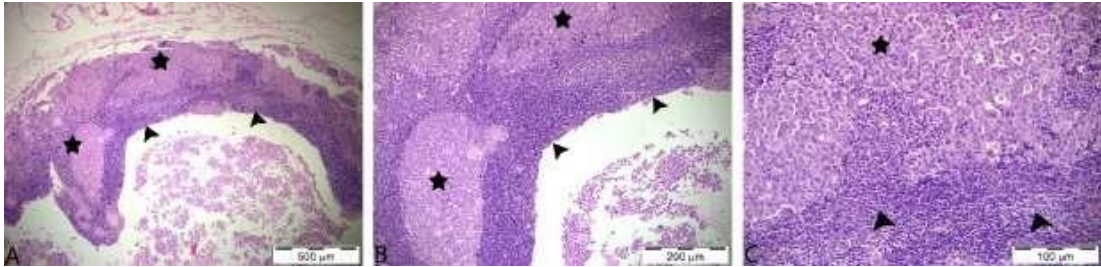
Resim 11: 5 haftalık tümör grubu, **A-B-C-D:** Farklı magnifikasyonlarda tümöral doku, **yıldız:** tümöral doku, soluk, oval-yuvarlak çekirdekli, belirgin nükleoluslu, eozinofilik sitoplazmalı tümör hücreleri, **şerit:** komedonekroz alanları, **ok:** mitotik figür, H&E.

Yedi haftalık tümör grubunda ise diğer gruplara benzer şekilde tümöral kitlede eozinofilik sitoplazmalı, belirgin nükleoluslu ve yuvarlak-oval nükleollu tümör hücrelerine sahip solid tümöral kitlenin varlığı tespit edildi. Tümör hücrelerinde belirgin anizositozis, anizonükleozis ve çekirdekçik sayısında artış gözlemlenen bulgular arasında idi. Bazı tümör hücrelerinin çekirdeklerinde aşırı büyüme ve hiperkromazi tespit edildi. Tümör hücrelerinin seminulo vezikularise infiltrate olduğu saptandı. Mitotik aktivitenin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Gruptaki tüm deneklerde tümöral dokuların ortasında komedonekroz ve kanama alanlarının varlığı saptandı (Resim 12).



Resim 12: 7 haftalık tümör grubu, **A-B-C-D:** Farklı magnifikasyonlarda tümöral doku, **yıldız:** tümöral doku, soluk, oval-yuvarlak çekirdekli, belirgin nükleoluslu, eozinofilik sitoplazmalı tümör hücreleri, **şerit:** komedonekroz alanları, **ok başı:** kanama alanı **ok:** mitotik figür, H&E.

Deneklerden alınan iliak lenf düğümlerinin 3 tanesinde metastaz tespit edildi. Mezenteriyal lenf düğümlerinde ise herhangi bir metastaza rastlanılmadı. Tümör hücreleri primer tümörlerin histolojik özelliklerini yansıttığı ve tümör hücrelerinin lenf düğümünün tamamına yayıldığı gözlemlendi (Resim 13).



Resim 13: İliak lenf düğümü, **A-B-C:** Farklı magnifikasyonlarda lenf düğümündeki metastaz alanları, **yıldız:** metastatik tümör hücreleri, **ok başı:** lenfoid doku, H&E.

Gruplardaki deneklerden alınan tümöral dokularda yapılan mitotik indeks hesaplamalarında Kolmogorov-Smirnov testine göre; mitotik aktiviteleri normal dağılım sergilediğini göstermektedir ($p>0,05$). ANAVO testi yapılarak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Yapılan istatistiki karşılaştırmada 3 haftalık ve 7 haftalık gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu tespit edilirken ($p<0,05$), 3 haftalık ile 5 haftalık ve 5 haftalık ile 7 haftalık gruplara arasında sayısal olarak mitozda artış şekillenmesine rağmen istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

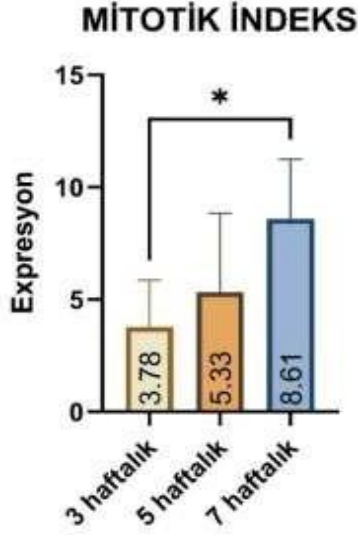
Tüm vakalara ait mitotik indeks değerleri (Tablo 7) ve istatistiki analizleri aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 8).

Tablo 7. Gruplardaki denekten alınan tümöral dokuların mitotik aktivitesi ve grup ortalamaları.

Gruplar	1.Alan	2.Alan	3. Alan	Ortalama
3 Haftalık				
1. Hayvan	4	6	4	4,66666667
2. Hayvan	3	1	0	1,33333333
3. Hayvan	5	9	5	6,33333333
4. Hayvan	2	1	1	1,33333333
5. Hayvan	4	3	9	5,33333333
6. Hayvan	3	3	5	3,66666667
Grup Ortalaması				3,77777778
5 Haftalık				
1. Hayvan	2	4	3	3
2. Hayvan	1	3	2	2
3. Hayvan	12	13	10	11,66666667
4. Hayvan	5	5	8	6
5. Hayvan	5	6	7	6
6. Hayvan	4	2	4	3,33333333
Grup Ortalaması				5,33333333
7 Haftalık				
1. Hayvan	12	15	12	13
2. Hayvan	7	12	6	8,33333333
3. Hayvan	7	8	6	7
4. Hayvan	5	6	5	5,33333333
5. Hayvan	10	6	8	8
6. Hayvan	6	10	14	10
Grup Ortalaması				8,61111111

Tablo 8. Gruplar arasındaki mitotik indeksin istatistiki analizi

Mitotik indeks	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
	3,78 ±2,08	5,33 ±3,51	8,61 ±2,65



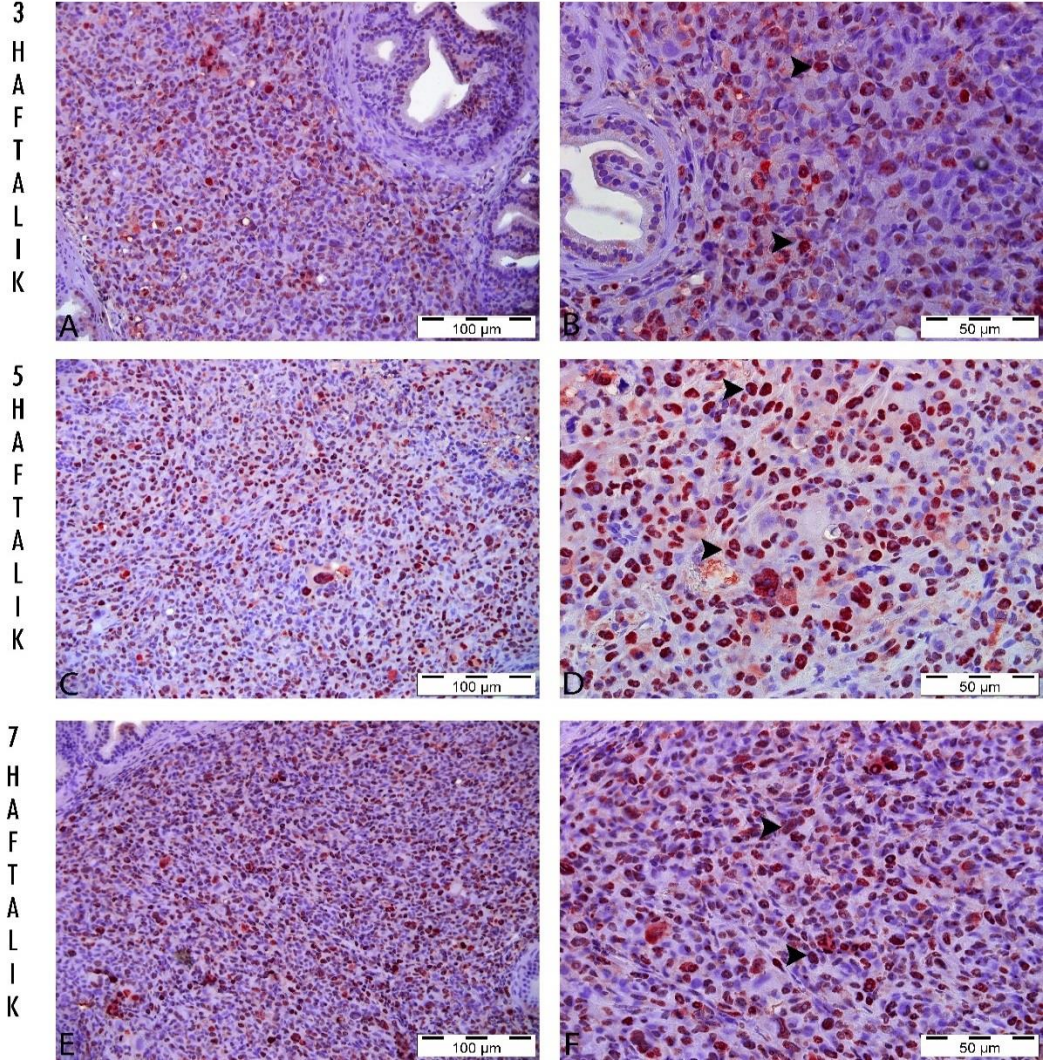
4.4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular ve İstatistiksel Analizler

İmmunohistokimyasal yöntemle dokuların; PCNA, MMP-9, TGF- β , FGF, VEGF, Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 ekspresyonları değerlendirildi. Yapılan tüm boyamalarda kontrol dokularında herhangi bir pozitif reaksiyona rastlanılmadı.

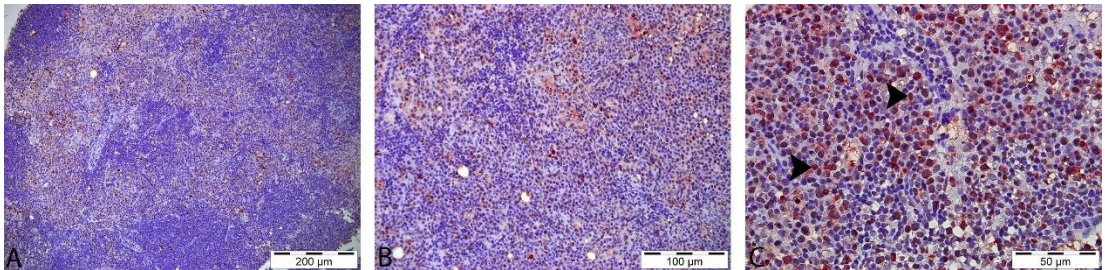
4.4.2.1. PCNA

Deneklerden alınan tümöral dokuların ve ilgili lenf düğümlerinin PCNA ekspresyonları immunohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. Yapılan boyamalar sonucunda tümör hücrelerinde şiddetli intranükleer immunpozitif reaksiyonlar görüldü. Tümöral dokular; immunpozitif hücre sayıları yönünden karşılaştırıldığında en güçlü reaksiyonun 7 haftalık tümör grubunda olduğu, ikinci en yüksek immunoreaktivitenin 5 haftalık grupta meydana geldiği tespit edildi (Resim 14). 7 haftalık tümör grubundan alınan metastatik lenf düğümlerinde yapılan immunohistokimyasal boyamalarda da primer tümör dokusuna benzer şekilde intranükleer immunpozitif reaksiyonlara rastlanıldı (Resim 15).

PCNA



Resim 14: Prostat kanseri, PCNA immunohistokimyasal boyama, **A-B:** 3 haftalık tümör grubu, **C-D:** 5 haftalık tümör grubu, **E-F:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** tümör hücrelerinde intranükleer immunpozitif reaksiyonlar, IHC

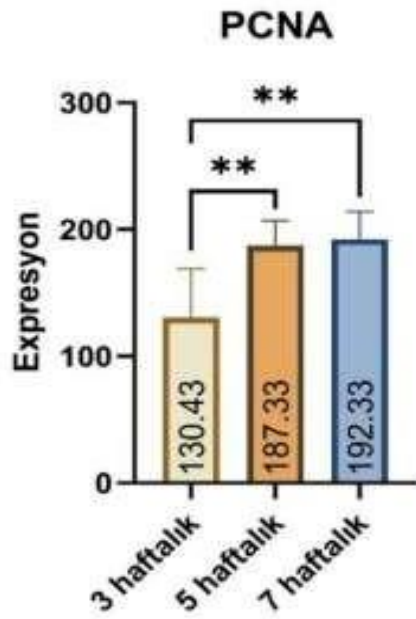


Resim 15: İliak lenf düğümü, **A-B-C:** Farklı büyütmelerde PCNA immunohistokimyasal boyaması, **ok başı:** Tümör hücrelerinde intranükleer immunpozitif reaksiyonlar, IHC.

Gruplardaki ortalama pozitif hücre sayılarının istatistiki karşılaştırmalarında 3 haftalık tümör grubunda diğer gruplara nazaran PCNA ekspresyonunun daha düşük olduğu, hem 5 haftalık hem de 7 haftalık tümör gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu ($p < 0.01$), 5 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grubu arasındaki farkın ise istatistiki olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Tablo 9), ($p > 0,05$). Bu veriler ışığında, tümör hücre proliferasyonunun tümör ilerlemesine paralel bir şekilde attığı gözlemlenmiştir.

Tablo 9. Tüm gruplara ait ortalama PCNA pozitif hücre sayılarının istatistiksel karşılaştırılması

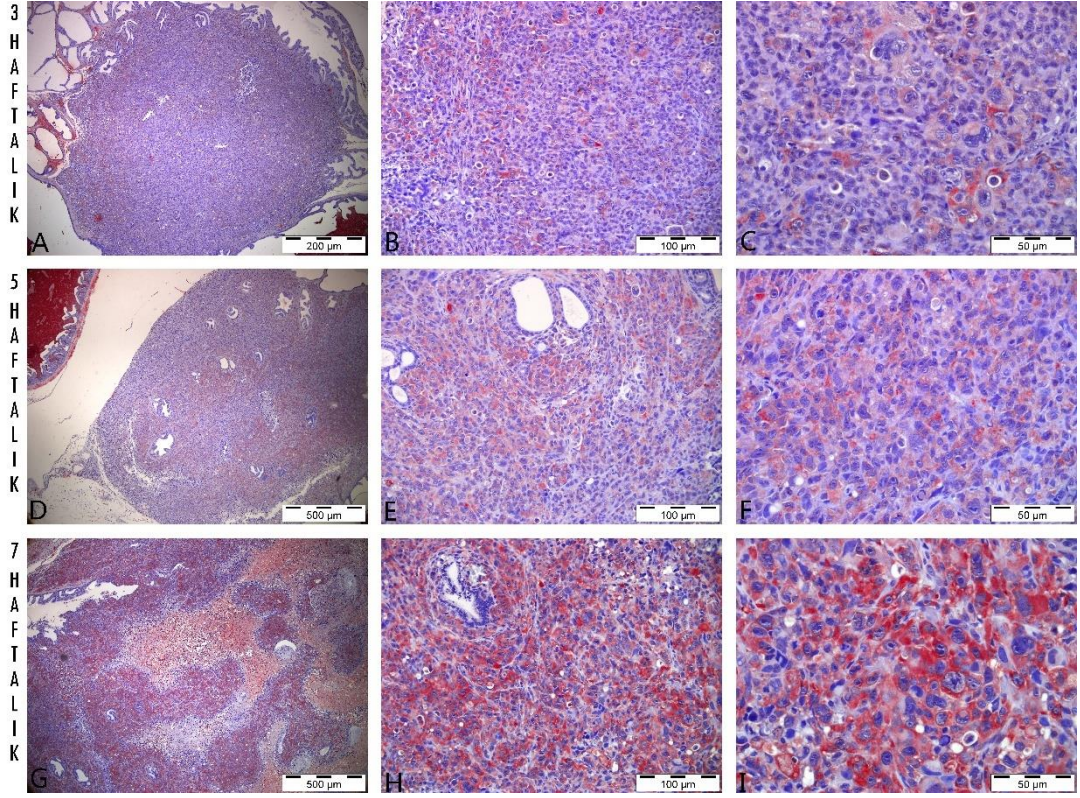
	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
PCNA	130,43±38,64	187,33±19,61	192,33±21,76



4.4.2.2. TGF- β

TGF- β primer antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, tümör hücrelerinin sitoplazmasında granüler tarzda yaygın immunpozitif reaksiyonlara rastlanıldı. TGF- β immün pozitif reaktivitenin özellikle pleomorfizmin belirgin olduğu alanlarda daha yoğun olduğu tespit edildi. Yapılan boyamalar sonucunda

TGF- β immunreaktivitesinin tümör gelişimine paralel artış gösterdiği ve en şiddetli immunreaktivitenin 7 haftalık tümör grubunda olduğu gözlemlendi. Bunun yanında 7 haftalık tümör grubunda, 5 haftalık tümör grubuna kıyasla TGF- β immunreaktivitesinin şiddetinde ve yoğunluğunda artış meydana geldiği ve en düşük immunpozitif reaksiyonun 3 haftalık tümör grubunda olduğu tespit edildi (Resim 16).

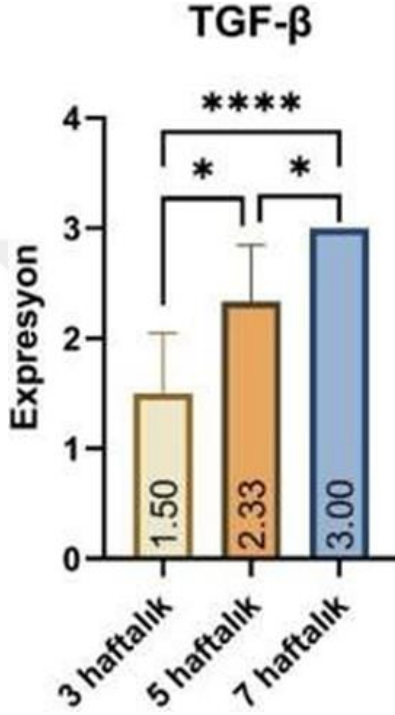


Resim 16: Prostat kanseri, TGF-beta immunohistokimyasal boyama, **A-B-C:** 3 haftalık tümör grubu, **D-E-F:** 5 haftalık tümör grubu, **G-H-I:** 7 haftalık tümör grubu, tümör hücrelerinin sitoplazmalarında TGF-beta immunpozitif reaksiyonlar, IHK.

Aşağıdaki grafikler de 3., 5. ve 7. haftalarda sakrifiye edilen gruplardan alınan tümöral dokularda TGF- β ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak analiz sonuçları verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 3 haftalık grup ile 5 haftalık ($p < 0.05$) ve 7 haftalık ($p < 0.0001$) tümör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Bunun yanında 5 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grupları arasında da anlamlı fark tespit edildi ($p < 0.05$), (Tablo 10).

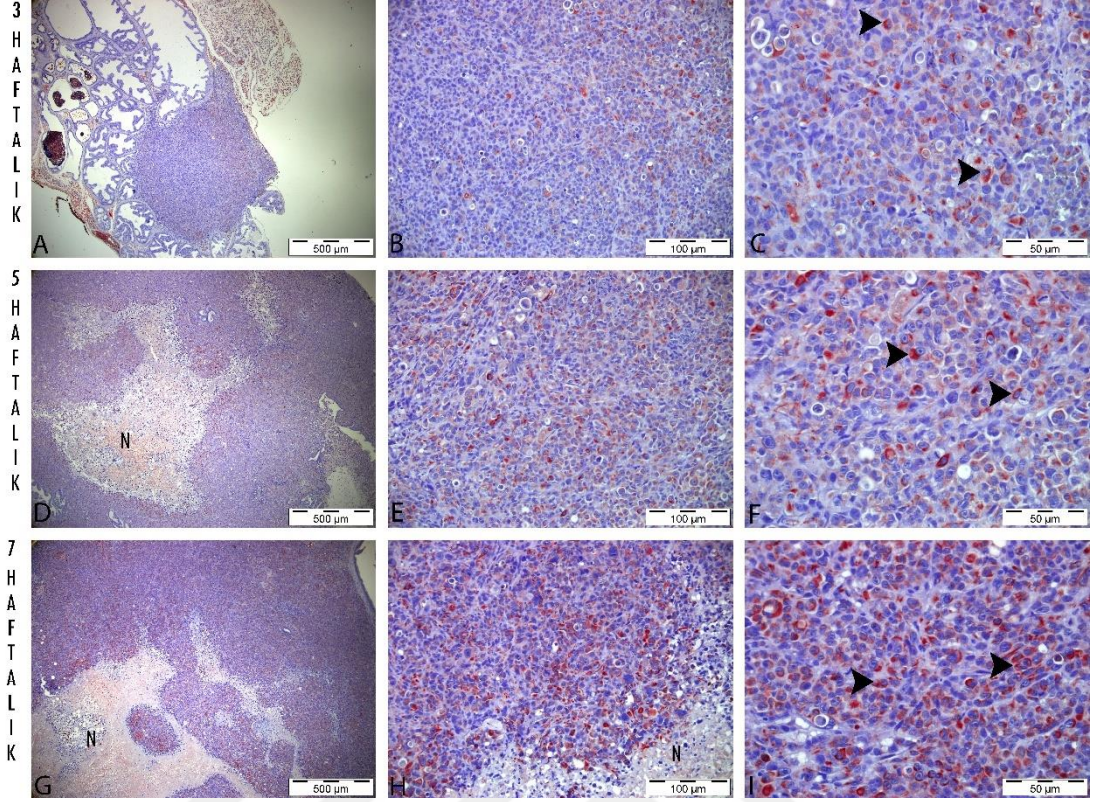
Tablo 10. Tüm gruplara ait ortalama immunpozitif TGF- β hücrelerinin istatistiksel karşılaştırılması.

	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
TGF- β	1,50 \pm 0,55	2,33 \pm 0,52	3,00 \pm 0,00



4.4.2.3.VEGF

Alınan tümöral doku örneklerinin VEGF ekspresyonunun immunohistokimyasal yöntemle incelenmesi sonucunda tümör hücrelerinde intrasitoplazmik pozitif immunreaktivite gözlemlendi. İmmunpozitif reaksiyonların özellikle nekrotik alanların çevresindeki tümör hücrelerinde daha şiddetli olduğu gözlemlendi (Resim 17). VEGF ekspresyonu açısından gruplar semikantitatif olarak karşılaştırıldığında en şiddetli ve en yoğun reaksiyonun 7 haftalık tümör grubunda olduğu en düşük reaksiyonun ise 3 haftalık tümör grubunda şekillendiği saptandı.

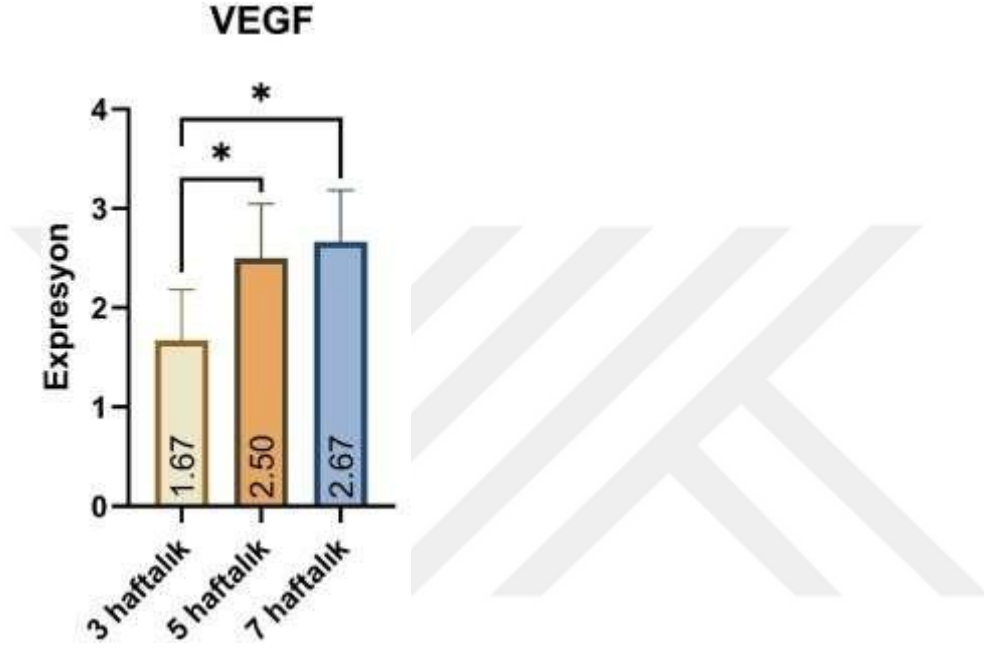


Resim 17: Prostat kanseri, VEGF immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C:** Farklı büyütmelerde 3 haftalık tümör grubu, **D-E-F:** Farklı büyütmelerde 5 haftalık tümör grubu, **G-H-I:** Farklı büyütmelerde 7 haftalık tümör grubu, **ok başı:** tümör hücrelerinin sitoplazmalarında VEGF immunpozitif reaksiyonlar, **N:** nekroz alanları, **IHK.**

Deneklerden alınan tümöral dokular VEGF ekspresyon düzeyleri yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Yapılan analizler sonucunda 3 haftalık tümör grubu ile 5 ve 7 haftalık tümör grupları arasında istatistiki açıdan anlamlı fark tespit edilirken ($p < 0,05$), 5 haftalık ve 7 haftalık tümör grupları arasında farkın istatistiki açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$), (Tablo 11).

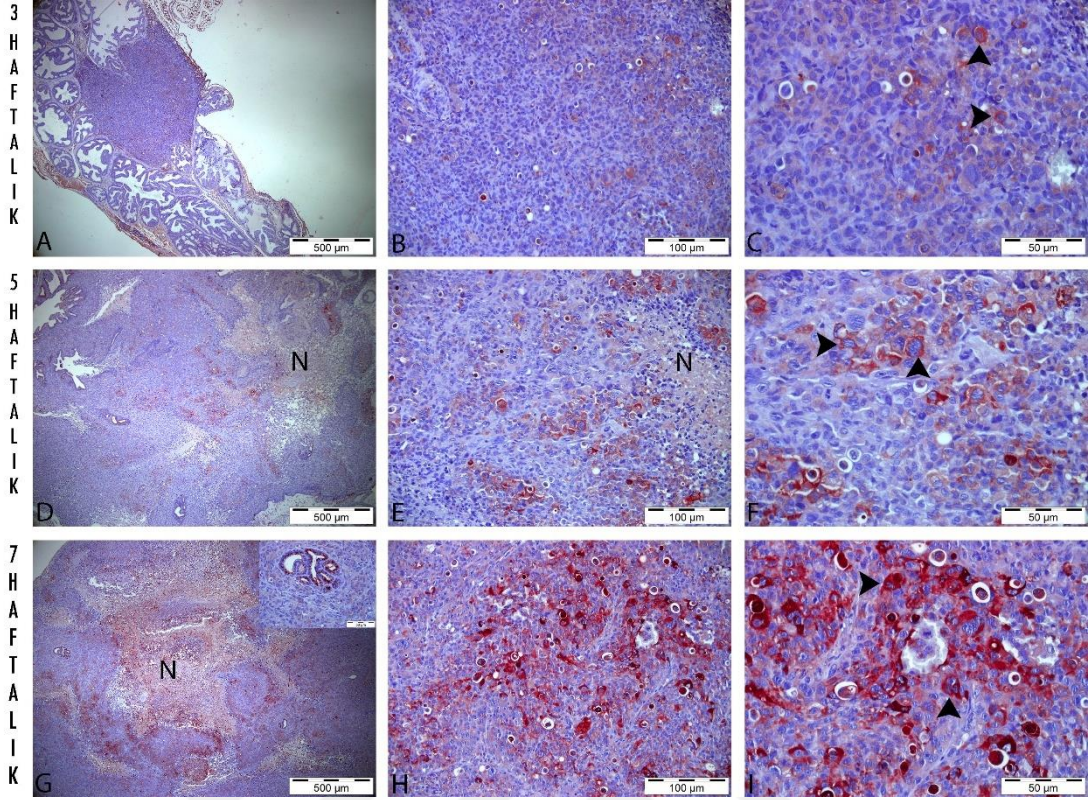
Tablo 11. Tüm gruplara ait ortalama immunpozitif VEGF hücrelerinin istatistiksel karşılaştırılması.

	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
VEGF	1,67±0,52	2,50±0,55	2,67±0,52



4.4.2.4.FGF

FGF primer antikoru kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamalar neticesinde tümör hücrelerinde intrasitoplazmik immunreaktivite tespit edildi. Yapılan immunohistokimyasal boyamalarda, en düşük immunpozitif boyanmaya 3 haftalık tümör grubunda rastlanırken, en şiddetli reaksiyonun ise 7 haftalık tümör grubunda olduğu gözlemlendi. İmmunpozitif reaksiyonların tümör hücrelerinin sitoplazmasında ve özellikle nekroz çevresindeki tümör hücrelerinde daha şiddetli olduğu tespit edildi. Bunun yanında 7 haftalık tümör grubunda bez epitel hücrelerinin de intrasitoplazmik pozitif immun reaksiyon verdiği gözlemlendi (Resim 18). Boyamalar sonucunda FGF ekspresyonunun tümör gelişimine paralel bir şekilde artış gösterdiği saptandı.

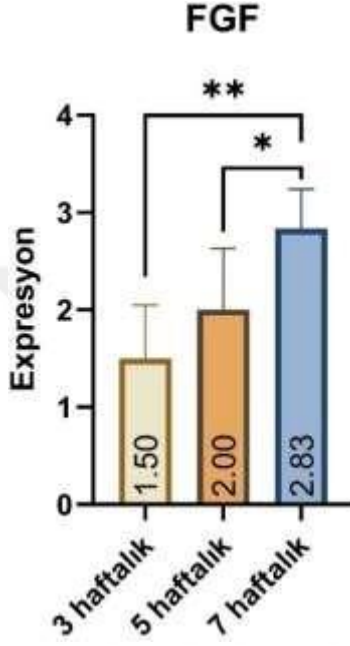


Resim 18: Prostat kanseri, FGF immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C:** Farklı büyütmelerde 3 haftalık tümör grubu, **D-E-F:** Farklı büyütmelerde 5 haftalık tümör grubu, **G-H-I:** Farklı büyütmelerde 7 haftalık tümör grubu, **G:** küçük resim: Bez epitel hücrelerinde pozitif immunreaksiyon, **ok başı:** tümör hücrelerinin sitoplazmalarında FGF immunpozitif reaksiyonlar, **N:** nekroz alanları, IHK.

FGF immunoreaktivitesinin istatistiki analizinde, 3 haftalık ile 7 haftalık tümör grupları arasında ($p < 0.01$) ve 5 haftalık ile 7 haftalık tümör grupları arasındaki ($p < 0,05$) fark anlamlı kabul edildi. 3 haftalık ve 5 haftalık tümör gruplarındaki VEGF ekspresyon düzeyleri arasındaki farkın istatistiki açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$), (Tablo 12).

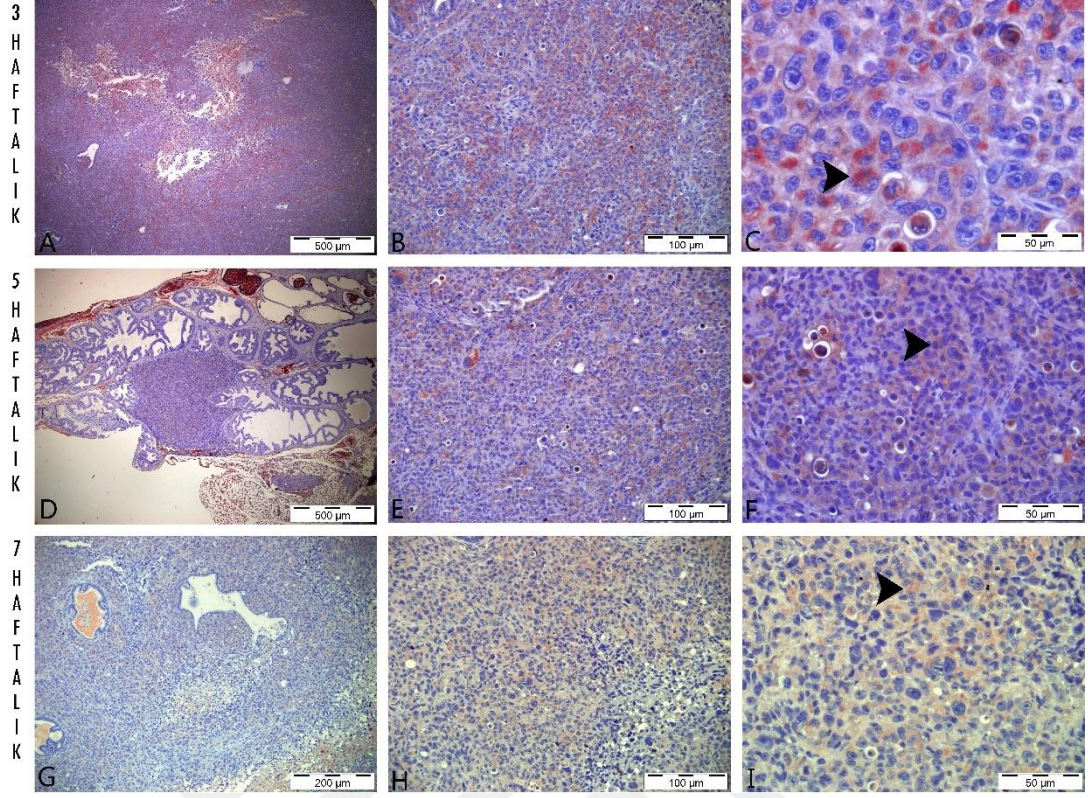
Tablo 12. Grupların immunpozitif FGF ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması

	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
FGF	1,50±0,55	2,00±0,63	2,83±0,41

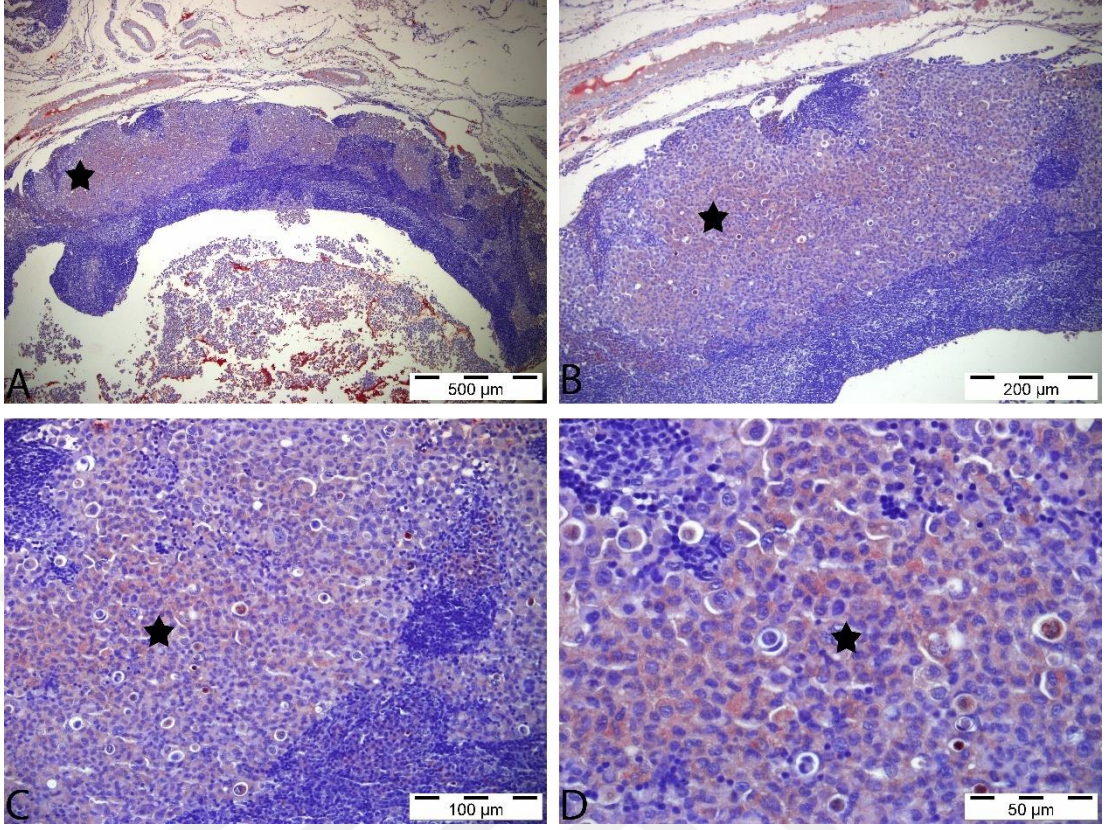


4.4.2.5.Bax

Proapoptotik bir marker olan Bax antikorunun immunohistokimyasal incelemesinde, tümör hücrelerinde sitoplazmik immunpozitif reaksiyonlara rastlanıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapılırken en şiddetli ve en yoğun immunpozitif reaksiyonun 3 haftalık tümör grubunda şekillendiği tespit edildi. İkinci en şiddetli reaksiyonun 5 haftalık tümör grubunda olduğu gözlemlenirken, 7 haftalık tümör grubundaki dokularda zayıf intrasitoplazmik immunpozitif reaksiyonların meydana geldiği gözlemlendi. Yapılan boyamalar sonucunda tümör gelişimi ve agresifliği ile Bax immunreaktivitesi arasında negatif bir ilişki olduğu saptandı (Resim 19). Metastatik lenf düğümlerine yapılan Bax immunohistokimyasal boyamalar da tümör hücrelerinin sitoplazmasında zayıf immunpozitif reaksiyonlara rastlanıldı (Resim 20).



Resim 19: Prostat kanseri, Bax immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C:** 3 haftalık tümör grubu, **D-E-F:** 5 haftalık tümör grubu, **G-H-I:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başı:** Bax intrasitoplazmik immunpozitif hücreler, IHK.

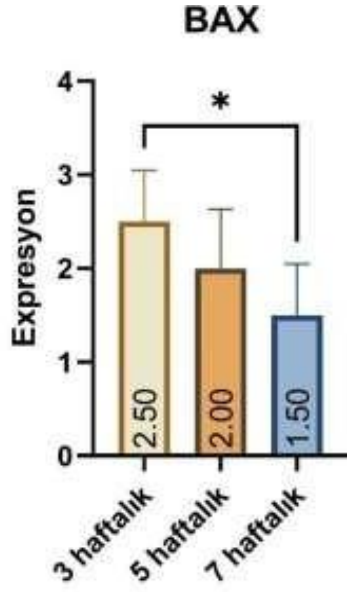


Resim 20: 7 haftalık tümör grubu, iliak lenf düğümü metastazı, **yıldız:** Bax immunpozitif reaksiyon alanları IHK.

Deneklerden alınan dokuların Bax immunpozitif reaksiyonlarının istatistiki karşılaştırılması sonucunda, 3 haftalık ve 7 haftalık tümör grupları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir artış olduğu tespit edilirken ($p < 0,05$), 3 haftalık grup ile 5 haftalık ve 5 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grubu arasında; Bax immunreaktivitesinin şiddetinde ve yoğunluğunda bir artış meydana gelmiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$) (Tablo 13).

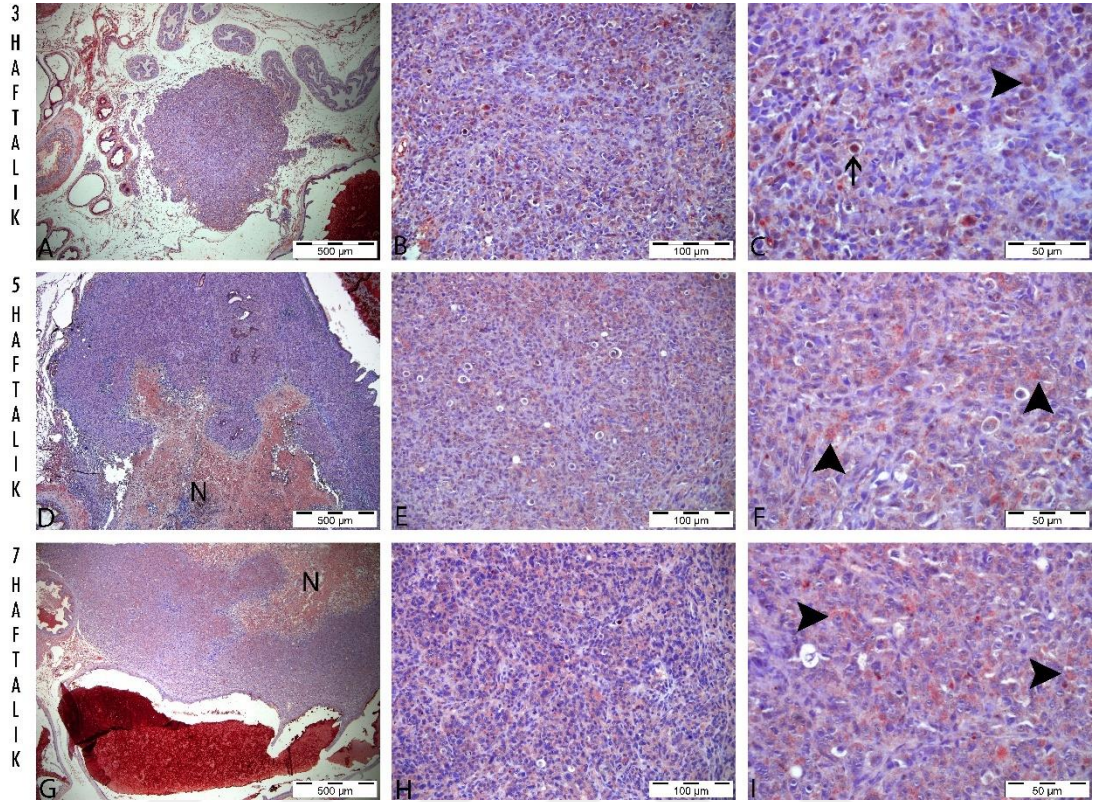
Tablo 13. Deneklerden alınan dokuların Bax immunpozitif hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması

	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
Bax	2,50±0,55	2,00±0,63	1,50±0,55

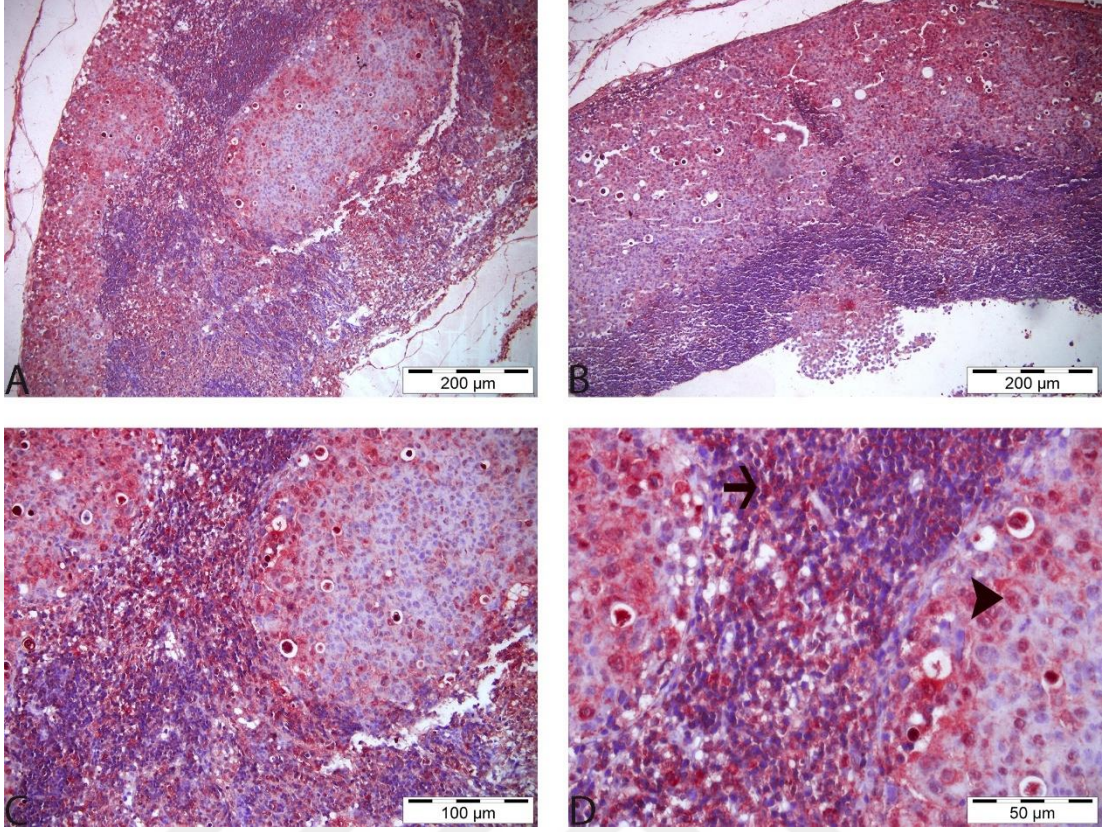


4.4.2.6.Bcl-2

Antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 antikoruna ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda, tümör hücrelerinin sitoplazmasında granüler tarza immunpozitif reaksiyonlar gözlemlendi. En yüksek immunreaktiviteye 7 haftalık tümör grubunda rastlanılırken, yoğunluk ve şiddeti en düşük boyanmaya 3 haftalık tümör grubunda rastlanıldı. Bunun yanında 3 haftalık tümör grubunda bazı tümör hücrelerinin çekirdeklerinde de immunpozitif reaksiyonlar tespit edildi. Tümör gelişimi arttıkça Bcl-2 ekspresyonunun arttığı tespit edildi (Resim 21). Metastaz şekillenen 7 haftalık tümör grubu iliak lenf düğümlerinde yapılan Bcl-2 immunohistokimyasal boyamasında tümör hücreleri ile birlikte yangı hücrelerinde de intrasitoplazmik immunpozitif reaksiyonlara rastlanıldı (Resim 22).



Resim 21: Prostat kanseri, Bcl-2 immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C:** 3 haftalık tümör grubu, **D-E-F:** 5 haftalık tümör grubu, **G-H-I:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** tümör hücrelerinde Bcl-2 intrasitoplazmik immunpozitif reaksiyonlar, **ok:** intranükleer Bcl-2 immunpozitif reaktivite, **N:** nekroz, IHC.

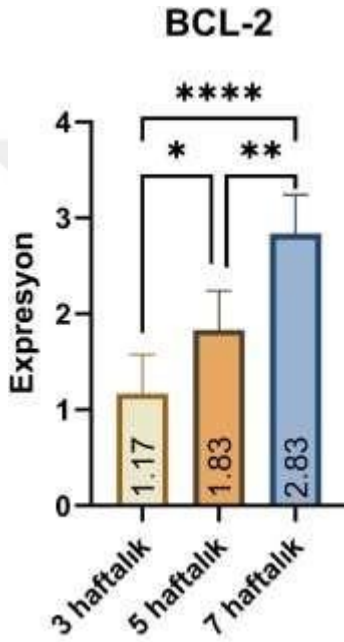


Resim 22: 7 haftalık tümör grubu, iliak lenf düğümü metastazı, **yıldız:** Bcl-2 immunpozitif reaksiyon alanları IHK.

Gruplardaki deneklerden alınan tümöral dokuların Bcl-2 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonucunda, 3 haftalık ile 5 haftalık tümör grupları arasında ($p < 0,01$) ve 5 haftalık ile 7 haftalık tümör grupları arasında ($p < 0,01$) istatistiki açıdan anlamlı fark olduğu gözlemlendi. Bunun yanında 3 haftalık ile 7 haftalık tümör gruplarındaki Bcl-2 ekspresyonunda son derece anlamlı bir artış saptandı ($p < 0.0001$), (Tablo 14).

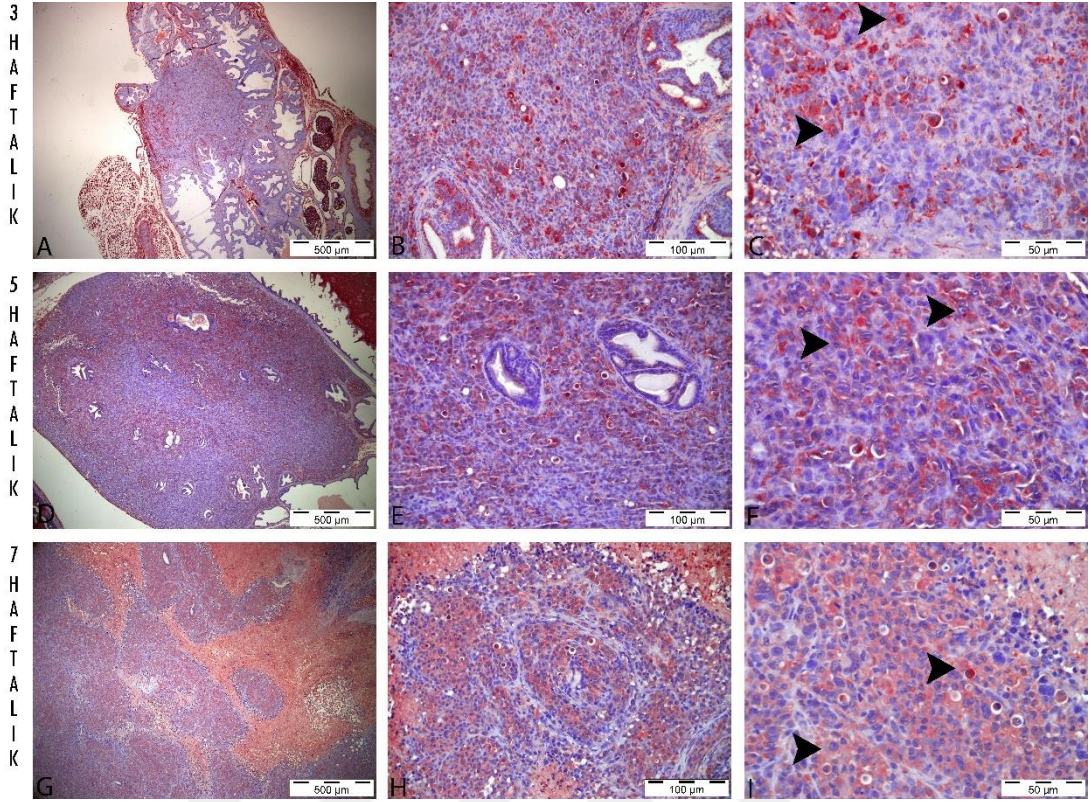
Tablo 14. Bcl-2 immunopozitif hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması

	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
Bcl-2	1,17±0,41	1,83±0,41	2,83±0,41

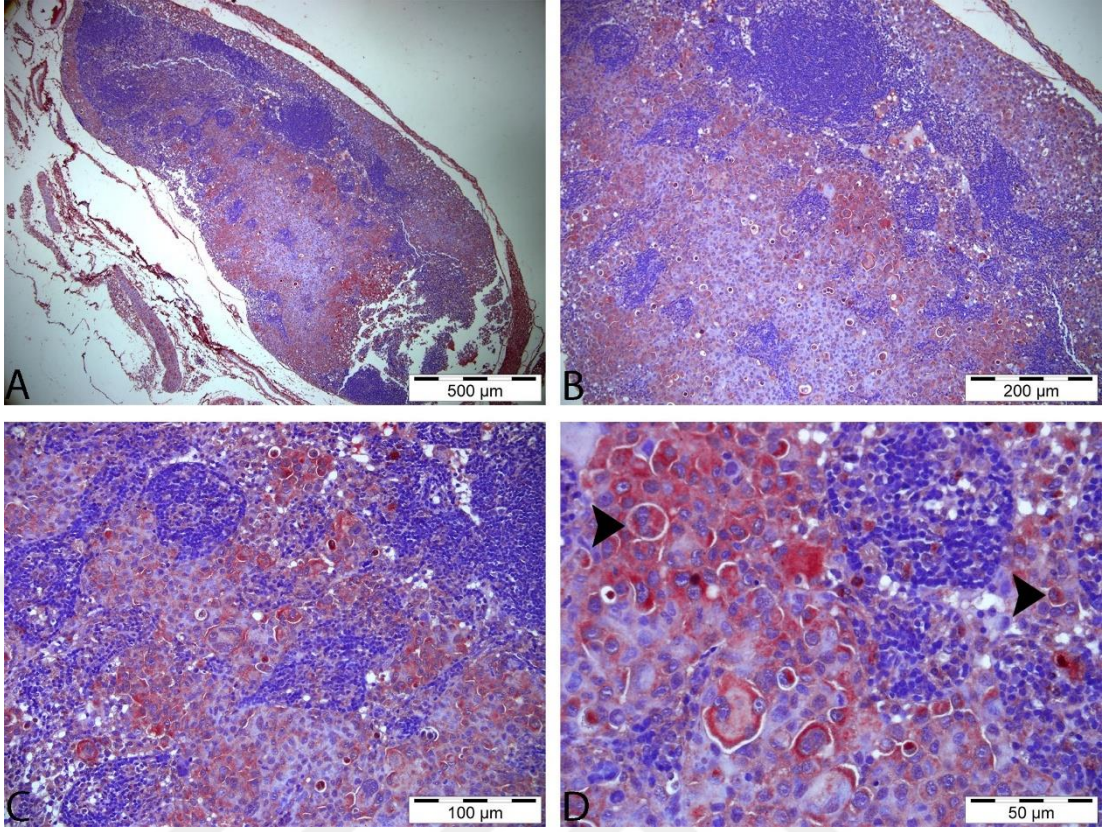


4.4.2.7.TLR-3

Yapılan TLR-3 immunohistokimyasal boyamaları sonucunda tümör hücrelerinde yoğun intasitoplazmik immunopozitif reaksiyonlara rastlanıldı. Gruplar boyanma yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde en yoğun boyanmanın 7 haftalık tümör grubunda, ikinci sırada ise 5 haftalık tümör grubunda olduğu gözlemlendi (Resim 23). Metastaz şekillenen 3 hayvanın iliak lenf düğümlerinde primer tümör odağına benzer şekilde sitoplazmik yerleşimli şiddetli ve yoğun immunopozitif reaksiyonlara rastlanıldı (Resim 24).



Resim 23: Prostat kanseri, TLR-3 immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C:** 3 haftalık tümör grubu, **D-E-F:** 5 haftalık tümör grubu, **G-H-I:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** TLR-3 intrasitoplazmik immunpozitif reaksiyonlar, IHK.

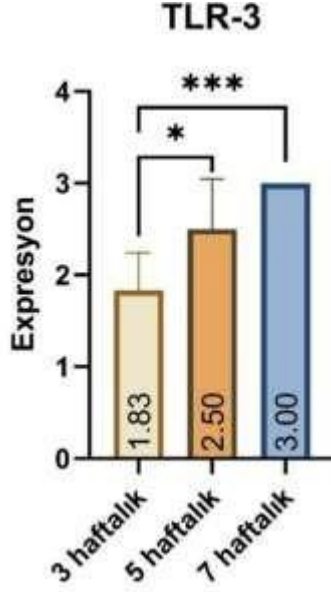


Resim 24: Metastaz şekillenmiş iliak lenf düğümü, TLR-3 immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C-D:** farklı büyütme, **ok başları:** TLR-3 intrasitoplazmik pozitif immunreaktivite, IHK.

TLR-3 immunreaktivitesinin istatistiki karşılaştırılmasında; 3 haftalık tümör grubu ile 5 haftalık tümör grubu arasında ($p < 0,05$) ve 3 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grubu arasında ($p < 0,001$) anlamlı fark tespit edilirken, 5 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grubu arasında immunohistokimyasal reaksiyonların yoğunluğunda ve şiddetinde artış tespit edilmesine rağmen istatistiki açıdan anlamlı bir artış tespit edilmemiştir ($p > 0,05$), (Tablo 15).

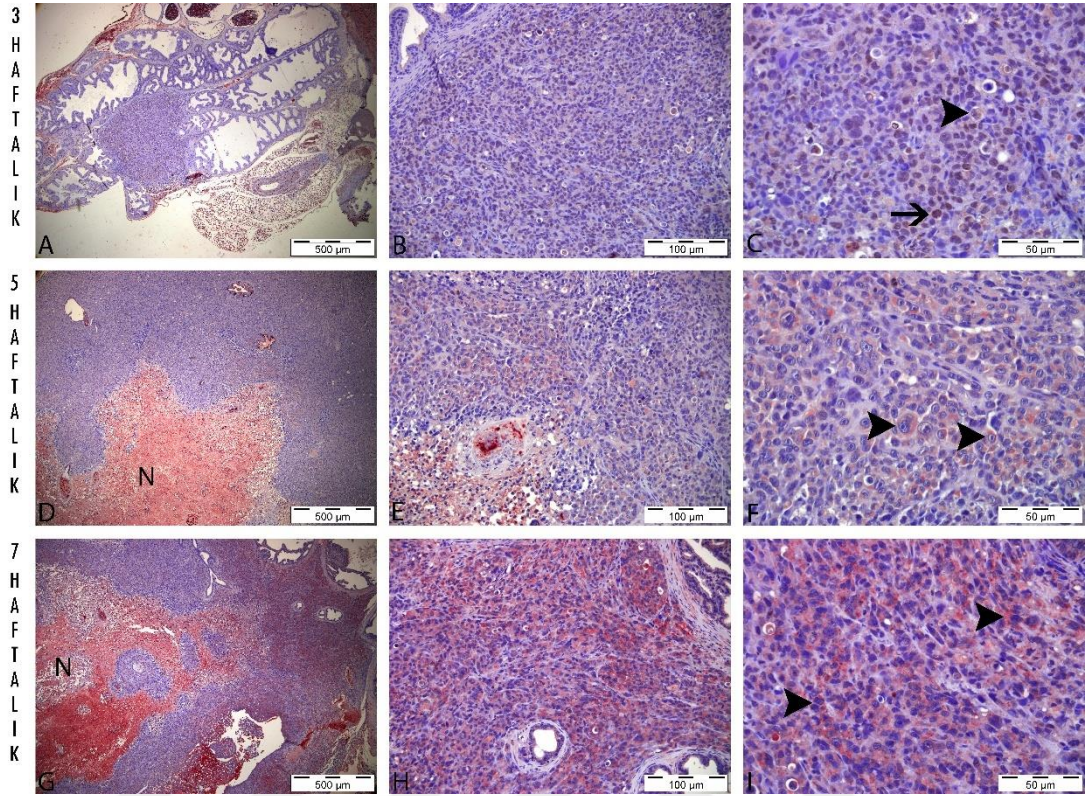
Tablo 15. İmmunpozitif TLR-3 hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılma

TLR-3	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
	1,83±0,41	2,50±0,55	3,00±0,00

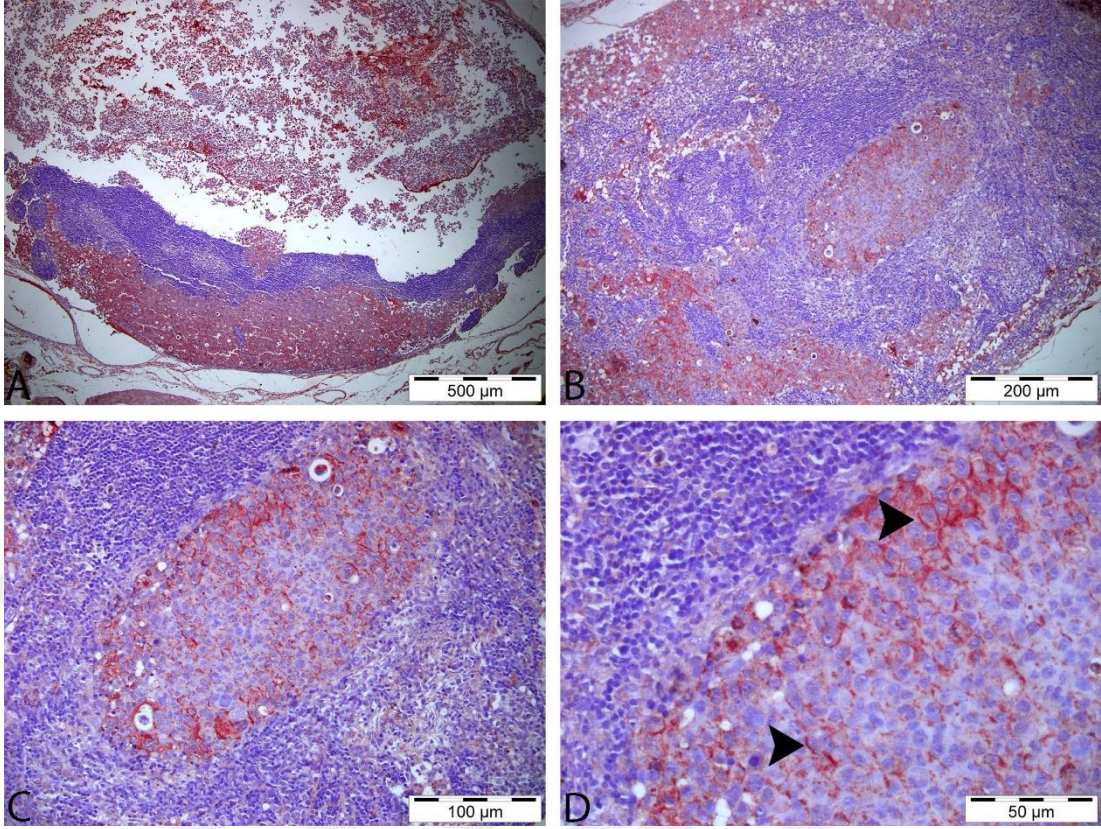


4.4.2.8. TLR-9

Tümöral dokularda yapılan TLR-9 immunohistokimyasal boyamalarda, tümör hücrelerinde intrasitoplazmik pozitif immunreaktiviteye rastlanıldı. Bunun dışında 3 haftalık tümör grubundaki deneklerden alınan doku örneklerinde bazı tümör hücrelerinin çekirdeklerinde de immunpozitif reaksiyonlar gözlemlendi. Reaksiyonların özellikle nekroz şekillenen tümör dokularında daha şiddetli olduğu tespit edildi. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; en şiddetli ve en yoğun immunreaktiviteye 7 haftalık tümör grubunda rastlanırken, en hafif boyanmanın 3 haftalık tümör grubunda olduğu gözlemlendi. Yapılan boyamalar sonucunda TLR-9 ekspresyonunun tümör gelişime paralel bir artış gösterdiği tespit edildi (Resim 25). Metastaz şekillenen 7 haftalık tümör grubuna dahil üç hayvana ait iliak lenf düğümlerinde de primer tümör kitlesindeki reaksiyonlara benzer şekilde sitoplazmik immunpozitif reaksiyonlar gözlemlendi (Resim 26).



Resim 25: Prostat kanseri, TLR-9 immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C:** 3 haftalık tümör grubu, **D-E-F:** 5 haftalık tümör grubu, **G-H-I:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** tümör hücrelerinde intrasitoplazmik immunpozitif reaksiyonlar, **ok:** intranükleer immunpozitif reaksiyon, **N:** nekroz, IHC.

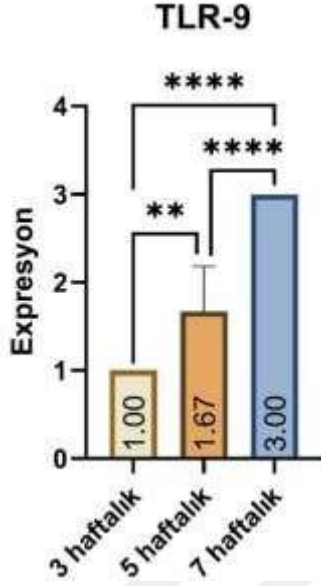


Resim 26: Metastaz şekillenmiş iliak lenf düğümü, TLR-9 immunohistokimyasal boyaması, **A-B-C-D:** farklı büyütme, **ok başları:** TLR-9 intrasitoplazmik pozitif immunreaktivite, IHK.

Gruplardan alınan tümöral dokularda yapılan TLR-9 immunohistokimyasal boyama sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Yapılan istatistiki karşılaştırmada, 3 haftalık grup ile 5 haftalık ($p<0.01$) ve 7 haftalık tümör grupları arasında ($p<0.0001$) istatistiki açıdan anlamlı bir fark olduğu tespit edildi. Bunun yanında 5 haftalık ile 7 haftalık tümör grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak son derece anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0.0001$), (Tablo 16).

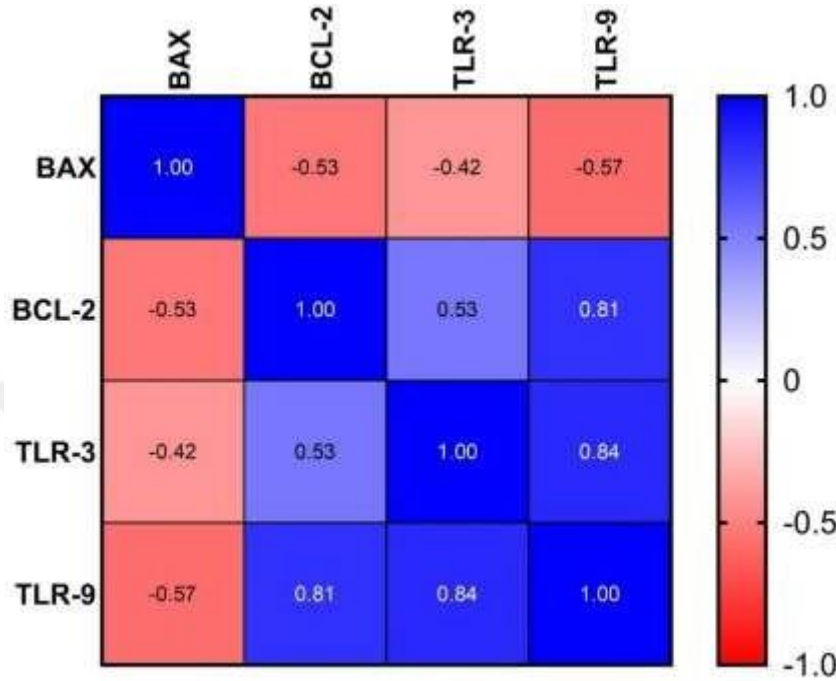
Tablo 16. İmmunpozitif TLR-9 hücre ekspresyonlarının istatistiki karşılaştırılması

	3 haftalık grup	5 haftalık grup	7 haftalık grup
TLR-9	1,00±0,00	1,67±0,52	3,00±0,00



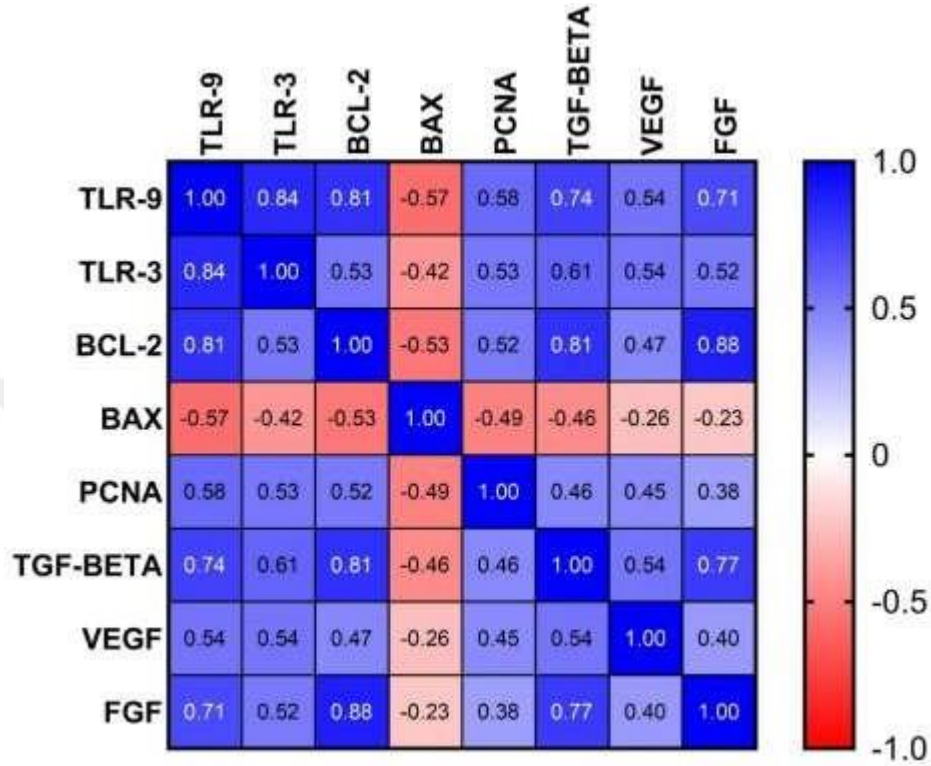
Yapılan Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 immunohistokimyasal boyama sonuçları Pearson analiz testi kullanılarak incelendi. Test sonucunda Bax-Bcl-2 ($p=0,02$), Bax-TLR-9 ($p=0,01$), Bcl-2-TLR-9 ($p=0,02$) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilirken ($p<0,05$), Bax-TLR-3 ($p=0,08$), Bcl-2-TLR-3 ($p=0,52$) ve TLR-3 ile TLR-9 ($p=0,47$) arasındaki farkın anlamsız olduğu tespit edildi ($p>0,05$). Bunun yanında Bax-Bcl-2 ($r: -0,53$), Bax-TLR-3 ($r: -0,42$), Bax-TLR-9 ($r: -0,57$) immunohistokimyasal boyamaları arasında negatif korelasyon gözlemlenirken, Bcl-2-TLR-9 ($r:0,81$) ve Bcl-2-TLR-3 ($r:0,53$), TLR-3-TLR-9 ($r:0,84$) arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlemlendi (Tablo 17), (Mavi tonları pozitif korelasyonu, kırmızı tonları negatif korelasyonu ve daha koyu renkler daha güçlü korelasyonu ifade ederken, beyaza yakın renkler zayıf korelasyonu veya korelasyonun olmadığını göstermektedir).

Tablo 17. Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 immunohistokimyasal boyamalarının Pearson korelasyon analizi testi sonuçları



PCNA, VEGF, TGF- β , FGF, Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 immunohistokimyasal boyama sonuçlarının korelasyon analizinde, Bax-PCNA ($p=0,037/r: -0,49$), istatistiksel olarak anlamlı iken ($p<0,05$), Bax-TGF- β ($p=0,06/r: -0,46$), Bax-VEGF ($p=0,3/r: -0,26$), Bax-FGF ($p=0,4/r: -0,23$) arasında istatistiksel olarak anlamsız ($p>0,05$) ve negatif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bcl-2-PCNA ($p=0,027/r:0,52$), Bcl-2-TGF- β ($p=0,0001/r:0,81$), Bcl-2-VEGF ($p=0,050/r:0,47$), Bcl-2-FGF ($p<0,0001/r:0,88$) boyamalarında yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($p<0,05$). TLR-3-PCNA ($p=0,024/r:0,53$), TLR-3-VEGF ($p=0,021/r:0,54$), TLR-3-FGF ($p=0,028/r:0,52$) karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı ve pozitif bir korelasyon gözlemlenirken ($p<0,05$), TLR-3-TGF- β ($p=0,07/r:0,61$) arasında anlamsız ve pozitif bir korelasyon gözlemlenmiştir ($p>0,05$). TLR-9-PCNA ($p=0,011/r:0,58$), TLR-9-TGF- β ($p=0,0004/r:0,74$), TLR-9-VEGF ($p=0,020/r:0,54$), TLR-9-FGF ($p=0,001/r:0,71$) arasında anlamlı ve pozitif korelasyon tespit edilmiştir ($p<0,05$), (Tablo 18). Yapılan analizler sonucunda Bax'ın tümör gelişimini baskıladığı, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9'un ise tümör ilerlemesini desteklediği kanaatine varılmıştır.

Tablo 18. PCNA, VEGF, TGF- β , FGF, Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 immunohistokimyasal boyamalarının Pearson korelasyon analizi testi sonuçları

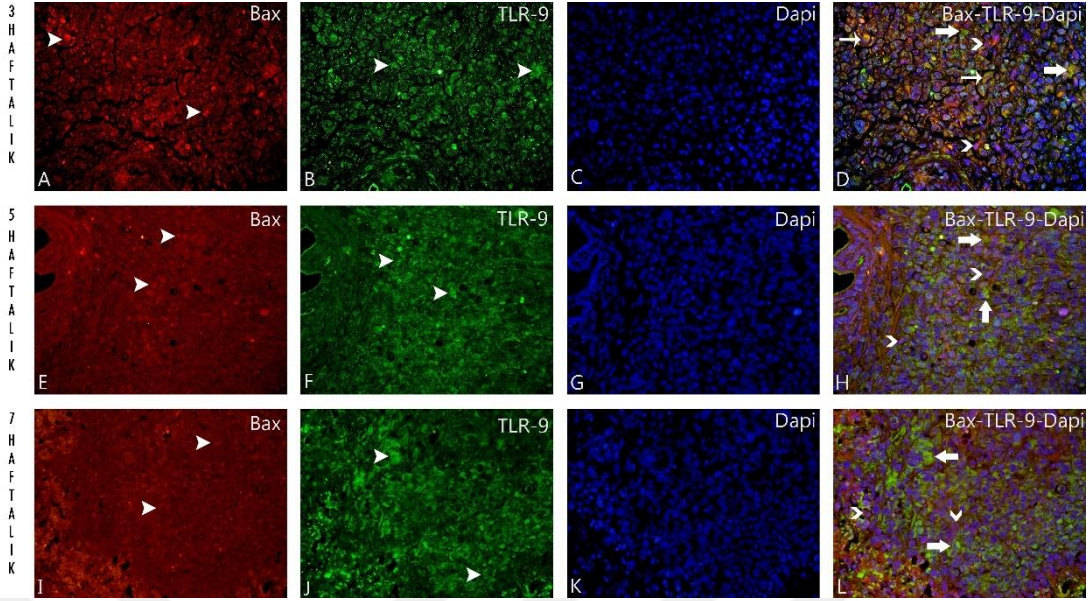


4.4.3. İmmunofloresan Boyama Sonuçları

Yapılan çalışmada Bax-TLR-9, Bax-TLR-3, Bcl-2-TLR-9 ve Bcl-2-TLR-3 primer antikoları Douple İmmunofloresan yöntemiyle boyandı.

4.4.3.1. Bax-TLR-9

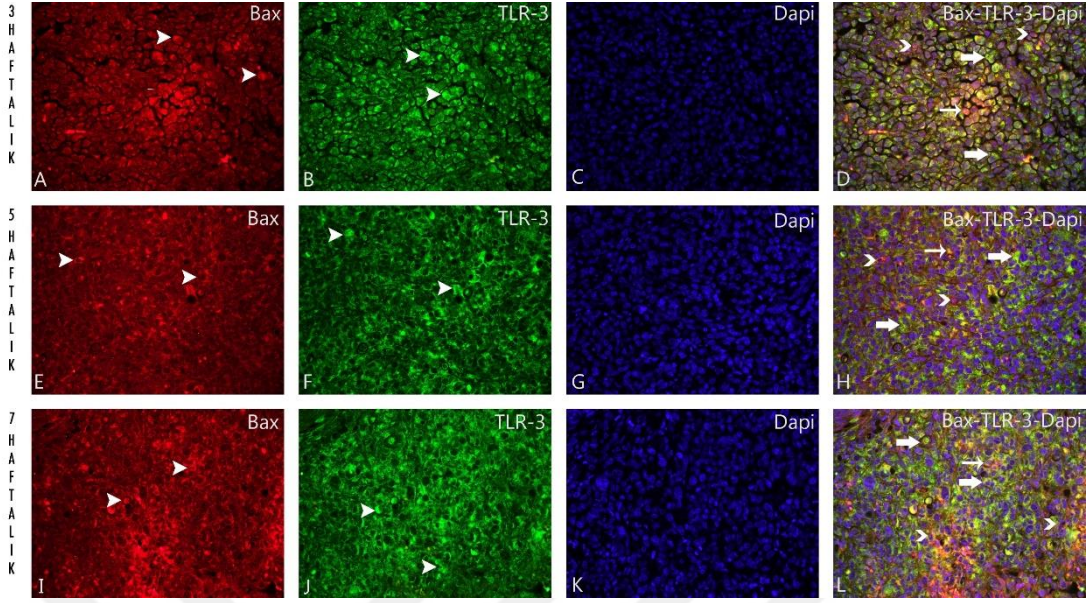
Tümöral dokularda yapılan ikili immunofloresan boyamalarda tümör hücrelerinin sitoplazmasında pozitif reaksiyonlara rastlanıldı. 3. haftada sakrifiye edilen gruptan alınan tümöral dokularda Bax ve TLR-9 pozitif reaksiyonun aynı şiddet ve yoğunlukta olduğu, resimlerin birleştirilmesi sonucunda bazı tümör hücrelerinin hem Bax hem de TLR-9 yönünden pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi. 5. ve 7. haftalarda sakrifiye edilen gruptaki deneklerde alınan tümöral dokularda TLR-9 ekspresyonunun Bax ekspresyonundan daha şiddetli olduğu gözlemlendi (Resim 27).



Resim 27: Bax-TLR-9 ikili immunofloresan boyaması, **A-B-C-D:** 3 haftalık tümör grubu, **E-F-G-H:** 5 haftalık tümör grubu, **I-J-K-L:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** pozitif reaksiyonlar, **ince ok:** hem Bax hem de TLR- 9 immunpozitif hücreler, **şerit:** Bax pozitif immunreaktivite, **kalın ok:** TLR-9 pozitif reaksiyonlar, IF.

4.4.3.2.Bax-TLR-3

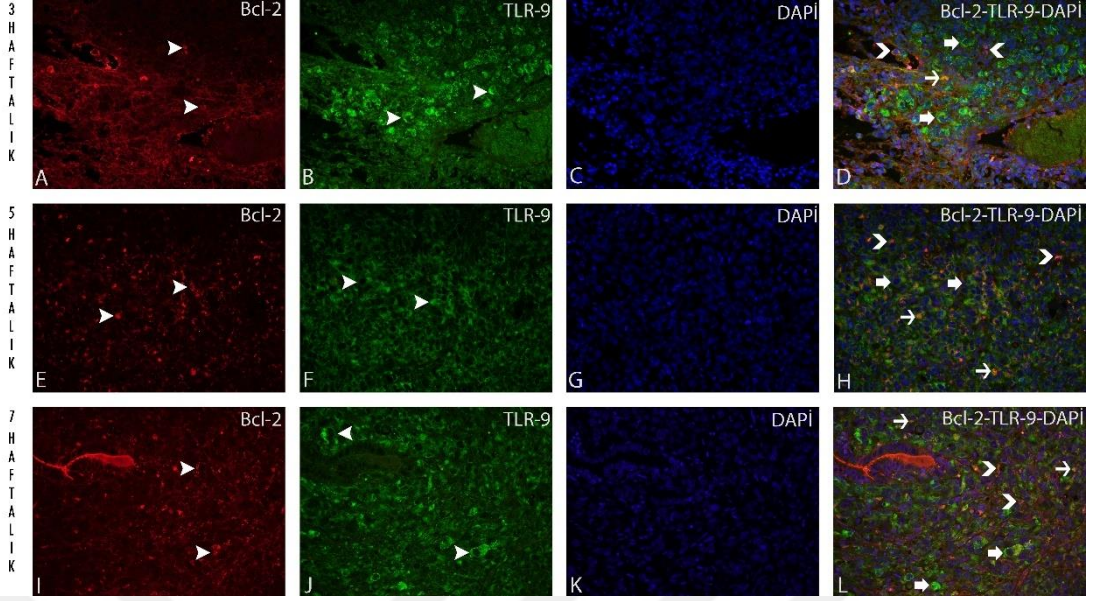
Gruplardaki deneklerden alınan tümöral dokularda yapılan Bax-TLR-3 ikili immunofloresan boyamasında tümör hücrelerinin sitoplazmasında pozitif immunreaktiviteye rastlanıldı. Gruplardaki pozitif reaksiyonlar karşılaştırılınca; 3. haftalık deneklerden alınan tümöral dokularda, Bax-TLR-3 immunpozitif reaksiyonların hemen hemen aynı yoğunlukta ve şiddette olduğu tespit edildi. Tümör ilerlemesi arttıkça TLR-3 immunpozitif reaksiyonunun da şiddetinin ve yoğununun arttığı gözlemlendi (Resim 28). Yapılan boyamaların immunohistokimyasal boyama sonuçlarına paralel olduğu tespit edildi.



Resim 28: Bax-TLR-3 ikili immunofloresan boyaması, **A-B-C-D:** 3 haftalık tümör grubu, **E-F-G-H:** 5 haftalık tümör grubu, **I-J-K-L:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** pozitif reaksiyonlar, **ince ok:** hem Bax hem de TLR-3 immunpozitif hücreler, **şerit:** Bax pozitif immunreaktivite, **kalin ok:** TLR-3 pozitif reaksiyonlar, IF.

4.4.3.3.Bcl-2-TLR-9

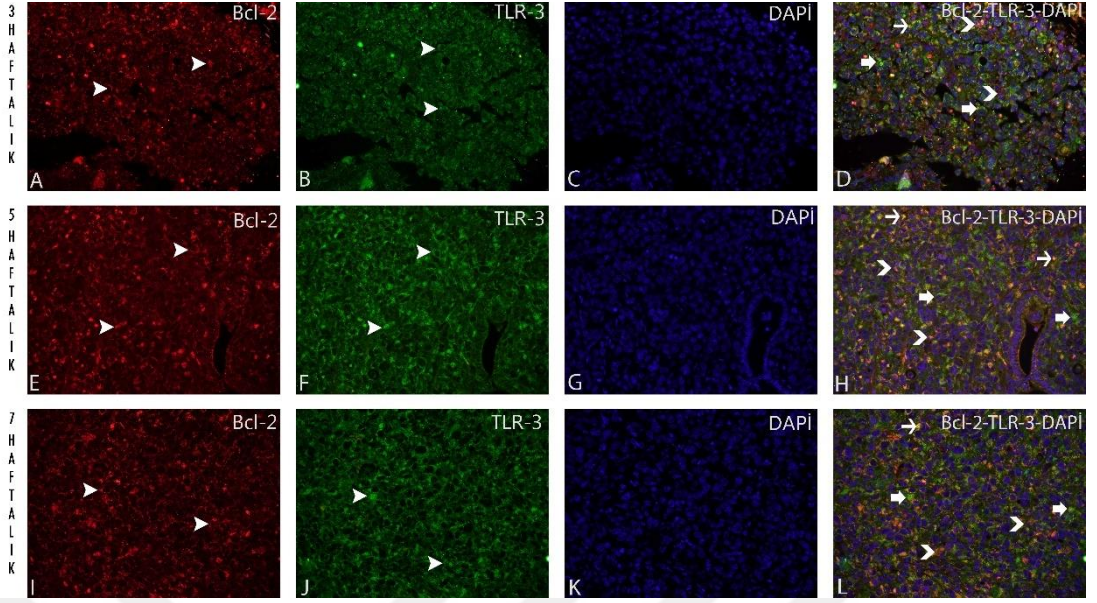
Deneklerden alınan tümöral dokularda yapılan Bcl-2-TLR-9 ikili immunofloresan boyamalarında tümör hücrelerinin sitoplazmasında pozitif reaksiyonlara rastlanıldı. 3 haftalık gruptan alınan dokularda yapılan boyamalarda TLR-9 ekspresyonunun Bcl-2 ekspresyonundan daha şiddetli olduğu tespit edilirken, 7 haftalık gruptan alınan tümöral dokularda yapılan boyamalarda ise her iki boyamanın da aynı şiddet ve yoğunlukta olduğu tespit edildi. Bazı tümör hücrelerinin hem Bcl-2 hem de TLR-9 yönünden pozitif reaksiyon gösterdiği saptandı (Resim 29).



Resim 29: Bcl-2-TLR-9 ikili immunofloresan boyaması, **A-B-C-D:** 3 haftalık tümör grubu, **E-F-G-H:** 5 haftalık tümör grubu, **I-J-K-L:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** pozitif reaksiyonlar, **ince ok:** hem Bcl-2 hem de TLR-9 immunpozitif hücreler, **şerit:** Bcl-2 pozitif immunreaktivite, **kalın ok:** TLR-9 pozitif reaksiyonlar, IF.

4.4.3.4.Bcl-2-TLR-3

Gruplardaki deneklerden alınan dokularda yapılan Bcl-2-TLR-3 ikili immunofloresan boyamalarında intrasitoplazmik pozitif reaksiyonlara rastlanıldı. Bcl-2 ve TLR-3 ekspresyonlarının birbirine paralel bir şekilde artış gösterdiği ve reaksiyonun şiddetinin 7 haftalık tümör grubundaki deneklerden alınan tümöral dokularda en şiddetli olduğu gözlemlendi. Bazı tümör hücrelerinin hem Bcl-2 hem de TLR-3 yönünden pozitif reaksiyon verdiği tespit edildi (Resim 30).



Resim 30: Bcl-2-TLR-3 ikili immunofloresan boyaması, **A-B-C-D:** 3 haftalık tümör grubu, **E-F-G-H:** 5 haftalık tümör grubu, **I-J-K-L:** 7 haftalık tümör grubu, **ok başları:** pozitif reaksiyonlar, **ince ok:** hem Bcl-2 hem de TLR-3 immunpozitif hücreler, **şerit:** Bcl-2 pozitif immunreaktivite, **kalın ok:** TLR-3 pozitif reaksiyonlar, IF.

5.TARTIŞMA

Fare ve insan prostat dokuları benzer embriyolojik gelişime, hücresel bileşene ve moleküler özelliklere sahip olmakla birlikte anatomileri ve histolojileri farklılık göstermektedir. Tümör hücre süspansiyonlarının fare prostatına ortotopik olarak enjekte edilmesinin zor olmasına karşın yapılan çalışmalarda, farelerde prostat kanseri oluşturmak için birçok deri altı ve ortotopik yöntemler denenmiştir (Wang ve ark. 1999, Saar ve ark. 2015). Deneysel oluşturulan tümörlerde, tümörün deri altı ve ortotopik mikroçevresinin farklı olmasından dolayı ortotopik yolla oluşturulan modeller deri altı modellere nazaran insan prostat kanserinin değerlendirilmesi açısından daha uygun olmaktadır. Ortotopik yöntemle oluşturulan deneysel modeller diğer deneysel modellere göre daha avantajlıdır. Çünkü ortotopik modelde stromal hücreler, vasküler yapı ve bağışıklık sistemiyle tümör arasındaki etkileşimler normal prostat kanserindeki gibi sürdürülür ve bu özellik dolayısıyla kemik metastazı gibi PCa'ya özgü ileri evre patolojik değişiklikleri gözlemlemek mümkün olur (Anisimov 2006). PC-3 ve Du-145 tümör hücre hatları deneysel modellerde daha çok tercih edilmekle birlikte bu hücre hatları hormondan bağımsız olarak gelişim göstermektedir oysa LNCaP tümör hücre hattı insan prostat tümörünün büyümesine daha çok benzeyen, AR ve PSA'yı ifade eden androjene bağımlı tek insan prostat kanseri hücre hattıdır (Fu ve ark. 1992, Lim ve ark. 1993, Liu ve ark. 2022). Bu hücre hattı ile yapılan modellemeler, insanlardaki prostat kanserinin gelişiminin değerlendirilmesi ve tedavi amaçlı terapötik yaklaşımları test etmek için en uygun olan prostat kanseri hücre hattıdır (Lim ve ark. 1993). Nitekim Sato ve arkadaşları (1997) yapmış oldukları bir çalışma da ksenograf- modellerde deneyin sadece tümör hücrelerine bağlı olmadığını, bunun yanında tümör hücrelerinin enjekte edildiği mikroçevrenin tümör gelişimi ve metastazında önemli olduğunu bu nedenle subkutan ya da ektopik enjeksiyonlar yerine ortotopik enjeksiyonların daha başarılı olduğunu ve aynı zamanda insanlarda oluşan kanser dokularının özelliklerini daha iyi yansıttığını bildirmişlerdir (Sato ve ark. 1998). Yine; Abate-Shen ve arkadaşları (2022) tarafından yayınlanan bir başka derlemede, prostat kanserinin patogenezi incelemek için ksenograf modellerde LNCaP tümör hücre hattının, androjene bağımlı ve PSA pozitif olması nedeniyle daha çok tercih edildiğini, diğer hücre hatlarına göre insan prostat kanserinde daha doğru verilere ulaşılacağına

bildirmişlerdir (Abate-Shen ve ark. 2022). Bu veriler doğrultusunda, yaptığımız bu çalışmada androjene bağımlı LNCaP tümör hücre hattını ortotopik yolla uygulayarak ksenograft deneysel tümör modelini oluşturduk.

PCa, birçok ülkede erkeklerde kanser kaynaklı ölümlerde ilk sırada yer alan, önemli bir neoplastik hastalıktır. PCa'nın erken evresi, manyetik rezonans görüntüleme teknolojisi (MRG) ve prostat spesifik antijen (PSA) taramasıyla teşhis edilebilir (Iguchi ve ark. 2014). Erken evre PCa, prostat dokusuyla sınırlı olup, cerrahi, radyoterapi veya hormon tedavisi ile tedavi edilebilir. Ancak androjen yoksunluk tedavisi (ADT) erken dönemde etkili olmakla birlikte PCa androjen bağımlıdan androjen bağımsıza doğru ilerlerse kastrasyona dirençli prostat kanseri gelişebilir ve CRPC olan hastalar da prognoz oldukça kötüdür. Çünkü ADT'ye direnç kazanan PCa, hormon tedavisine yanıt vermemeye başlar ve bu hastalar için etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Wang ve ark. 2022). PSA, PCa tespiti için değerli bir tümör belirteci olmasına rağmen, prostatın iyi huylu hiperplazisi ve prostatit durumlarında da serum PSA düzeyleri yükselebilmektedir (Iguchi ve ark. 2014). PSA düzeyleri 4-10 ng/mL arasında olan hastaların prostat kanseri olasılığı yaklaşık %25, PSA düzeyi 10 ng/mL'den fazla olduğunda ise %50'nin üzerindedir (Sekhoacha ve ark. 2022). Serum PSA değerine yönelik ilk çalışma; Catalona ve arkadaşları (1991) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada PCa teşhisi konulmamış 50 yaş ve üzeri 1653 hastanın serum PSA düzeyleri ölçülmüş ve ölçüm sonunda 1516'sının başlangıç serum PSA değeri <4,0 ng, 107'sinin 4,0 ila 9,9 ng/mL ve 30'unun ise $\geq 10,0$ ng/mL olduğu saptanmıştır. Serum PSA değeri 4,0 ila 9,9 ng/mL olan 107 erkekten 85'ine biyopsi uygulanmış ve 85 biyopsi örneğinin 19'una (%22) PCa teşhisi konulmuştur. Serum PSA değeri $\geq 10,0$ ng/mL değerleri olan 30 hastanın da 27'sinden biyopsi uygulanmış ve bu örneklerin 18'inde (%67) PCa varlığı saptanmıştır. Genel olarak, biyopsi yapılan 112 hastadan 37'sinde PCa olduğu ve PSA değeri ile biyopsi sonucu pozitif olan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmişlerdir (Catalona ve ark. 1991). Recker ve ark. (2001) düşük PSA seviyelerinde meydana gelen prostat kanserinin insidansını belirlemek için PSA seviyesi 1 ila 3 ng./ml'de aralığında olan 158 hastaya ait biyopsi örneğini histopatolojik olarak incelemiş ve 17'sinde (%10,8) prostat kanseri tespit edildiğini ve PSA seviyesinin PCa teşhisinde bir belirteç olarak kullanılabileceğini

bildirmişlerdir (Recker ve ark. 2001). Erdoğan ve ark. (2019) PSA seviyesi 2,5-30,0 ng/mL arasında olan 211 hastayı değerlendirerek, bu hastaların %35,1'ine (74 olgu) PCa tanısı konulduğunu ve PCa'lı hastaların PSA seviyelerinin anlamlı şekilde daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. PCa tanısı konan bu hastaların PSA seviyesinin daha yüksek olduğu ve PCa negatif bireylerle f/t PSA farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir (Erdoğan ve ark. 2019). PCa oluşturulan deneysel modellerde PSA'nın araştırıldığı ilk çalışmalar, 1990'lı yıllarda başlamıştır. Cleave ve ark. (1991) PSA üretmeyen atimik nüde farelerde, PSA pozitif insan prostat kanser hücre hattını (LNCaP) kullanarak serum PSA düzeylerini incelemişlerdir. Çalışmalarında, 14 mm³ tümör hacmine sahip bir farede 2,1 ng/mL, 2855 mm³ tümör hacmine sahip bir farede ise 672 ng/mL PSA seviyelerini tespit etmişlerdir. Serum PSA seviyelerinin her 4,2 mm³ tümör hacmi için yaklaşık 1 ng/mL arttığını bildirmişlerdir (Cleave ve ark. 1992). Priolo ve ark. (2010) oluşturduğu deneysel prostat kanseri modelinde, sağlıklı fareler ile tümör oluşan gruptaki farelerin serum örneklerini ELİSA yöntemiyle incelemişler ve inceleme sonucunda sağlıklı farelerin serum örneklerinde PSA'nın hiç tespit edilmediğini ya da çok düşük seviyelerde bulunduğunu gözlemlerlerken (ortalama 1,02 ng/mL \pm 1), tümör oluşturulan gruptaki deneklerden alınan serum örneklerinde ise PSA seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (ortalama 13 ng/mL \pm 10,7, P <0,001 (Priolo ve ark. 2010). Saar ve ark. (2015) insan prostat tümör hücre hattı kullanarak farelerde oluşturulan PCa modelinde, serum PSA seviyesini analiz etmişler ve serum PSA seviyelerinin tümör büyümesiyle paralel şekilde arttığını bildirmişlerdir (Saar ve ark. 2015). Benzer şekilde Bastian ve ark. (2024) tarafından da LNCaP tümör hücre hattı kullanarak oluşturulan deney modelinde tümör hacmi ile PSA düzeyi arasında pozitif korelasyon bulunduğunu tespit ederek serum PSA değerinin PCa'da önemli bir belirteç olduğu bildirmişlerdir (Bastian ve ark. 2024). Rembrink ve ark. (1997) Du-145 ve LNCaP hücre hatlarını kullanarak atimik nüde farelere ortotopik yolla enjekte ederek oluşturdukları deneysel tümör modelinde, tümör gelişimi ile serum PSA seviyelerini arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Yapılan ölçümler sonucunda kontrol grubunda serum PSA tespit edilmediğini, DU-145 (hormon bağımsız tümör hücre hattı) verilen gruptaki deneklerin serumunda da benzer şekilde PSA tespit edilemezken, LNCaP tümör hücre hattı enjekte edilen, 10 fareden

7'sinin serumunda PSA seviyelerinin 3,7-219,0 ng/ml arasında olduğunu, en yüksek serum PSA seviyesinin ise tümör hacminin en büyük olduğu denekte tespit edildiğini bildirmişlerdir (Rembrink ve ark. 1997). Reiter ve ark. (2013) androjen bağımlı LNCaP tümör hücre hattı vererek 6 haftalık 48 adet atimik nude farede oluşturdukları deneysel prostat kanseri modelinde; PSA ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle incelemişlerdir. Yapılan çalışmanın sonucunda kontrol, tümör ve tedavi grupları arasında PSA ekspresyonu yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını bildirmiş ve bunun nedeninin hayvan sayısının yetersiz ve deney süresinin kısa olmasından dolayı olduğunu bildirmişlerdir (Reiter ve ark. 2013).

Çalışmamızda serum PSA seviyelerinin kontrol grubuna ve tümör gelişimine paralel bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Ortotopik yöntemle LNCaP hücre hattını kullanarak oluşturduğumuz bu çalışmada; Cleave ark. (1992), Rembrink ve ark. (1997), Priolo ve ark. (2010), Reiter ve ark. (2013), Saar ve ark. (2015) ve Bastin ve ark. (2024) yapmış oldukları çalışma sonuçlarından farklı olarak serum PSA seviyelerindeki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda hayvan sayısının az olması ve deney süresinin hayvanların duyarlı olmasından dolayı 7 haftayla sınırlı tutulması nedeniyle ve ayrıca Gleave ve ark. (1992) sonuçlarına benzer şekilde PSA üretimini etkileyen tek bir faktör olmadığını aynı zamanda tümörün mikroçevresel faktörlerinin de serum düzeylerini etkileyebileceği kanatine varılmıştır.

Çalışma kapsamında alınan tümöral dokular histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde tümör hücrelerinin eozinofilik sitoplazmalı, yuvarlak-oval çekirdekli ve birden fazla çekirdekçiğe sahip solid hücre yığınları şeklinde ve tümöral alanda bol miktarda anormal mitotik figürlerin olduğu, tümör gelişimi devam ettikçe tümöral alanın ortasında kanama ve nekrozların şekillenmeye başladığı tespit edildi. Bunun yanında 7 haftalık gruba ait 6 hayvanın 3 tanesinin iliak lenf düğümünün de metastaz tespit edildi. Tümör hücrelerinin, lenf düğümünün hem korteksine hem de medullasına infiltre olduğu, diğer organlarda herhangi bir metastaza rastlanılmadığı tespit edildi. Waters ve ark. (1995) yaptığı bir çalışmada prostat kanseri hücre hattı verilen atimik nude farelerde oluşturulan deneysel prostat kanseri modelinde, tümör gelişimini ve metastaz kapasitesini incelemiş ve histolojik olarak tümör hücrelerinin köpüklü, eozinofilik sitoplazmalı, pleomorfik, yuvarlak

oval çekirdekler barındıran ve çekirdeklerin heterokromatik özellikte, bir veya daha fazla sayıda belirgin çekirdekçiğe sahip olduğunu ve tümöral alanda bol miktarda anormal mitotik figürlerin bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun yanında yakında bulunan lenf düğümlerine metastaz şekillendiğini ve primer tümörün histolojik özelliklerini yansıttığını tespit etmişlerdir (Waters ve ark. 1995). An ve ark. (1998) yapmış olduğu bir çalışmada; atimik nüde farelere subkutan yolla insan prostat kanseri hücrelerini enjekte ederek tümör gelişimini histopatolojik olarak incelemişler ve çalışma sonucunda tümör hücrelerinin, eozinofilik sitoplazmalı, belirgin pleomorfik çekirdekli, anaplastik özelliklere sahip olduğunu, tümör alanında yoğun anormal mitotik figürlerin bulunduğunu saptamışlardır. Bunun yanında ilgili lenf nodunda da metastaz şekillendiğini ve tümör hücrelerinin lenf düğümünün hem korteks hem de medullasına infiltre olduğunu bildirmişlerdir (An ve ark. 1998). Wang ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada (Water ve ark. (1995) ve An ve ark. (1998)) yapmış oldukları çalışmaların sonuçlarına benzer sonuçlar bulmuş ve tümör hücrelerinin tüm prostat dokusuna yayıldığını ve lenf düğümleri ile birlikte akciğerlere de metastaz yaptığını tespit etmişlerdir (Wang ve ark. 1999). De Pinieux ve ark. (2001) atimik nüde farelere insan prostat kanseri hücre hattı verilerek oluşturulan prostat kanserinde tümör hücrelerinin histopatolojik özelliklerini incelemiş ve tümör hücrelerinin iri birden fazla nükleouslu, şeffaf sitoplazmalı hücreler olduğunu, tümör alanında birden fazla mitotik figürün bulunduğunu gözlemlemişlerdir (De Pinieux ve ark. 2001). Yukarıda yapılan çalışmalara benzer şekilde Sharma ve Katz'ın (2008) yaptığı bir çalışmada LNCaP tümör hücre verilerek oluşturulan deneysel prostat kanseri modelinde, tümör hücrelerinin histopatolojik incelemesinde tümör alanında pleomorfik tümör hücrelerine ve çok sayıda apoptotik hücre ile anormal mitotik hücrelere rastlanıldığını ve tümöral kitlenin ortasında komedonekroz alanlarının gelişmeye başladığını gözlemlemişlerdir (Sharma ve Katz 2008). Yine Liu ve ark. (2022) atimik nüde farelere ortotopik yolla LNCaP tümör hücrelerini enjekte etmiş ve tümör gelişimi ile tümör hücrelerinin histolojik özelliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda tümör hücrelerinin morfolojik ve histolojik özelliklerinin insan prostat kanseri hücrelerinin morfolojik ve histolojik özelliklerini yansıttığını ve Gleason skorunun 5 olarak değerlendirildiğini bildirmişlerdir (Liu ve ark. 2022). Çalışma sonucunda elde

ettiğimiz sonuçların Waters ve ark. (1995), An ve ark. (1998), Wang ve ark. (1999), De Pinieux ve ark. (2001), Sharma ve Katz (2008) sonuçlarına benzer olduğu ve tümör agresifliği arttıkça çevre dokulara özellikle lenf düğümlerine metastaz şekillendiğini gözlemledik. Tümör hücrelerinde pleomorfizmin çok yüksek olduğu ve gelişimine devam ettikçe nekrozun ve kanamanın arttığı tespit edildi. Bunun dışında insan prostat kanserinin tüm özelliklerini yansıtmaktadır. Bu yönüyle insanlarda yapılacak her türlü işlemde ilk tercih edilebilecek modellerden biri olabileceği düşünülmektedir.

Tümör hücrelerinin proliferatif aktivitesi, kanser tanısında önemli bir prognostik belirteçtir. Hücrelerin proliferatif aktivitesini değerlendirme yöntemlerinden biri, hücre döngüsüne özgü antijenlerin immün boyama yöntemleriyle tespit edilmesidir. Ki67, proliferasyon yapan hücre nükleer antijeni (PCNA) ve minikromozom bakım (MCM) proteinleri, bir hücre popülasyonunun artış oranını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan proliferasyon belirteçleridir. Bu belirteçler arasında Ki 67 hücre döngüsünün tüm aktif fazlarında mevcuttur ancak dinlenme hücre fazlarında yoktur ve işlevi halen daha belirsizliğini korumaktadır. Buna karşılık, PCNA ve MCM proteinleri DNA replikasyonunda görevli belirteçlerdir (Juríková ve ark. 2016). PCNA, DNA'yı çevreleyen, replikasyon ve onarım mekanizması nedeniyle nükleik asit metabolizmasında önemli bir rol oynayan nükleer bir homotrimerik proteindir. Geç G1 fazında çekirdekte salgılanır ve lokalize olur, S fazında artar ve G2 ve M fazlarında azalır (Jayaraman ve ark. 2022). Bu nedenle PCNA, hücre çoğalması ve hayatta kalması için vazgeçilmezdir. (Wang ve ark. 2022). PCNA'nın anormal ekspresyonu, tümör oluşumu ve gelişimi ile ilişkilidir. Bu nedenle tümörlerin malignitesini ve çoğalma potansiyelini değerlendirmek için önemli biyobelirteçtir (Yang ve ark. 2019). Preziosi ve ark. (1995) kedi ve köpeklerin iyi huylu ve kötü huylu meme tümörleri arasında PCNA indeksini değerlendirmiş ve değerlendirme sonucunda mitotik aktivite ve PCNA ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğunu, tümör agresifliğine paralel olarak mitotik aktivitenin ve PCNA ekspresyonunun arttığını, PCNA'nın tümör prognozunu belirlemede objektif bir belirteç olduğunu rapor etmişlerdir (Preziosi ve ark. 1995). Soo ve ark. (2000) deneysel Submandibular Bez Tümöründe (SMG) p53, PCNA, EGFR ekspresyonunu 4., 8., 10., 14., ve 18.

haftalarda sakrifiye edilen tümör gruplarında immunohistokimyasal olarak incelemiş ve 18. haftada alınan tümöral dokularda PCNA ekspresyonunun daha şiddetli olduğunu ve PCNA'nın tümör agresifliğini belirlemede kriter olabileceğini bildirmişlerdir (Soo ve ark. 2000). Zhong ve ark. (2008) prostat kanseri ve BPH olgularında Ki-67 ve PCNA ekspresyonunu RT-PCR ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmışlardır. PCa'lı dokularda Ki 67 ve PCNA indeksi BPH'lı hastalara göre daha yüksek olduğunu ve Ki-67 ve PCNA kombinasyonunun, prostat kanserinin erken tanısının doğruluğunu belirlemede bir kriter olabileceğini bildirmişlerdir (Zhong ve ark. 2008). Chen ve ark. (2016) prostat kanseri hücre hatlarını (LAPC-4, LNCaP, C4-2 ve 22RV1) atimik nüde farelere deri altı enjekte ederek deneysel tümör modeli oluşturmuşlardır. Daha sonra Nanomicellar TGX221 ile tedavi grubu oluşturup, sadece tümör oluşturulan grup ile tedavi grupları arasında PCNA ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak incelemişlerdir. Araştırma sonucunda; tedavi gören grupta tümöral dokunun gerilediğini ve tümör boyutunda azalma meydana geldiğini, tümör grubuna kıyasla PCNA ekspresyonunun daha düşük seviyelerde olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak prostat kanserlerinde Nanomicellar TGX2212nin bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilceğini ve PCNA'nın tümör prognozunu belirlemede bir kriter olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2016). Wang ve ark. (2018) kemoterapi veya radyoterapi görmemiş 60 adet küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (NSCLC) hastadan alınmış tümöral dokularda, PCNA ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle araştırmış ve araştırma sonucunda PCNA proliferasyonunun iyi huylu tümörlere nazaran agresif tümörlerde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark. 2018). Deng ve ark. (2023) özofageal sküamoz karsinomlu (ESCC), 807 hastaya ait tümöral dokuda Ki 67 ve PCNA ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve inceleme sonucunda Ki 67 ve PCNA indeksinin ESCC evresine bağlı olarak artış gösterdiğini ancak tümör prognozunu belirlemede yeterli olmadıklarını bildirmişlerdir (Deng ve ark. 2022).

Bizde yapmış olduğumuz bu çalışmada; Preziosi ve ark. (1995), Zhong ve ark. (2008), Chen ve ark., (2016), Wang ve ark. (2018), Deng ve ark. (2023) çalışmalarına benzer şekilde farklı gelişim dönemlerine sahip prostat kanseri dokularında PCNA ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle inceledik ve

inceleme sonucunda tümörün gelişimine paralel olarak PCNA ekspresyonunda artış gözlemledik. Gruplardaki deneklerden alınan dokularda yapılan immunohistokimyasal boyamalarda en şiddetli ve en yoğun immunoreaktiviteye 7. haftada sakrifiye edilen gruptaki deneklerde olduğu, en düşük immunoreaktivitenin ise 3. haftada sakrifiye edilen grupta meydana geldiği gözlemlendi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda 3 haftalık tümör grubu ile 5 haftalık tümör grubu arasındaki ve 3 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grubu arasındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($p<0,05$) ve prostat kanseri gelişiminde PCNA'nın prostat kanseri prognozunu belirlemede iyi bir belirteç olarak kullanılabileceğini tespit ettik.

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), çok sayıda fizyolojik ve patolojik durumda bazal membran ve hücre dışı matris (ECM) bileşenlerini parçalayan 20'den fazla enzimden oluşur. Bazal membranın yeniden şekillenmesi ve onarımı esnasında meydana gelen fizyolojik durumlarda yer alırlar ve romatoid artrit, aort anevrizmaları, miyokard enfarktüsü, septik şok, karaciğer hastalığı, tümör invazyonu ve kanser metastazları gibi patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (Crawford ve ark. 1994). MMP'ler hücre yüzeyinden salgılanırlar veya lokalize olurlar; bu da substratlarının hücre dışı proteinler olduğunu ve bunlardan bazılarının tümör hücrelerinin bazal membran ve stromaya invazyonu, kan damarı penetrasyonu ve metastaz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Aalinkeel ve ark. 2011). MMP'ler arasında, MMP-9, invazyon ve metastazda rol aldığına inanılan aday proteindir. MMP-9 mRNA'sı veya proteini, kötü huylu tümörlerde, normal dokulara veya iyi huylu tümörlere göre genellikle daha yüksek düzeylerde bulunur. Çoğu araştırma çalışması, yüksek düzeyde MMP-9 ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde kötü bir prognoz sağladığını göstermiştir (Han ve ark. 2015). Morgia ve ark. (2005) 20 PCa dokusu, 20 sağlıklı prostat dokusu, 20 BPH'li doku ve 20 tanede kemik metastazı bulunan doku örneğinde MMP ekspresyonlarını ELISA yöntemiyle ölçmüşlerdir. Ölçümler sonucunda MMP-2, MMP-9 ve MMP-13 plazma konsantrasyonlarının metastazlı PCa hastalarında diğer gruplara göre daha yüksek olduğunu, MMP aktivitesinin PCa'da tanı, tedavinin izlenmesi ve malign progresyonun değerlendirilmesinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (Morgia ve ark. 2005). Köhrmann ve ark. (2009) meme kanserinde MMP'lerin ekspresyonunu

immunohistokimyasal, Western Blott ve PCR yöntemleriyle incelemiş ve incelemeleri sonucunda sağlıklı meme dokularına kıyasla kanserli dokularda MMP ekspresyonlarının daha şiddetli olduğunu, MMP'lerin meme kanseri patogeneğinde önemli rolleri olabileceğini tespit etmişlerdir (Köhrmann ve ark. 2009). Elahirad ve ark. Köhrmann ve ark. (2009) yaptıkları çalışmanın benzerini köpek meme tümöründe yapmışlardır. 32 adet köpek meme tümörü dokusunda MMP-9 ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntem kullanarak araştırmış ve tümör agresifliği arttıkça MMP-9 immunreaktivitesinin de arttığını gözlemlemişlerdir (Elahirad ve ark. 2024). Wojtkowska ve ark. (2024) kedilerde aşı yeri sarkomu olgularda MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve sağlıklı dokulara kıyasla tümöral dokularda MMP ekspresyonlarının daha yüksek olduğunu, tümör biyolojisini daha iyi değerlendirmek için MMP'lerin daha detaylı araştırılması gerektiğini saptamışlardır (Wojtkowska ve ark. 2024).

Bu çalışmaların aksine; Aalinkeel ve ark. (2004), PC-3, DU-145 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarıyla MMP-9 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi PCR ve Western Blott yöntemleriyle incelemiş ve en yüksek MMP-9 ekspresyonunun PC3 tümör hücrelerinde olduğunu, ikinci sırada DU-145'in geldiğini ve en düşük MMP-9 ekspresyonunun ise LNCaP tümör hücrelerinde görüldüğünü saptamış ve PC3 ve DU-145 tümör hücre hatlarının invaziv ve metastatik özelliğinin LNCaP tümör hücre hattından daha yüksek olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir (Aalinkeel ve ark. 2004). Hu ve ark. (2008) yapmış oldukları bir çalışmada CXCL16 ve CXCL12'nin PC3 ve LNCaP hücrelerinin in vitro invazyonuna olan etkilerini immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve CXCL16 ve CXCL12'nin ilgili reseptörleri uyararak PC3 ve LNCaP tümör hücrelerinin invazyonunu desteklediği gözlemlemişlerdir. Bunun yanında CXCL16 ve CXCL12 uyarımı yapılmadan LNCaP tümör hücre hattında MMP-9 ekspresyonunun yok denecek düzeyde düşük olduğunu gözlemlemişlerdir (Hu ve ark. 2008). Koskensalo ve ark. (2012) 619 kolorektal kanser hastasında, MMP-2, MMP-8 ve MMP-9 ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve 619 hastanın 208 tanesinde MMP-9 immunpozitifliğinin olmadığını ve ileri evre invazif kolorektal kanserlerinden ziyade lokal tümörlerde (Dukes B kolorektal tümörler) yüksek düzeyde eksprese edildiğini ve negatif MMP-9 ekspresyonunun Dukes B kolorektal tümörlerinde kötü prognozu

öngörebilmeye bir kriter olabileceğini bildirmişlerdir (Koskensalo ve ark. 2012).

Bizde çalışmamızda Morgia ve ark. (2005), Köhrmann ve ark. (2009), (Elahirad ve ark. (2024), Wojtkowska ve ark. (2024) çalışmalarından farklı olarak; Aalinkeel ve ark. (2004), Hu ve ark. (2008), Koskensalo ve ark. (2012) sonuçlarına benzer şekilde; gruplardaki deneklerden alınan tümöral dokularda yapılan MMP-9 immunohistokimyasal boyamalarında negatif sonuç elde ettik. Yapılan boyamalarda kullanılan kontrol dokularında (pnömonik fare akciğeri, sığır YHK dokuları ve rat deri dokuları) pozitif boyanma tespit edilmesine rağmen çalışma kapsamında kullanılan dokularda herhangi bir pozitif reaksiyona rastlanılmamış olup, LNCaP tümör hücre hattının MMP-9 ekspresyonu göstermediğini saptamaktadır.

VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ailesi ve reseptörleri, embriyogenez, iskelet büyümesi ve üreme fonksiyonları sırasında fizyolojik anjiyogenezin temel düzenleyicileridir. VEGF ayrıca tümörler, göz içi neovasküler bozukluklar ve diğer durumlarla ilişkili patolojik anjiyogenezde de önemli görevleri bulunmaktadır. (Ferrara ve ark. 2003). VEGF endotelial hücre çoğalmasını artırır, hücre göçünü destekler ve apoptozu engeller. Düzensiz VEGF ekspresyonu, tümör anjiyogenezini destekleyerek solid tümörlerin gelişimine ve anormal anjiyogenez ile karakterize edilen birkaç ek hastalığın etiolojisine de katkıda bulunur. Tümörlerde, özellikle VEGF-A ve reseptörü karsinogenez, invazyon ve uzak doku metastazının yanı sıra tümör anjiyogenezinde de rol oynar. Sonuç olarak, VEGF sinyallemesinin inhibisyonu çeşitli tümörlerin gelişimini durdurur (Neufeld ve ark. 1999, Takahashi ve ark. 2005). Kısacası tümörlerin büyümesi vaskülarizasyona bağlıdır ve VEGF'ler temel anjiyogenez uyarıcılarıdır (Liu ve ark. 2021). Ma ve ark. (2018) prostat kanserinde gleason skoru ve VEGF, Kİ 67 arasında bir korelasyon olup olmadığını immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve yüksek gleason skoruna sahip prostat kanseri vakalarında tümör hücrelerinin çekirdeklerinde VEGF ve Ki-67 intranükleer immunopozitif reaksiyonun daha yüksek olduğunu saptamışlardır (Ma ve ark. 2018). Ran ve ark. (2018) ultrason muayenesi sonucunda meme kanseri teşhisi konulan 89 hastadan alınan biyopsi materyalinde VEGF, COX-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını immunohistokimyasal yöntemle araştırmışlardır. Boyamalar sonucunda tümör boyutu daha büyük olan ve lenf nodu metastazı bulunan vakalarda VEGF ve MMP-9 ekspresyonunun daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (Ran ve

ark. 2018). Yine Rivera-Pérez ve ark. (2018) prostat kanseri ve BPH tanısı konan hastalardan alınan serum ve biyopsi örneklerinde VEGF ekspresyonlarını ELİSA ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmış ve Gleason skoru 8-10 olan hastalardan alınan örneklerde VEGF düzeyinin daha yüksek olduğu ve VEGF'nin prostat kanseri vakalarında prognozu belirlemede bir belirteç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Rivera-Pérez ve ark. 2018). Benzer şekilde Sohn ve ark. (2018) hem in vivo olarak oluşturulan meme kanserinde hem de in vitro meme kanseri hücre hattında tedavi ve kontrol gruplarında VEGF ve PCNA ekspresyonlarını immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve tedavi gruplarında tümör hücre gelişiminin yanında VEGF ve PCNA ekspresyonlarının da azaldığını, kontrol grubuna kıyasla aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir (Sohn ve ark. 2018). Zou ve ark. (2020) meme kanseri hücre hattında VEGF aktivitesine inhibe ederek tümör hücre gelişimini in vitro olarak araştırmışlardır. Araştırma sonucunda VEGF ekspresyonunun inhibe edildiği gruptaki tümör hücrelerinin gelişiminin durduğunu, VEGF salımının devam ettiği gruptaki tümör hücrelerinin ise gelişimine devam ettiğini bildirmişlerdir (Zou ve ark. 2020). Leis-Filho ve ark. (2021) 87 prostat kanserli köpekten alınan tümöral dokuda, VEGF reseptör düzeylerini PCR ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelemiş ve çalışma sonucunda sağlıklı prostat dokusunda ve BPH vakalarında VEGF ekspresyonunun negatif veya çok zayıf olduğunu ancak yüksek gleason skoruna sahip vakalarda VEGF ekspresyonunun şiddetli olduğu ve immunpozitif reaktiviteye prostat epitel hücrelerinde rastlanıldığını bildirmişlerdir (Leis-Filho ve ark. 2021).

Bizde daha önce yapılan Ma ve ark. (2018), Ran ve ark. (2018), Rivera-Pérez ve ark. (2018), Sohn ve ark. (2018), Zou ve ark. (2020), Leis-Filho ve ark. (2021) çalışmalara benzer şekilde prostat kanseri hücrelerinde VEGF ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle analiz ettik. Boyamalar sonucunda 7. haftada sakrifiye edilen gruptan alınan tümöral dokularda en şiddetli ve yoğun immunoreaktiviteye rastlanırken, 3. hafta da sakrifiye edilen deneklere ait tümöral dokularda en düşük immunoreaktiviteye rastlanıldı. İmmunpozitif boyanmaların tümör hücrelerinde intrasitoplazmik şekilde olduğu saptandı. İmmunpozitif boyanmaların özellikle nekroz çevresindeki tümör hücrelerinde daha şiddetli olduğu gözlemlenirken, mitozaya giden hücrelerde boyanma tespit edilmedi. Elde edilen

sonuçlar, VEGF ekspresyon artışının prostat kanseri gelişimini desteklediğini ve prognozu belirlemede bir belirteç olarak tercih edilebileceği düşüncesini doğrulamaktadır.

Çok hücreli organizmaların dokuları organize edebilmesi için hücrelerinin birbirleriyle bağlantı kurması gerekir. Bu bağlantılar, aralarında büyüme faktörlerinin de bulunduğu bir dizi düzenleyici protein aracılığıyla meydana gelir. Bir hücre içinde üretilen büyüme faktörleri, dokudaki komşu hücrelere uyarıları iletmek için hücrenin dışına salgılanır. Alıcı hücre yüzeylerinde, salgılanan büyüme faktörlerini tanıyan ve bağlayan belirli reseptörler bulunur. Hücre zarındaki belirli reseptör bir büyüme faktörüne bağlandığında, hücrenin içine bir sinyal iletilir. Bu iletişim sistemi içinde, fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) ve bunların reseptörleri de (FGFR'ler) bulunur (Wiedlocha ve ark. 2021). FGF'ler hücreSEL büyüme, farklılaşma, çoğalma, anjiyogenez, epitel-mezenkimal geçiş, bağışıklık, yara iyileşmesi ve neoplastik dönüşüm dahil olmak üzere çeşitli normal ve patolojik süreçlerde önemli görevleri bulunan protein ailesidir. Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar, FGF sinyal yollarının tümör oluşumu, gelişimi ve metastazı ile bağlantılı olabileceğini ortaya koymuştur (Turner & Grose, 2010, Ye ve ark. 2023). Sağlıklı hücre fizyolojisinde kritik rolleri olan bu proteinler, kanser hücrelerinde anormal biçimde artış gösterdiğinde, tümör mikroçevresinin şekillenmesi, hücre proliferasyonu ve metastaz gibi süreçleri tetikleyebilir (Babina & Turner, 2017). FGF sinyal yolunun tümör gelişimi üzerindeki etkisi iki farklı temele dayanmaktadır: birincisi doğrudan tümör hücresinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını desteklemesi, ikincisi ise anjiyogenezi teşvik ederek tümörün beslenmesini ve büyümesini sağlamasıdır. Bu özellikler hem primer tümör dokusunun büyümesinde hem de metastazın şekillenmesinde büyük rol oynar ve bu nedenle FGF sinyalleme ağı, çeşitli tümör tiplerinde yürütülen çalışmalarda anti- neoplastik bir hedef haline gelmiştir (Korc ve ark. 2009). Meme, akciğer, prostat, pankreas, mesane, serviks ve over gibi kanserlerin ilerlemesinde FGFR sinyallemesinin kritik bir rolü olduğuna dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Ye ve ark. 2023). Bu işlevleri dışında FGF'lerin apoptoz üzerinde düzenleyici etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle, belirli FGF'lerin hücre içi yollar üzerinden (örneğin PI3K/Akt ve MAPK/ERK yolları) anti-apoptotik sinyaller üretebildiği tespit edilmiştir. Bu durum, kanser hücrelerinin

apoptozdan kaçmalarına olanak tanımaktadır (Zhou ve ark. 2016). Giri ve ark. (1999) deneysel olarak oluşturulmuş prostat kanseri örneklerinde ve sağlam prostat dokusunda FGF-1 ve FGFR-1 ekspresyonlarını ELİSA, Western blotting ve immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve FGF2 ekspresyonunun tümör dokularında, sağlam prostat dokusuna kıyasla belirgin bir şekilde arttığını ve immunpozitif reaksiyonların, stromal fibroblastlar ve endotelial hücrelerde olduğunu gözlemlenmişlerdir. Ayrıca, FGFR-1 ve FGFR-2'nin aşırı ekspresyonun, kötü diferansiyasyonla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Giri ve ark. 1999). Linderholm ve ark. (2003) yapmış bir oldukları bir çalışmada meme kanseri hastalarından aldıkları dokuları immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve FGF'nin aşırı ekspresyonunun primer meme kanseri hastalarında artmış anjiyogenez ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Linderholm ve ark. 2003). Gowardhan ve ark. (2005) prostat kanseri biyopsi örnekleri ile BPH vakalarında, FGF ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle incelemiş ve araştırma sonucunda BPH örneklerine kıyasla prostat kanseri dokularında immunreaktivitenin daha yüksek olduğunu ve gleason skoru yükseldikçe FGF ekspresyonunun da artış gösterdiğini, bu nedenle FGF'nin prostat kanseri ilerlemesinde önemli bir rolü olabileceğini saptanmışlardır (Gowardhan ve ark. 2005). Marek ve ark. (2009) akciğer kanseri hücre hattında tümör ilerlemesi üzerine etkili olan büyüme faktörlerini ve sinyal yollarını ELİSA, RT-PCR yöntemiyle incelemiş ve araştırma sonucunda FGF1 ekspresyonunun agresifliği yüksek olan tümör gruplarında daha yüksek olduğunu, akciğer kanseri hastalarında prognozu belirlemede ve tedavi etmede anti-FGF1 ve anti-FGFR'nin etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Marek ve ark. 2009). Turner ve Grose (2010) FGF sinyalinin hücre çoğalması, göçü ve anjiyogenez gibi süreçlerin gelişiminde rol oynadığını ve dolayısıyla tümör ilerlemesine yardımcı olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle FGF2'nin tümör hücreleri tarafından aşırı eksprese edildiğini ve tümör anjiyogenezini artırarak metastaz gelişimini desteklediğini bildirmişlerdir (Turner ve Grose 2010). Benzer bir başka çalışmada Turner ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirildi. Çalışmada iki farklı meme kanseri hücre hattında, FGF ekspresyonunu ve FGF salınımının inhibe edilmesi sonucunda meydana gelen değişiklikleri RT-PCR ve immunohistokimyasal yöntemlerle incelemiş ve çalışma sonucunda tedavi edilmeyen gruplarda FGF

ekspresyonunun yüksek olduğunu ve tümör hücrelerinin gelişimine devam ettiğini, tedavi edilen gruplarda ise FGF ekspresyonunun da azalma meydana geldiği ve tümör hücre gelişiminin yavaşladığını bildirmişlerdir (Turner ve ark. 2010).

Bizde; Giri ve ark. (1999), Linderholm ve ark. (2003), Gowardhan ve ark. (2005), Marek ve ark. (2009), Turner ve Grose (2010), Turner ve ark. (2010) çalışmalarının sonuçlarına benzer şekilde yapmış olduğumuz bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan prostat kanseri doku örneklerinde FGF ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle inceledik ve inceleme sonucunda tümör ilerlemesine paralel olarak FGF ekspresyonunun arttığını tespit ettik. Çalışma sonucunda en şiddetli ve yoğun immunoreaktiviteye 7. haftada, en düşük immunoreaktiviteye 3. haftada sakrifiye edilen tümör grubundan alınan dokularda şekillendiği gözlemlendi. FGF immunreaktivitesinin istatistiksel analizinde, 3 ile 7 haftalık tümörü grupları arasında ve 5 ile 7 haftalık tümör grupları arasındaki fark anlamlı olduğu ($p < 0,05$), 3 ve 5 haftalık tümör gruplarındaki VEGF ekspresyonları arasındaki farkın anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). Elde edilen veriler neticesinde FGF'nin tümör ilerlemesinde rol oynayabileceği ve prognostik bir belirteç olarak kullanılabilirliği kanaatine vardık.

Bir sitokin olan dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), çeşitli hücreler mekanizmalarda önemli bir rol oynayan güçlü bir modülatördür. TGF- β ve onun alt akış mediyatörlerinin işlev kazanması veya kaybetmesi, tümör oluşumu da dahil olmak üzere hücre çoğalması ve farklılaşmasında, embriyonik gelişimde, anjiyogenezde ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik olayda önemli rol oynar (Pasche 2001, Baba ve ark. 2022). TGF- β ligandları epitel hücreleri, fibroblastlar ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tarafından salgılanır ve TME inaktif bir şekilde depolanırlar. Aktifleştirilmiş TGF- β ligandları otokrin ve parakrin bağımlı şekillerde aşağı akış sinyalleme bileşenlerini başlatır (Xu ve ark. 2018). TGF- β 'nin tümör hücreleri ve tümör mikro çevresi üzerindeki otokrin ve parakrin etkileri kanser gelişimi üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkiler gösterir. Buna göre, TGF- β sinyalleme yolu hem bir tümör baskılayıcı yol hem de tümör ilerlemesi ve invazyonunun bir promotörü olarak kabul edilmiştir (Derynck ve ark. 2001, Shi ve ark. 2022). Özellikle, malignitenin erken evrelerinde TGF- β tümör baskılayıcı olarak hareket eder ve hücreler çoğalma ile farklılaşmayı azaltarak malign hücreleri

temizlemede önemli bir rol oynar, böylece apoptoz sürecini tetikler. Daha sonra, malignitenin ileri evrelerinde TGF- β , hücrel dönüşümü, epitel-mezenkimal geçişi ve metastazı artırarak tümör oluşumunu teşvik eder (Pickup ve ark. 2013, Baba ve ark. 2022). Steiner (1994), TGF- β 'nin prostat kanserindeki ekspresyonunu PCR ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmış ve araştırma sonucunda fare prostat adenokarsinomunda normal prostat dokusuna kıyasla TGF- β 'nin daha yüksek düzeyde eksprese edildiğini ve immunohistokimyasal olarak da tümör hücrelerinde intrastoplazmik yerleşimli pozitif reaksiyonlar şekillendiğini tespit etmişlerdir (Steiner 1994). Pasche (2001) yayınlamış olduğu bir bildiri de prostat kanseri olan hastalarda, idrar TGF- β 1 ve plazma TGF- β 2 düzeylerinin yüksek olduğunu, TGF- β 1'in yüksek ekspresyonu ve TGF- β reseptör ekspresyonunun düşüklüğünü, prostat kanseri olan hastalarında kötü prognozla ilişkilendirmiş ve prostat kanserinin tanısında TGF- β 1'in yararlı bir biyobelirteç olacağını raporlamışlardır (Pasche 2001). Figueroa ve ark. (2010) TGF- β 'nin insan meme kanserindeki rolünü incelemişlerdir. Farklı yaş ve tümör derecesine sahip invaziv meme karsinomu olan 623 hastadan alınan tümöral dokularda TGF- β 'nin ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak incelemiş ve incelemeler sonucunda özellikle lenf düğümü metastazı olan hastalarda TGF- β ekspresyonunun diğer dokulara kıyasla daha yoğun olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanında TGF- β sinyalleşmesinin; yaş ve ER (östrojen reseptörü) ekspresyonu ve farklı patolojik durumlara göre değiştiğini bildirmişlerdir (Figueroa ve ark. 2010). Reis ve ark. (2011) prostat kanserinde prognozu belirlemede TGF- β 1'nin bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmış ve 89 hastadan toplanan taze dondurulmuş maling ve bening doku örneklerinin, RT-PCR yöntemini kullanılarak TGF- β 1 düzeylerini ölçmüşlerdir. Çalışma sonunda yüksek gleason skoruna sahip PCa dokularında TGF- β 1 ekspresyonunun daha yüksek olduğunu, prostat kanseri vakalarında TGF- β 1'nin yararlı bir prognostik belirteç olabileceğini ve bu doğrultuda daha fazla örneğin incelenmesi gerektiğini bildirmişlerdir (Reis ve ark. 2011). Li ve arkadaşları (2019) akciğer kanseri hastalarında TGF- β ekspresyonunun prognostik bir önemi olup olmadığını araştırmışlardır ve bunun için 579 hastaya ait tümöral doku örneklerini incelemiş ve inceleme sonucunda TGF- β ekspresyonunun akciğer kanseri hastalarında prognozu belirlemede bir kriter olarak kullanılabileceği kanısına varmışlardır (Li ve ark. 2019).

Bizde çalışmamızda, Steiner (1994), Pasche (2001), Figueroa ve ark. (2010), Reis ve ark. (2011) ve Li ve ark. (2019) çalışmalarına benzer şekilde farklı gelişim dönemlerine sahip insan prostat kanseri tümör hücre hattı verilerek oluşturulan deneysel fare prostat kanseri dokularında TGF- β ekspresyonunu, tümör gelişimine bağlı değişimini immunohistokimyasal yöntem inceledik ve yapılan çalışma sonucunda tümör ilerlemesine bağlı olarak 3., 5. ve 7. haftalarda sakrifiye edilen tümör gruplarında, tümör gelişimi arttıkça TGF- β ekspresyonunun arttığını, 3., 5. ve 7. haftalarda sakrifiye edilen gruplar arasında yapılan istatistiksel analiz sonuçlarının anlamlı olduğunu gözlemledik. Elde edilen sonuçlar neticesinde TGF- β 'nın prostat kanseri vakalarında prognozu belirlemede bir biyobelirteç olabileceği kanısına vardık.

Farklı kanser türlerinde, büyüme faktörü sinyal yollarını hedef alan terapötik ajanların geliştirilmesine yönelik yürütülen çalışmalar sonucunda önemli klinik başarılar elde edilmiştir (Zhou ve ark. 2016). Fakat; sinyal yollarının çapraz etkileşimleri, tedaviye direnç, tümör heterojenitesi mevcut tedavi yaklaşımlarının etkinliğini sınırlandırdığını bildirmişlerdir (Hanahan & Weinberg, 2011). Bu nedenle, ilerleyen dönemlerde büyüme faktörü hedefli tedavilerin daha etkili olabilmesi için tümör biyolojisinin daha derinlemesine anlaşılması ve kombinasyon tedavilerine yönelik çalışmaların artırılması büyük önem arz etmektedir. Netice itibariyle, büyüme faktörlerinin tümör gelişimindeki çok yönlü rolleri hem kanserin moleküler patogenezinin aydınlatılması hem de hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi açısından merkezi bir araştırma alanı olmaya devam etmekte olup, bu alanda daha fazla çalışmaların yapılması ve aydınlatılmamış olan bilgilerin doğruluğu araştırılmalıdır. Yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda VEGF, TGF- β , FGF ve PCNA ekspresyonunun prostat kanseri gelişimine paralel bir şekilde artış gösterdiğini gözlemledik. Elde edilen verilerin neticesinde bu moleküler mekanizmaların detaylı bir şekilde anlaşılması, kanser teşhis ve tedavisinde yeni hedeflerin ve stratejilerin geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Özellikle bu moleküllerin etkileşimlerini hedef alan kombine tedaviler, tek bir yolu hedefleyen tedavilere göre daha etkili ve kanserle mücadelede daha umut verici stratejiler sunabilir.

Apoptozis, embriyogenez ve doku homeostazisi gibi normal fizyolojik

süreçlerde önemli görevleri olan bir hücre ölüm programı olup aynı zamanda tümör baskılayıcı özelliğe de sahiptir (Morana ve ark. 2022). Tümör ise kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanır (Letai 2017). Wong'un bildirdiğine göre ilk olarak 1970'lerde, Kerr ve ark. apoptozu potansiyel olarak kötü huylu hücrelerin ortadan kaldırılması, hiperplazi ve tümör ilerlemesiyle ilişkilendirmiştir ve azalmış apoptoz veya apoptoz direncinin karsinogenezde hayati bir rol oynadığını bildirmişlerdir (Wong 2011, Kashyap ve ark. 2021). Bcl-2 ailesindeki proteinler apoptozisin düzenlenmesinde merkezi rol oynamaktadır (Yip ve Reed 2008). Bcl-2 protein ailesinin üyeleri, proapoptotik ve antiapoptotik aktivitelere sahip önemli düzenleyicilerdir (Warren ve ark. 2019). Bu düzenleyiciler hücrelerde hassas bir dengede tutulur ve hasarlı hücrelerin geri dönüşümsüz bir şekilde hücre ölümüne doğru yönlendirilmesine veya tersine, hücrelerin kalıcı olarak apoptozdan kaçmasına ve kendilerini kötü huylu bir klon haline getirmelerine neden olabilir (Qian ve ark. 2022). Farklı yapı ve işlevlerine dayanarak, Bcl-2 ailesi iki gruba ayrılır: antiapoptotik proteinler (örneğin, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1) ve proapoptotik (örneğin, Bax ve Bak) proteinler. Antiapoptotik proteinler apoptozu baskılamak için, proapoptotik proteinler apoptozu artırır (Liu ve ark. 2015). Bcl-2 ve en yakın akrabaları (Bcl-xL, Bcl-w, A1 ve Mcl-1) hücrenin hayatta kalmasını desteklerken, yapısal olarak bcl-2'ye benzeyen Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinler ise hücre ölümünü destekler (Cory ve Adams 2005). Kanser hücreleri genellikle Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerinin yukarı regülasyonu yoluyla apoptozdan kaçır ve daha agresif kanser hücreleri apoptozu baskılamak için proapoptotik proteinleri aşağı regüle eder veya inaktif hale getirir. Proapoptotik bir protein olan Bax'ın ekspresyonunun artması tümör hücrelerinin apoptozda gitmesine neden olurken, Bcl-2 ekspresyonundaki artış, tümör hücrelerinin apoptozdan kaçmasına ve canlılığını korumasına neden olur (Lopez ve ark. 2022). Bu hipotez çeşitli çalışmalarla da desteklenmiştir. Örneğin; Krajewska ve ark. (1996) prostat kanserinde Bax ve Bcl-2 ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemlerle araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda düşük gleason skoruna sahip prostat kanseri vakalarında Bax ekspresyonunun daha yüksek olduğunu, yüksek gleason skoruna sahip vakalarda ise Bcl-2 ekspresyonunun daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda Bcl-2'nin prostat kanserlerinin hormondan bağımsız

metastatik prostat kanserine dönüşmesinde rol oynayabileceğini raporlamışlardır (Krajewska ve ark. 1996). Miyamoto ve ark. (1999) pankreas kanserlerinde bax, bcl-2, bcl-x ve mcl-1 gibi antiapoptotik ve proapoptotik markerların ekspresyonunu immunohistokimyasal ve Westen blot yöntemleriyle incelemiştir. Çalışma sonucunda; agresifliği yüksek olan pankreas tümörlerinde, bcl-2 ve mcl-1 gibi antiapoptotik proteinlerin daha yüksek düzeylerde eksprese edildiğini, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasında meydana gelen düzensizliğin pankreas kanserinin oluşumunda rol oynadığı kanaatine varmışlardır (Miyamoto ve ark. 1999). Xie ve ark. (2000), dilin skuamoz hücreli karsinom olgularında Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarının prognostik değerine yönelik immunohistokimyasal yöntemle araştırma yürütmüşlerdir ve araştırma sonunda yüksek Bax ekspresyonuna sahip olan hastaların, düşük Bax ekspresyonuna sahip olan hastalara kıyasla hastalığa özgü sağ kalımlarının daha yüksek olduğunu ve Bcl-2 ile tümör agresifliği arasında pozitif korelasyonun bulunduğunu vurgulamışlardır. (Xie ve ark. 2000). Gobe ve ark. (2002), böbrek karsinom vakalarında yürüttükleri bir çalışmada apoptozis araştırmışlardır. Elde edilen veriler doğrultusunda sağlıklı böbrek dokularında Bax/Bcl-2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğunu tespit etmişlerdir (Gobe ve ark. 2000). Benzer şekilde Sohn ve ark. (2003), diffuz büyük B hücreli lenfoma olgularında Bax ve Bcl-2 ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle inceleyerek bu biyobelirteçlerin prognostik değerine yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırma sonucunda sağ kalım oranı ile yüksek Bcl-2 ekspresyonu arasında pozitif ilişki olduğunu ve Bax/Bcl-2 düzeylerinin prognozu belirlemede önemli rol oynadığını bildirmişlerdir (Sohn ve ark. 2003). Amirghofran ve ark. (2005), 50 adet prostat kanseri vakasında TÜNEL ve immunohistokimyasal yöntemlerle Ki67, Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarını incelemişler. Ki67 ekspresyonu ile Bcl-2 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğunu ayrıca kanser evresi ile Bax ekspresyonu arasında negatif bir ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir (Amirghofran ve ark. 2005). Katkooi ve ark. (2010), kolorektal kanser vakalarında yürüttükleri bir çalışmada Bax'ın prognostik bir belirteç olup olamayacağını araştırmışlardır. Bu amaçla 56 adet kolorektal kanserli hastadan alınan tümöral dokuları immunohistokimyasal yöntemle incelemiştir. Yüksek Bax immunoreaktivitesine sahip hastalarda sağ kalım oranının yüksek olduğunu ve Bax'ın prognostik bir

marker olabileceği yönünde görüş bildirmişlerdir (Katkoori ve ark. 2010). Plüton ve ark. (2011), meme kanseri vakalarında Bax protein ekspresyonunu akış sitometresi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmada 11 kontrol dokusu ile 62 meme adenokarsinomu incelemiş ve çalışma sonucunda Bax ekspresyonunun meme kanseri hücrelerinde anlamlı derecede düşük olduğunu, tümör hücrelerinin apoptozdan kaçarak gelişim gösterdiğini ve Bax ekspresyonunun tümör gelişimi üzerindeki rolünün tam olarak aydınlatılması için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini bildirmişlerdir (Plüton ve ark. 2011). Kurt ve ark. (2012), kemoterapi gören hastalardan alınan biyopsi örneklerinde Bax, Bcl-2, VEGF ve MMP-9 ekspresyonlarını ve bu ekspresyonların prognozla ilişkiyi araştırmış ve araştırma sonucunda VEGF ve MMP-9 ile Bax arasında negatif korelasyon varken, Bcl-2 ile aralarında pozitif bir ilişkinin olduğunu ve bunun kötü prognoza işaret ettiğini bildirmişlerdir (Kurt ve ark. 2012). Yapılan diğer bir çalışmada Yang ve ark. (2015) deneysel olarak oluşturulan prostat kanser modelinde kurkuminin apoptoz ve kanser gelişimi üzerine etkisi immunohistokimyasal yöntemlerle incelemiştir. Kurkumin verilen grupta Bax ekspresyonunun arttığını, Bcl-2 ekspresyonunun azaldığını ve bununla ilişkili olarak da tümör hacminde ve ağırlığında azalma meydana geldiğini bildirilmişlerdir (Yang ve ark. 2015). Tümör vakalarında prognozu belirlemenin yanında tümör gelişimi açısından da Bax ve Bcl-2 oldukça önemlidir. Ricca ve ark. (2000), Bcl-2 ekspresyonundaki artışın NF- kappa B aktivitesini arttırarak MMP-9 ekspresyonunu arttırdığını ve tümör hücre gelişimi desteklediğini tespit etmişlerdir (Ricca ve ark. 2000). Hou ve arkadaşları (2019), papiller tiroid karsinomu olgularında, miRNA-449a'nın PCNA, MMP-9, MMP-2, Bax ve Bcl-2 ekspresyonları üzerine etkisini incelemiş ve miRNA uygulaması yapılarak tedavi edilen grupta apoptozun tetiklenmesi ile Bax ekspresyonunun arttığını, tümöral dokunun gerilediğini ve eş zamanlı olarak Bcl-2, PCNA, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarının azaldığını bildirmişlerdir. Netice olarak, apoptozun desteklenmesi ile tümör hücrelerinin yok edilebileceğini kanaatine varmışlardır (Hou ve ark. 2019).

Bizde çalışmamızda Krajewska ve ark. (1996), Miyamoto ve ark. (1999), Xie ve ark. (2000), Sohn ve ark. (2003), Amirghofran ve ark. (2005), Katkoori ve ark. (2010), Plüton ve ark. (2011), Kurt ve ark. (2012), Yang ve ark. (2015), Hou ve ark. (2019) çalışmalarına benzer şekilde, deneysel olarak oluşturulmuş ve farklı gelişim

dönemlerine sahip olan prostat kanseri dokularında antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 ile proapoptotik bir protein olan Bax'ın ekspresyonunu immunohistokimyasal ve immunfloresans yöntemlerle inceledik. Yapılan incelemeler sonucunda 3. haftada sakrifiye edilen tümör grubundan alınan dokularda Bax ekspresyonu daha yüksek iken 7. hafta da sonlandırılan tümör grubu deneklerinden alınan tümöral dokularda Bax immunoreaktivitesinin azaldığı, buna karşın Bcl-2 ekspresyonunun 3. haftada sonlandırılan tümör grubu hayvanlarından alınan dokulara kıyasla 7. hafta da sakrifiye edilen tümör grubu hayvanlarından alınan dokulara göre daha düşük olduğu saptandı. Bcl-2 ekspresyonu tümör gelişimine paralel bir şekilde artmıştır. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizlerde, Bax immunoreaktivitesinin 3 haftalık ve 7 haftalık gruplara arasında anlamlı olduğu tespit edilirken ($p < 0,05$), 5 haftalık ile 7 haftalık grup arasında istatistiki açıdan bir fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). Bcl-2 immunoreaktivitesinin istatistiki karşılaştırmasında ise tüm gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Bunun yanında; Bax ve Bcl-2 arasında negatif bir korelasyon bulunması, tümörün gelişimine paralel olarak artan PCNA, TGF-beta, FGF ve VEGF ekspresyonları ile Bcl-2 arasında pozitif bir korelasyonun olması Bcl-2'nin tümör gelişimini desteklediğini gösterir niteliktedir. Tümör mikroçevresindeki çeşitli sinyal ağları, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunu ve aktivitelerini düzenler. Büyüme faktörleri ve sitokinler gibi hayatta kalma sinyalleri genellikle Bcl-2 ailesi anti-apoptotik üyelerinin ekspresyonunu artırırken, DNA hasarı veya onkogen aktivasyonu gibi stres sinyalleri pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu tetikleyebilir. Tümör hücreleri, bu sinyalizasyon yollarını manipüle ederek apoptozdan kaçma avantajı elde eder. Elde edilen bulgular sonucunda; Bax ve Bcl-2 ekspresyonları arasındaki ilişkinin tümör prognozu ve tedavi yanıtı için önemli bir belirteç olduğu, Bax ve Bcl-2 ekspresyonları arasında negatif korelasyon bulunduğu ve prostat kanseri vakalarında prognozu belirlemede elverişli bir belirteç olarak kullanılabilecekleri kanaatine varılmıştır.

TLR'ler, patojenlerin yapısal moleküllerini (patojenle ilişkili moleküler desenler veya PAMP'ler) ve hasarlı hücrelerden salınan endojen ligandları (hasarla ilişkili moleküler modeller veya DAMP'ler) tanıyan ve bunlara inflamatuvar yanıt oluşturarak bulaşıcı patojenlere ve kansere karşı ilk savunma hattının oluşmasını sağlayan transmembran proteinleridir (Duan ve ark. 2022). TLR'ler, makrofajlar,

nötrofiller, dendritik hücreler (DC'ler), doğal öldürücü (NK) hücreler ve mast hücreleri gibi doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleri ile adaptif bağışıklık sistemi (T ve B lenfositler), stromal hücreler ve farklı tümör hücresi tipleri dahil olmak üzere birçok hücrede eksprese edilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, TLR'lerin yalnızca enfeksiyonlara karşı değil, aynı zamanda neoplastik süreçlerde de önemli roller oynadığını ortaya koymuştur. TLR'ler tümör mikroçvresindeki bağışıklık yanıtlarının modülasyonu yoluyla hem tümör baskılayıcı hem de tümör destekleyici etkiler gösterebilirler (Kawai & Akira, 2010). Bazı TLR'lerin (özellikle TLR-3, TLR-7 ve TLR-9) aktivasyonu ile antijen sunumu ve tip I interferon üretimiyle güçlü anti-tümöral etki oluşturduğu raporlanmıştır (Hemmi et al., 2000). Bunun yanında, TLR-2, TLR-4 ve TLR-9'un kronik veya düzensiz aktivasyonu sonucunda bağışıklık sisteminin tümörü tanımasının engellenebileceği ve bu nedenle tümör ilerlemesini teşvik edebilecekleri bildirilmiştir (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov 2009). Ren ve ark. (2009), TLR-9'un insan akciğer kanseri hücrelerinin in vitro ve in vivo tümör ilerlemesi üzerindeki etkisini Flow sitometre ve ELİSA yöntemleriyle incelemiş ve TLR-9'un aktive edilmesinin tümör ilerlemesini ve metastatik potansiyeli arttırdığını bildirmişlerdir. Bunun yanında IL-10 ekspresyonunun artmasına neden olarak inflamasyonu baskıladığı ve bu yönüyle de tümör gelişimine destek olduğunu bildirmişlerdir (Ren ve ark. 2009). Moreira ve ark. (2015) prostat kanserinde TLR-9 ekspresyonunu hem in vivo hem de in vitro çalışmalarla, Western Blott ve PCR yöntemleriyle ölçmüş ve çalışmalarını sonucunda prostat kanserinde NF- κ B/RELA ve STAT3 sinyallenmesini başlatarak tümör hücrelerinin gelişimini ve invazivliğini desteklediğini bildirmişlerdir ve TLR-9'un prostat kanseri hücrelerinde apoptozu teşvik etmek yerine, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve yayılmasını desteklediğini göstermişlerdir (Moreira ve ark. 2015). Bir başka çalışmada Luo ve ark. (2015) tarafından yapılmıştır. Çalışma sonucunda TLR-9 antagonistleriyle tedavi edilen prostat kanseri hücrelerinde TLR-9 ekspresyonunun durduğunu ve bu durumun prostat kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerinde azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma verileri doğrultusunda, TLR-9'un tümör hücrelerinin yayılmasını teşvik ettiğini ve apoptozu engellediğini bildirilmişlerdir (Luo ve ark. 2015). Wu ve ark. (2017) küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (CSC) TLR-9'un invazyon, ilaçlara direnç ve in vivo tümör

oluşumu ile sağ kalım üzerindeki etkisini incelemişler ve akciğer CSC'lerinde TLR-9 ekspresyonunun baskılanması proliferasyon, invazyon, tümör oluşumu ve kemoterapötik ilaçlara karşı direnç kapasitesinin inhibe edilmesiyle sonuçlandığını ve dahası, hücre döngüsü G2/M aşamalarında durdurduğunu ve TLR-9 ekspresyonu azaldıktan sonra daha fazla apoptoz meydana geldiğini tespit etmişlerdir (Wu ve ark. 2017). Kalantari ve ark. (2019) yüksek gleason skoruna sahip PCa, yüksek dereceli prostat intraepitelyal neoplazi (HPIN) ve BPH'li hastalardan alınan doku örneklerinde TLR-9 ve MMP ekspresyonları immunohistokimyasal yöntemlerle incelemiş ve tümör agresifliği ile TLR-9 ve MMP ekspresyonu arasında pozitif bir ilişki olduğunu, bu belirteçler PCa'nın kişiye özel tedavisi için değerli bir hedef olarak kullanılabilceğini vurgulamışlardır (Kalantari ve ark. 2019). Jing ve ark. (2022) tarafından Osteosarkom (OS) üzerine yapılan bir çalışmada, TLR-9'un normal osteoblastik hücrelere nazaran osteosarkom hücrelerinde daha yüksek düzeyde eksprese edildiği ve TLR-9 aşırı ekspresyonunun, MMP-2 ve MMP-9'un yukarı regülasyonu ile OS hücrelerinin göç ve invazyon aktivitelerini arttırdığını tespit etmişlerdir (Jing ve ark. 2022). Ma ve ark. (2024), oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) olgularında, TLR-9 ekspresyonunu immunohistokimyasal ve qRT-PCR yöntemleri ile değerlendirmişlerdir. TLR-9 prekanseröz vakalara kıyasla tümörün agresif seyrettiği gruplarda TLR-9 ekspresyonunun daha şiddetli olduğunu gözlemlenmişler ve OSCC vakalarında TLR-9 antagonistlerinin terapötik ajan olarak kullanılabilceği sonucuna varmışlardır (Ma ve ark. 2024).

Yukarıda bahsi geçen çalışmaların aksine TLR-9'un tümör gelişimini engellediği yönünde görüşler de farklı kanser türlerinde bildirilmiştir (Olbert ve ark. 2015, Cascini ve ark. 2023). Olbert ve ark. (2015), insan mesane kanser vakalarında TLR-4 ve TLR-9'un hücre canlılığı ve invazyon yeteneği, sitokin ekspresyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. TLR-4'ün IL-6 ve IL-8 aktivasyonuna neden olarak, TLR-9'un ise IL-8, TNF α ve anjiyojenik faktörler, VEGF-A ve plasental büyüme faktörünü indükleyerek tümör gerilemesine neden oldukları sonucuna vararak TLR-9'un immunoterapötik ajan olarak kullanılabilceklerini raporlamışlardır (Olbert ve ark. 2015). Cascini ve ark. (2023) da osteosarkom vakalarında TLR-9 agonistlerinin tedavi edici etkisini araştırmış ve TLR-9'un CD8 T hücre aktivasyonunu arttırarak tümör gelişimini durdurduğunu ve osteosarkomu

tedavi ettiklerini bildirmişlerdir (Cascini ve ark. 2023).

Bizde çalışmamızda; Olbert ve ark. (2015) ve Cascini ve ark. (2023) çalışma sonuçlarından farklı olarak; Ren ve ark. (2009), Moreira ve ark. (2015), Luo ve ark. (2015), Wu ve ark. (2017), Jing ve ark. (2022) ve Ma ve ark. (2024) sonuçlarına benzer şekilde farelerde yürüttüğümüz in vivo prostat kanseri modelinde tümör gelişimine paralel olarak TLR-9 ekspresyonunun arttığını tespit ettik. En düşük immunoreaktiviteye 3 haftalık tümör grubunda rastlanılırken en şiddetli reaksiyonun 7 haftalık tümör grubunda olduğunu gözlemledik. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda tüm gruplar arasında anlamlı fark olduğu, bunun yanında Bax ile TLR-9 arasında negatif korelasyon gözlemlenirken, Bcl-2 ile TLR-9 arasında pozitif korelasyon olduğu saptandı. Bax ile TLR-9'un birlikte değerlendirildiği ikili immunofloresan boyamalar sonucunda Bax ekspresyonunun 3 haftalık tümör grubunda en yüksek olduğu tespit edilirken, Bax'ın aksine TLR-9 ekspresyonunun 7 haftalık tümör grubunda en yüksek olduğu gözlemlendi. Bcl-2 ile TLR-9 antikorları kullanılarak yapılan ikili immunofloresan boyamalarında her iki markerin de artışı tümör ilerlemesine paralel şekilde olduğu gözlemlendi. Ayrıca tümör ilerlemesine bağlı olarak artan TLR-9 ekspresyonu ile birlikte VEGF, FGF, TGF- β ve PCNA ekspresyonlarında da artış olduğu saptandı.

Deney sonuçları ve yapılan literatür taramaları karşılaştırılınca TLR-9 ve Bax arasındaki etkileşimler henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. TLR-9 aktivasyonunun, NF- κ B sinyalizasyonu yoluyla anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırabileceği ve dolayısıyla Bax aracılı apoptozu inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu iki molekül arasındaki ilişkinin ve altta yatan sinyal yollarının daha iyi anlaşılması, prostat kanseri için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik öneme sahip olabilir. Özellikle TLR-9 sinyalizasyonunu hedef alan immünoterapilerde Bax aracılı apoptoz yollarının aktivasyonu, tedavi etkinliğini artırmak için umut verici bir yaklaşım olabilir.

TLR'nin pro- veya antitümöral rolüyle ilgili çelişkili raporlar yayınlanmış olmasına rağmen, çoğu literatür verisi TLR-3 aracılı antitümör rolü konusunda hemfikirdir. TLR-3'ün antikanser mekanizmasının doğal bağışıklığı aktive etmesi ve/veya apoptozu aktivasyonunu teşvik etmesi yönünde görüşler bulunmaktadır.

Yapılan literatür taramalarında da antitümöral etkisini ortaya koyan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; Galli ve ark. (2010) in vitro olarak farklı üç prostat kanseri hücre hattında (LNCaP, Du145 ve PC3) TLR-3, kemokin ve sitokin ekspresyonlarını ve tümör ilerlemesi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Araştırma sonucunda LNCaP ve Du145 tümör hücre hattında TLR-3'ün çeşitli kemokin ve sitokin üretimiyle birlikte tümör hücrelerinin gerilediği fakat PC3 hücre hattında ise TLR-3 ekspresyonunun düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Galli ve ark. 2010). Salaun ve ark. (2011), TLR-3 pozitif olan ve TLR-3 negatif olan meme kanseri hastalarında yürütülen bir çalışmada DsRNA tedavisi uygulamış ve TLR-3 pozitif olan hastalarda tümör gelişiminde gerileme tespit edilirken, TLR-3 negatif olan hastalarda ise tümör gelişiminin devam ettiği raporlanmış ve çalışmanın neticesinde meme kanseri hastalarında TLR-3'ün apoptozu indükleyerek ve IL-6 ekspresyonunu artırarak antitümöral etki gösterdiği sonucuna varmışlardır (Salaun ve ark. 2011). Gambari ve ark. (2014) sağlıklı prostat dokusunda, prostat kanserli hastalardan alınan biyopsi örneklerinde ve androjen bağımlı LNCaP prostat kanseri hücre hattında TLR-3 ekspresyonunu ve etki mekanizmasını immunohistokimyasal, immunofloresan, ve Western Blott yöntemleriyle araştırmış ve normal dokulara kıyasla PCa'lı dokularda TLR-3 ekspresyonunun daha yüksek olduğunu ve çalışma sonucunda TLR-3'ün prostat kanseri hücrelerinde IRF-3 aracılığıyla apoptozu indüklediği ve tümör büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Gambara ve ark. 2014). Yuan ve ark. (2014) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise TLR-3 ekspresyonu ile hücre proliferasyonu, apoptozis, anjiyogenez ve prognoz arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla hepatosellüler karsinomu (HCC) olan hastalardan aldıkları dokuları incelemişlerdir. Araştırmanın sonucunda TLR-3'ün HCC'lı doku örneklerinde ekspresyonunun komşu dokulara kıyasla daha düşük olduğunu, Bcl-2 ile arasında negatif korelasyon bulunduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak TLR-3'ün HCC dokularındaki ekspresyonunun apoptozis üzerinde sinerjik bir etki gösterdiğini ve HCC hücrelerinin çoğalmasını, MMP-2 ekspresyonunu, EPC'lerin oluşumu ile anjiyogenezini inhibe ettiğini ve TLR-3 ekspresyonunun HCC olgularında prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceğini raporlamışlardır (Yuan ve ark. 2014). HCC olgularını ele alan diğer bir çalışma ise Ladoire ve ark. (2024) tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmada deneysel olarak oluşturulmuş bilateral HCC subkutan tümör fare

modellerinde; TLR-3 agonisti poli(I:C) ile tedavi edilen grup ve tedavi edilmeyen grup arasındaki tümör gelişimi karşılaştırılmış ve karşılaştırma sonucunda tedavi edilen gruplarda TLR-3'ün tümör hücrelerinde ferroptoz sinyallerini aktive ederek tümör gelişimini engellediğini saptamışlardır. Çalışma sonucunda özellikle radyoterapi gören hastalarda TLR-3 sinyal aktivasyonunun artırılması, ileri HCC hastalarının klinik yararlarını iyileştirmek için önemli bir terapötik ajan olacağını bildirmişlerdir (Ladoire ve ark. 2024). Fan ve ark. (2023) Fudan Üniversitesi Shanghai Kanser Merkezi'nde yürüttükleri bir çalışmada, üçlü negatif meme kanseri (TNBC) dokularında TLR-3 mRNA ekspresyonunun, normal dokulara göre daha düşük olduğu bulunmuştur. TNBC TLR-3'ün yüksek ekspresyonunun daha iyi prognoza işaret ettiği ve bu reseptörün prognostik moleküler bir belirteç olabileceğini tespit etmişlerdir (Fan ve ark. 2023).

Bu çalışmaların tersine TLR-3 ekspresyonu arttıkça tümör gelişiminin de buna paralel bir şekilde bir artış gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Nitekim González-Reyes ve ark. (2011), 133 PCa vakasında TLR-3, TLR-4 ve TLR-9 ekspresyonu ve biyokimyasal nüks arasındaki ilişkiyi immunohistokimyasal ve PCR yöntemleriyle incelemiş ve araştırmaları sonucunda TLR-3 ve TLR-9'un PCa da kötü prognozla ilişkili olduğunu, TLR-4 ekspresyonunun PCa'da etkili bir reseptör olmadığını gözlemlemişlerdir. Bunun yanında bu iki reseptörün gleason skoru, PSA değeri ve inflamasyon gibi parametrelere göre değişkenlik gösterebildiğini bu nedenle daha fazla in vivo ve in vitro deneyle etkinliğinin test edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (González-Reyes ve ark. 2011). Matijevic ve ark. (2017) yapmış olduğu bir çalışmada da faringeal kanser hücre hattında TLR-3 aktivasyonunun artmasıyla apoptozun baskılandığı ve kanser ilerlemesinde rol oynayan farklı genlerin (VEGF, MMP-9, uPAR) ve glikolitik yolda rol oynayan enzimlerin yukarı regülasyonunu da indükleyerek tümör gelişimi ile invazyonunun pozitif yönde etkilendiğini bildirmişlerdir (Matijevic ve ark. 2017). Ni ve ark. (2022) in vivo ve in vitro prostat kanseri olgularında TLR-3'ün hücre gelişimi, hareketliliği, göç ve inflamasyon üzerindeki etkisini araştırmış ve araştırma sonucunda TLR-3'ün tümör hücrelerindeki aşırı ekspresyonunun hücre hareketliliğini, göçünü ve istilasını artırdığını ortaya koymuşlardır. Bunun yanında TLR-3'ün aşırı salgılandığı hücrelerde, IL-6, IL-8 ve interferon- β gibi sitokinlerin de salgılanması artmış ve bu

da tümör hücrelerinin invaziv özelliklerini güçlendirmiştir ve ayrıca, TLR-3'ün EGFR ve Src gibi sinyal yollarını aktive ederek hücre istila kapasitesini artırdığını belirlemiştir (Ni ve ark. 2022). Yapılan literatür taramaları sonucunda TLR-3'ün hem protümöral hem de antitümöral etkisi olduğunu göstermektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; Salaun ve ark. (2011), Gambaro ve ark. (2014), Yuan ve ark. (2014), Fan ve ark. (2023) ve Ladoire ve ark. (2024) sonuçlarından farklı olarak Matijevic ve ark. (2017) ve Ni ve ark. (2022) sonuçlarına benzer şekilde deneysel olarak oluşturulan prostat kanserinde TLR-3 ekspresyonunu immunohistokimyasal ve immunofloresan yöntemlerle analiz ettik. Çalışma sonucunda TLR-3 ekspresyonunun tümör agresifliği en yüksek olan 7. hafta da deneyi sonlandırılan tümör grubu hayvanlarında, 3. ve 5. haftalarda deneyi sonlandırılan gruplara kıyasla daha yüksek olduğunu gözlemledik. Yapılan istatistiksel analizde 3 haftalık tümör grubu ile 5 haftalık tümör grubu ve aynı şekilde 3 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grubu arasında anlamlı fark tespit edilirken ($p<0,05$), 5 haftalık tümör grubu ile 7 haftalık tümör grubu arasındaki farkın istatistiki açıdan anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$), Bunun yanında Bax ve Bcl-2 antikoru ile yapılan immunohistokimyasal ve ikili immunofloresan boyama sonuçlarında TLR-3 ekspresyonu ile Bax ekspresyonu arasında negatif bir ilişki varken, Bcl-2 ekspresyonları arasında pozitif korelasyon olduğu gözlemlendi. Yine immunohistokimyasal boyamalar karşılaştırılınca, TLR-3 ile VEGF, FGF, TGF ve PCNA arasında da pozitif bir ilişki olduğu tespit edildi. Yapılan boyamalar sonucunda TLR-3'ün androjen bağımlı prostat kanserinde tümör ilerlemesini desteklediği saptanmıştır.

6.SONUÇ

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; androjen bağımlı LNCaP prostat kanseri hücre hattını atimik nüde farelere ortotopik yolla enjekte ederek deneysel PCa modelini oluşturduk. Deneklerden alınan tümöral dokularda PCNA, MMP-9, TGF- β , FGF ve VEGF Bax, Bcl-2, TLR-3 ve TLR-9 ekspresyonlarını immunohistokimyasal yöntemle inceledik. Bunun yanında antiapoptotik marker olan Bcl-2 ile TLR-3, TLR-9 ve proapoptotik bir marker olan Bax ile TLR-3 ve TLR-9 ekspresyonlarını immunofloresan yöntemle inceledik. Çalışma sonucunda; PCNA, TGF- β , FGF ve VEGF'nin en düşük immunoreaktivitesine 3. haftada sakrifiye edilen gruptaki deneklerden alınan tümör dokularında olduğunu, en şiddetli ve en yoğun immunoreaktivitenin ise 7. haftada sakrifiye edilen gruptaki deneklerden alınan tümör dokularında oluştuğunu ve immunpozitif reaksiyonların özellikle tümöral dokudaki nekroz çevresindeki tümör hücrelerinde meydana geldiğini tespit ettik. Bcl-2 immunreaktivitesinin de PCNA, TGF- β , FGF ve VEGF ekspresyonlarına benzer şekilde tümör ilerlemesine paralel artış gösterdiğini ve aralarında pozitif bir korelasyon olduğunu gözlemledik. Bunların aksine Bax immunoreaktivitesinin 3. haftada sakrifiye edilen gruptaki deneklerden alınan tümör dokularında en yüksek olduğu ve PCNA, TGF- β , FGF ve VEGF ekspresyonları ile aralarında negatif korelasyon gösterdiği tespit edildi. Nitekim Bax ve Bcl-2'nin pearson korelasyon analiz testi sonucunda aralarında negatif bir korelasyon olduğu ve aralarında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. TLR-3 ve TLR-9 immunohistokimyasal boyamalarında da en şiddetli ve en yoğun immunreaktiviteye 7. haftada sakrifiye edilen gruptaki deneklerden alınan tümöral dokularda rastlanırken en düşük immunreaktiviteye 3. haftada sonlandırılan gruptaki deneklerde rastlandı. TLR-3 ve TLR-9 ekspresyonunun tümör ilerlemesine paralel bir artış gösterdiği saptandı. Bunun yanında Bax'ın TLR-3 ve TLR-9'un birbiriyle negatif bir ilişki içinde olduğu, Bcl-2 ile TLR-3 ve TLR-9 arasında ise pozitif bir korelasyon olduğu hem immunohistokimyasal hem de immunofloresan yöntemlerle ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler neticesinde prostat kanserinde TLR-3 ve TLR-9 aktivasyonunun, tümör hücrelerinde apoptozu inhibe ederek hücre sağkalımını arttıracaklarını ve bu mekanizmanın tümör ilerlemesini destekleyen kritik bir yolak oluşturabilecekleri kanaatine varılmıştır. Bunun dışında anti-TLR-3 ve anti-TLR-9 uygulamalarının

prostat kanserinde yeni terapötik ajanlar olarak kullanılabilceğini ve prognozu belirlemede biyobelirteç olarak tercih edilebileceğini gözlemledik. Bu veriler dışında daha önce prostat kanseri olgularında; apoptoz ve TLR-3 ve TLR-9'un hem immunohistokimyasal hem de immunofloresan olarak değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanılmamış olup, yapılan bu çalışmanın apoptoz ve TLR'ler arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik diğer çalışmalara ışık tutacağı ve literatüre önemli katkılar sunacağı kanaatine vardık.



7.KAYNAKÇA

- Aalinkeel R, Nair BB, Reynolds JL, Sykes DE, Mahajan SD, Chadha KC, Schwartz SA:** Overexpression of MMP-9 Contributes to Invasiveness of Prostate Cancer Cell Line LNCaP. *Immunological Investigations*, 40(5):447–464, 2011.
- Aalinkeel R, Nair MPN, Sufrin G, Mahajan SD, Chadha KC, Chawda RP, Schwartz SA:** Gene Expression of Angiogenic Factors Correlates with Metastatic Potential of Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 64:5311–5321, 2004.
- Aaron L, Franco OE, Hayward SW:** Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *The Urologic clinics of North America*, 43(3):279–288, 2016.
- Abate-Shen C, Nunes de Almeida F:** Establishment of the LNCaP Cell Line - The Dawn of an Era for Prostate Cancer Research. *Cancer Res*, 82(9):1689-1691, 2022.
- Abd Wahab NA, Lajis NH, Abas F, Othman I, Naidu R:** Mechanism of Anti-Cancer Activity of Curcumin on Androgen-Dependent and Androgen-Independent Prostate Cancer. *Nutrients*, 12(3):679, 2020.
- Abu El Maaty MA, Terzic J, Keime C, Rovito D, Lutzing R, Yanushko D, Parisotto M, Grelet E, Namer IJ, Lindner V, Laverny G, Metzger D:** Hypoxia-mediated stabilization of HIF1A in prostatic intraepithelial neoplasia promotes cell plasticity and malignant progression. *Sci Adv.*, 8(29): eabo2295, 2022.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T:** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2: 675–680, 2001.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O:** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4):783–801, 2006.
- Aluri J, Cooper MA, Schuettpelez LG:** Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. *Cells*, 10(6):1374, 2021.

- Al-Zubaidy HFS, Majeed SR, Al-Koofee DAF:** Evaluation of Bax and Bcl-2 Genes Polymorphisms in Iraqi Women with Breast Cancer. *Arch Razi Inst*, 77(2):799-808, 2022.
- Amin A:** Prostate Ductal Adenocarcinoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*, 26(7):514–521, 2018.
- Amirghofran F, Turvey SE, Williams MA, Mor G, Von Dadelszen P:** Toll-Like Receptor Signaling and Pre-Eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(1):7–16, 2009.
- Amirghofran Z, Monabati A, Gholijani N:** Apoptosis in prostate cancer: bax correlation with stage. *Int J Urol*, 12(4):340-345, 2005.
- An Z, Wang X, Geller J, Moossa AR, Hoffman RM:** Surgical orthotopic implantation allows high lung and lymph node metastatic expression of human prostate carcinoma cell line PC-3 in nude mice. *Prostate*, 34(3):169-174, 1998.
- Anisimov VN:** *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1089:236-244, 2006.
- Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ:** From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(4):273–284, 2017.
- Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Verri E, Scarpelli M, Massari F, Cheng L, Santoni M, Montironi R:** Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*, 9(12):2653, 2020.
- Baba AB, Rah B, Bhat GR, Mushtaq I, Parveen S, Hassan R, Hameed Zargar M and Afroze D:** Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Front. Pharmacol.* 13:791272, 2022.
- Babina IS, Turner NC:** Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(5): 318–332, 2017.
- Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ:** Biology of prostate-specific antigen. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical*

Oncology, 21(2):383–391, 2023.

Baraban E, Epstein J: Prostate Cancer: Update on Grading and Reporting. *Surgical pathology clinics*, 15(4):579–589, 2022.

Bastian JLD, Zeuschner P, Stöckle M, Junker K, Linxweiler J: Tumor promoting effect of spheroids in an orthotopic prostate cancer mouse model. *Sci Rep*, 17;14(1):8835, 2024.

Baydar E, Epstem JI: Gleason Grading System, Modifications and Additions to the Original Scheme. *Turkish Journal of Pathology*. 25(3):59-70, 2009;

Bhatelia K, Singh K, Singh R: TLRs: linking inflammation and breast cancer. *Cellular signalling*, 26(11):2350–2357, 2014.

Bhavsar A, Verma S: Anatomic imaging of the prostate. *Biomed Res Int*, 2014; 728539, 2014.

Bianchi F, Alexiadis S, Camisaschi C, Truini M, Centonze G, Milione M, Balsari A, Tagliabue E, Sfondrini L: TLR3 Expression Induces Apoptosis in Human Non-Small- Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*, 2020 20;21(4):1440, 2020.

Brawer MK: Prostatic intraepithelial neoplasia: an overview. *Rev Urol*, 7 Suppl 3(Suppl 3):11-19, 2005.

Bylund A, Stattin P, Widmark A, Bergh A: Predictive value of bcl-2 immunoreactivity in prostate cancer patients treated with radiotherapy. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 49(2), 143–148, 1998.

Cascini C, Ratti C, Botti L: Rewiring innate and adaptive immunity with TLR9 agonist to treat osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 42:154, 2023.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJJ, Andriole GL: Measurement of Prostate-Specific Antigen in Serum as a Screening Test for Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 324(17):1156–1161, 1991.

Cen X, Liu S, Cheng K: The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and

Tumor Immunity. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 2018.

Chandrasekar SA, Palaniyandi T, Parthasarathy U, Surendran H, Viswanathan S, Wahab MRA, Baskar G, Natarajan S, Ranjan K: Implications of Toll-like receptors (TLRs) and their signaling mechanisms in human cancers. *Pathol Res Pract*, 248:154673, 2023.

Chaudhari S, D'Souza BM, Morales JY, Young-Stubbs CM, Shimoura CG, Ma R, Mathis KW: Renal TLR-7/TNF- α pathway as a potential female-specific mechanism in the pathogenesis of autoimmune-induced hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 323(6): H1331–H1342, 2022.

Chen M, Hsu I, Wolfe A, Radovick S, Huang K, Yu S, Chang C, Messing EM, Yeh S: Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor- α null male mice. *Endocrinology*, 150(1):251-260, 2009.

Chen R, Zhao Y, Huang Y, Yang Q, Zeng X, Jiang W, Liu J, Thrasher JB, Forrest ML, Li B: Nanomicellar TGX221 blocks xenograft tumor growth of prostate cancer in nude mice. *Prostate*, 75(6):593-602, 2015.

Chen X, Zhao F, Zhang H, Zhu Y, Wu K, Tan G: Significance of TLR4/MyD88 expression in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(6):7034-7043, 2015.

Choi JK: Bax Protein in Cancer Treatment. *J Korean Med Assoc*, 50(11):1041839.

Chuang JH, Chuang HC, Huang CC: Differential toll-like receptor 3 (TLR3) expression and apoptotic response to TLR3 agonist in human neuroblastoma cells. *J Biomed Sci*, 18:65, 2011.

Cimadamore A, Scarpelli M, Raspollini MR, Doria A, Galosi AB, Massari F, Di Nunno V, Cheng L, Lopez-Beltran A, Montironi R: Prostate cancer pathology: What has changed in the last 5 years. *Urologia*, 87(1):3-10, 2020.

Cleave ME, Hsieh JT, Wu HC, von Eschenbach AC, Chung LW: Serum prostate specific antigen levels in mice bearing human prostate LNCaP tumors are determined by tumor volume and endocrine and growth factors. *Cancer Res*, 52(6):1598-1605, 1992.

- Coakley FV, Hricak H:** Radiologic anatomy of the prostate gland: a clinical approach. *Radiol Clin North Am*, 38(1):15-30, 2000. doi: 10.1016/s0033-8389(05)70147-0.
- Cobanoglu B, Ceyran AB, Simsek M, Şenol S:** Immunohistochemical analysis of Bax and AIF in colorectal tumors. *Int J Clin Exp Med*, 8(9):16071-16076, 2015.
- Colleselli K, Stierschneider A, Wiesner C:** An Update on Toll-like Receptor 2, Its Function and Dimerization in Pro- and Anti-Inflammatory Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15):12464, 2023.
- Cory S, Adams JM:** Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. *Cancer Cell*, 8(1):5–6, 2005.
- Crawford HC, Matrisian LM:** Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis*, 14(1-6):234- 245, 1994.
- Crowley L, Cambuli F, Aparicio L, Shibata M, Robinson B Xuan, S, Li W, Hibshoosh H, Loda M, Rabadan R, Shen MM:** A single-cell atlas of the mouse and human prostate reveals heterogeneity and conservation of epithelial progenitors. *eLife*, 9: e59465, 2020.
- Dae-Hee Lee, Mirosław Szczepanski, Yong J. Lee:** Role of Bax in quercetin-induced apoptosis in human prostate cancer cells, *Biochemical Pharmacology*, 75(12): 2345-2355, 2008.
- Dai C, Heemers H, Sharifi N:** Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(9):a030452, 2017.
- Dajon M, Iribarren K, Cremer I:** Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology*, 222(1):89–100, 2017.
- D'Arcy MS:** Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6):582–592, 2019.
- De Marzo AM, Haffner MC, Lotan TL, Yegnasubramanian S, Nelson WG:** Premalignancy in Prostate Cancer: Rethinking What we Know. *Cancer*

prevention research (Philadelphia, Pa.), 9(8): 648–656, 2016

- de Oliveira JG, Silva AE:** Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population. *World J Gastroenterol*, 18(11):1235- 1242, 2012.
- De Pinieux G, Legrier ME, Poirson-Bichat F, Courty Y, Bras-Gonçalves, Dutrillaux, AM, Poupon MF:** Clinical and Experimental Progression of a New Model of Human Prostate Cancer and Therapeutic Approach. *The American Journal of Pathology*, 159(2):753–764, 2001.
- Derynck R, Akhurst R, Balmain A:** TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, 29:117–129, 2001.
- Desai K, McManus JM, Sharifi N:** Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *Endocrine reviews*, 42(3):354–373, 2021.
- Devlin CM, Simms MS, Maitland NJ:** Benign prostatic hyperplasia-what do we know?. *BJU international*, 127(4):389–399, 2021.
- Di Lorenzo A, Bolli E, Tarone L, Cavallo F, Conti L:** Toll-Like Receptor 2 at the Crossroad between Cancer Cells, the Immune System, and the Microbiota. *Int J Mol Sci*, 21(24):9418, 2021.
- Dinç N:** Prostate Cancer Screening, Diagnosis, Staging and Prognostic Factors. *Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics*, 10(4):358-364, 2017.
- Divatia MK, Ro JY:** Intraductal carcinoma of the prostate gland: Recent advances. *Yonsei Med J*, 57: 1054-1062, 2016.
- Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P, Goldmann T:** Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res*, 6(1):1, 2005.
- Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF:** Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front. Immunol*, 13:812774, 2022.
- Elahirad E, Tavassoly A, Golshahi H:** Immunohistochemical Study of MMP-9 Expression in Canine Malignant Mammary Tumors. *JSM Clin Case Rep*, 12(1): 1233, 2024.

- Elmore S.:** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35(4):495-516, 2007.
- El-Omar E, NG M, Hold G:** Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene* 27:244–252 (2008).
- El-Zayat SR, Sibaii H Manna FA:** Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent*, 43:187,2019.
- Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, Vickers AJ, Parwani AV, Reuter VE, Fine SW, Eastham JA, Wiklund P, Han M, Reddy CA, Ciezki JP, Nyberg T, Klein EA:** A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*, 69(3):428-435, 2016.
- Epstein JI:** An Update of the Gleason Grading System. *Journal of Urology*, 183(2):433- 440, 2010.
- Epstein JI:** Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified system. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 31(1):47–63, 2018.
- Erdogan A, Polat S, Keskin E, Turan A:** Is prostate volume better than PSA density and free/total PSA ratio in predicting prostate cancer in patients with PSA 2.5–10 ng/mL and 10.1–30 ng/mL?. *The Aging Male*, 23(1): 59–65, 2019.
- Estornes Y, Micheau O, Renno T, Lebecque S:** Dual Role of TLR3 in Inflammation and Cancer Cell Apoptosis. *Oncogene and Cancer – From Bench to Clinic*, 2013.
- Fan L, Sui XY, Jin X, Zhang WJ, Zhou P, Shao ZM:** High expression of TLR3 in triple-negative breast cancer predicts better prognosis-data from the Fudan University Shanghai Cancer Center cohort and tissue microarrays. *BMC Cancer*. 23(1):298, 2023.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J:** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37(11): 719–727, 2005.

- Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira J, Teixeira-Guedes C, Soares-Maia R, da Costa RG, Colaço B, Pires MJ, Colaço J, Ferreira R, Ginja M:** Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim (NY)*, 42(6):217-224, 2013.
- Fehri E, Ennaifer E, Bel Haj Rhouma R, Ardhaoui M, Boubaker S:** TLR9 and Glioma: Friends or Foes?. *Cells*, 12(1): 152, 2022.
- Feng Y, Chen X, Zheng Y, Liu Q, Chen H, Cai Y, Cao L, Lai X, Pan L, Li Y, Wang SY:** Prognostic value and susceptibility of BAX rs4645878 polymorphism in cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 97(29):e11591, 2018
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J:** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9:669–676, 2003.
- Figueroa JD, Flanders KC, Garcia-Closas M, Anderson WF, Yang XR, Matsuno RK, Duggan MA, Pfeiffer RM, Ooshima A, Cornelison R, Gierach GL, Brinton LA, Lissowska J, Peplonska B, Wakefield LM, Sherman ME:** Expression of TGF-beta signaling factors in invasive breast cancers: relationships with age at diagnosis and tumor characteristics. *Breast Cancer Res Treat*, 121(3):727-735, 2010.
- Francis JC, Swain A:** Prostate Organogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 8(7):a030353, 2018.
- Fu X, Herrera H, Hoffman RM:** Orthotopic growth and metastasis of human prostate carcinoma in nude mice after transplantation of histologically intact tissue. *Int J Cancer*, 52(6):987–990, 1992.
- Galli R, Starace D, Busà R, Angelini DF, Paone A, De Cesaris P, Filippini A, Sette C, Battistini L, Ziparo E, Riccioli A:** TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. *J Immunol*, 184(12):6658-6669, 2010.
- Gao X, Niu T, Xia Q, Hu B, Zhao Z, Feng X, Yang J, Tang B, Xu K:** Au-Se bonded nanoprobe for prostate specific antigen detection in serum. *Analytica chimica acta*, 12(10): 339852, 2022.

- Giacomini A, Grillo E, Rezzola S, Ribatti D, Rusnati M, Ronca R, Presta M:** The FGF/FGFR system in the physiopathology of the prostate gland. *Physiological reviews*, 101(2):569–610, 2021.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Stathopoulos GP, Fountzilas G, Kalofonos HP, Tsamandas A, Vrettou E, Scopa C, Polychronidis A, Simopoulos K, Koukourakis MI:** Bax protein expression in colorectal cancer: association with p53, bcl-2 and patterns of relapse. *Anticancer research*, 21(1A), 253–259, 2001.
- Gleave ME, Hsieh JT, Wu HC, von Eschenbach AC, Chung LW:** Serum prostate specific antigen levels in mice bearing human prostate LNCaP tumors are determined by tumor volume and endocrine and growth factors. *Cancer Res*, 52(6):1598-605, 1992.
- Gobé G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R:** Apoptosis and Expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in Renal Cell Carcinomas. *Cancer Investigation*, 20(3): 324–332, 2002.
- Goeman L, Joniau S, Ponette D, Van der AA F, Roskams T, Oyen R, Van Poppel H:** Is low-grade prostatic intraepithelial neoplasia a risk factor for cancer?. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 6(4):305–310, 2003.
- González-Reyes S, Fernández JM, González LO, Aguirre A, Suárez A, González JM, Escaff S, Vizoso FJ:** Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer immunology, immunotherapy*, 60(2): 217–226, 2011.
- Gorecki AM, Anyaegbu CC, Anderton RS:** TLR2 and TLR4 in Parkinson's disease pathogenesis: the environment takes a toll on the gut. *Transl Neurodegener*, 10:47, 2021.
- Gowardhan B, Douglas DA, Mathers ME, McKie AB, McCracken SR, Robson CN, Leung HY:** Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *Br J Cancer*, 92(2):320-327, 2005.
- Grabowska MM, DeGraff DJ, Yu X, Jin RJ, Chen Z, Borowsky AD, Matusik**

RJ: Mouse models of prostate cancer: picking the best model for the question. *Cancer Metastasis Rev*, 33(2-3):377-397, 2014.

Greulich BM, Plotnik JP, Jerde TJ, Hollenhorst PC: Toll-like receptor 4 signaling activates ERG function in prostate cancer and provides a therapeutic target. *NAR Cancer*, 3(1):046, 2021.

Gross A: Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 37(3):113–119, 2005.

Grosser JA, Fehrman RL, Keefe D, Redmon M, Nickells RW: The effects of a mitochondrial targeted peptide (elamipretide/SS31) on BAX recruitment and activation during apoptosis. *BMC Res Notes*, 14(1):198, 2021.

Gu J, Liu Y, Xie B, Ye P, Huang J, Lu Z: Roles of toll-like receptors: From inflammation to lung cancer progression. *Biomed Rep*, 8(2):126-132, 2018.

Han M, Gann PH, Catalona WJ: Prostate-specific antigen and screening for prostate cancer. *The Medical clinics of North America*, 88(2), 245–ix, 2004.

Han YH, Gao B, Huang JH, Wang Z, Guo Z, Jie Q, Yang L, Luo ZJ: Expression of CD147, PCNA, VEGF, MMPs and their clinical significance in the giant cell tumor of bones. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(7):8446-8452, 2015.

Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646- 674, 2011.

Hänggi K, Ruffell B: Cell death, therapeutics, and the immune response in cancer. *Trends Cancer*, 9(5):381-396, 2023.

He H, Luo H, Xu H, Qian B, Zou X, Zhang G, Zeng F, Zou J: Preclinical models and evaluation criteria of prostatitis. *Frontiers in immunology*, 14:1183895, 2023.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira SA: Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813):740-745, 2000.

Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA: Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(4):293–307, 2010.

- Henry GH, Malewska A, Joseph DB, Malladi VS, Lee J, Torrealba J, Mauck RJ, Gahan JC, Raj GV, Roehrborn CG, Hon GC, MacConmara MP, Reese JC, Hutchinson RC, Vezina CM, Strand DW:** A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Rep*, 25(12):3530-3542.e5, 2018.
- Hermoso MA, Matsuguchi T, Smoak K, Cidlowski JA:** Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Molecular and cellular biology*, 24(11):4743–4756, 2004
- Hou Y, Feng F, Yang R:** Effect of miR-449a-mediated Notch signaling pathway on the proliferation, apoptosis and invasion of papillary thyroid carcinoma cells. *Oncol Rep*, 43(2):471-480, 2020.
- Höti N, Lih TS, Dong M, Zhang Z, Mangold L, Partin AW, Sokoll LJ, Kay Li Q, Zhang H:** Urinary PSA and Serum PSA for Aggressive Prostate Cancer Detection. *Cancers (Basel)*, 15(3):960, 2023.
- Huang L, Pu Y, Hepps D, Danielpour D, Prins GS:** Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*, 148(3):1235–1245, 2007.
- Huang L, Pu Y, Hu WY, Birch L, Luccio-Camelo D, Yamaguchi T, Prins GS:** The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol.*, 328(2):188-199, 2009.
- Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE:** The 2016 WHO Classification of Organs Tumours of the Urinary System and Male Genital Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 70(1):106-119, 2016.
- Humphrey PA:** Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*, 60(1), 59–74, 2012.
- Hutchinson RC, Vezina CM, Strand DW:** A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Rep*, 25(12):3530-3542.e5, 2018.
- Iguchi K, Hashimoto M, Kubota M, Yamashita S, Nakamura M, Usui S, Sugiyama T, Hirano K:** Effects of 14 frequently used drugs on prostate-

specific antigen expression in prostate cancer LNCaP cells. *Oncol Lett*, 7:1665-1668, 2014.

Ito K, Fujizuka Y, Ishikura K, Cook B: Next-generation prostate-specific antigen test: precursor form of prostate-specific antigen. *International journal of clinical oncology*, 19(5), 782–792, 2014.

Ittmann M: Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(5): a030346, 2018.

Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 5(10):987-95, 2004.

Javaid N, Choi S: Toll-like Receptors from the Perspective of Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*, 12(2):297, 2020.

Jayaraman S, Pazhani J, PriyaVeeraraghavan V, Raj AT, Somasundaram DB, Patil S: PCNA and Ki67: Prognostic proliferation markers for oral cancer. *Oral Oncol*. 130:105943, 2022.

Jayasinghe KI, Abeysinghe AHMGB: Sarcomatoid carcinoma of the prostate presenting as bilateral cervical lymphadenopathy: a rare case report. *Afr J Urol*, 28:10, 2022.

Johnston DG, Corr SC: Toll-Like Receptor Signalling and the Control of Intestinal Barrier Function. *Methods Mol Biol*, 1390:287-300, 2016.

Juríková M, Danihel Ľ, Polák Š, Varga I: Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*, 118(5):544-552, 2016.

Kalantari E, Abolhasani M, Roudi R, Farajollahi MM, Farhad S, Madjd Z, Askarian-Amiri S, Mohsenzadegan M: Co-expression of TLR-9 and MMP-13 is associated with the degree of tumour differentiation in prostate cancer. *Int J Exp Pathol*, 100(2):123-132, 2019.

Kashyap D, Garg VK, Goel N: Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 125:173-120, 2021.

- Katkoori VR, Suarez-Cuervo C, Shanmugam C, Jhala NC, Callens T, Messiaen L, Posey J, Bumpers HL, Meleth S, Grizzle WE, Manne U:** Bax expression is a candidate prognostic and predictive marker of colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*, 1(2):76-89, 2010.
- Katoh M, Nakagama H:** FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med Res Rev*, 34(2):280-300, 2014.
- Kawai T, Akira S:** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5):373–384, 2010.
- Keating SE, Bowie AG:** Role of non-degradative ubiquitination in interleukin-1 and toll- like receptor signaling. *J Biol Chem*, 284(13):8211-8215, 2009.
- Khor LY, Desilvio M, Li R, McDonnell TJ, Hammond ME, Sause WT, Pilepich MV, Okunieff P, Sandler HM, Pollack A:** Bcl-2 and bax expression and prostate cancer outcome in men treated with radiotherapy in Radiation Therapy Oncology Group protocol 86-10. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 66(1):25-30, 2006.
- Kobayashi H, Kosaka T, Nakamura K, Kimura T, Nishihara H, Oya M:** Genomic analysis of aggressive ductal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Med*, 12(7):8445- 8451, 2023.
- Korc M, Friesel RE:** The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets*, 9(5):639-651, 2009.
- Korneev KV, Atretkhany KN, Drutskaya MS, Grivennikov SI, Kuprash DV, Nedospasov SA:** TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine*, 89:127–135, 2017.
- Koskensalo S, Hagström J, Linder N, Lundin M, Sorsa T, Louhimo J, Haglund C:** Lack of MMP-9 expression is a marker for poor prognosis in Dukes' B colorectal cancer. *BMC Clin Pathol*, 7:12-24, 2012.
- Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J:** Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*, 16(9):188, 2009

- Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC:** Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol*, 148(5):1567-1576, 1996.
- Krysko DV, Kaczmarek A, Krysko O, Heyndrickx L, Woznicki J, Bogaert P, Cauwels A, Takahashi N, Magez S, Bachert C, Vandenabeele P:** TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell death and differentiation*, 18(8):1316–1325, 2011.
- Kumar VL, Majumder PK:** Prostate gland: structure, functions and regulation. *International urology and nephrology*, 27(3):231–243, 1995.
- Kurt A, Yanar F, Asoglu O, Balik E, Olgac V, Karanlik H, Kucuk ST, Ademoglu E, Yegen G, Bugra D:** Low Mmp 9 and VEGF levels predict good oncologic outcome in mid and low rectal cancer patients with neoadjuvant chemoradiation. *BMC Clin Pathol*, 12:27, 2012.
- Kutikhin AG:** Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Human immunology*, 72(11): 1095–1116, 2011.
- Kutlu Ö, Köksal İT:** PSA Etkinliğini Artırıcı Çabalar: PSA Dansitesi, PSA Hızı, Yaşa Özgü PSA, Serbest ve Kompleks PSA. *Türk Urol Sem*, 3: 55-60, 2012.
- Kymionis GD, Dimitrakakis CE, Konstadoulakis MM, Arzimanoglou I, Leandros E, Chalkiadakis G, Keramopoulos A, Michalas S:** Can expression of apoptosis genes, bcl-2 and bax, predict survival and responsiveness to chemotherapy in node-negative breast cancer patients?. *The Journal of surgical research*, 99(2), 161–168, 2001.
- La Vignera S, Condorelli RA, Russo GI, Morgia G, Calogero AE:** control of benign prostatic hyperplasia. *Andrology*, 4(3):404–411, 2016.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald K A, Monks B G, Knetter CF, Golenbock DT:** TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*, 5(2):190-198, 2004.
- Lawen A:** Apoptosis—an introduction. *BioEssays*, 25:888–896, 2003.

- Leis-Filho AF, Lainetti PD, Kobayashi PE, Palmieri C, Amorim RL, Fonseca-Alves CE:** Expression and prognostic significance of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and its receptor in canine prostate cancer. *Prostate*, 2021 Oct;81(14):1021- 1031, 2021.
- Letai A:** Apoptosis and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1):275–294, 2017.
- Li J, Shen C, Wang X, Lai Y, Zhou K, Li P, Liu L, Che G:** Prognostic value of TGF- β in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 19(1):691, 2019.
- Li J, Yuan J:** Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48): 6194–6206, 2008.
- Liao Z, Tan ZW, Zhu P, Tan NS:** Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment-Accomplices in tumor malignancy. *Cellular immunology*, 343:103729, 2019.
- Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ:** Prostate-specific antigen and prostate cancer: Prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews Cancer*, 2008.
- Lim DJ, Liu XL, Sutkowski DM, Braun EJ, Lee C, Kozłowski JM:** Growth of an androgen-sensitive human prostate cancer cell line, LNCaP, in nude mice. *The Prostate*, 22(2):109–118, 1993.
- Lim KH, Staudt LM:** Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(1):a011247, 2013.
- Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R:** Overexpression of FGF-2 is associated with increased angiogenesis and decreased survival in primary breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 4:24-30, 2003.
- Linxweiler J, Körbel C, Müller A, Hammer M, Veith C, Bohle RM, Stöckle M, Junker K, Menger MD, Saar M:** A novel mouse model of human prostate cancer to study intraprostatic tumor growth and the development of lymph node metastases. *Prostate*, 78(9):664-675, 2018.
- Liu G, Chen T, Ding Z, Wang Y, Wei Y, Wei X:** Inhibition of FGF-FGFR and

VEGF- VEGFR signalling in cancer treatment. *Cell Prolif*, 54(4):e13009, 2021.

Liu W, Zhu Y, Ye L, Zhu Y, Wang Y: Establishment of an orthotopic prostate cancer xenograft mouse model using microscope-guided orthotopic injection of LNCaP cells into the dorsal lobe of the mouse prostate. *BMC Cancer*, 22(1):173, 2022.

Liu Z, Ding Y, Ye N, Wild C, Chen H, Zhou J: Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy. *Med Res Rev*, 36(2):313-341, 2016.

Lopez A, Reyna DE, Gitego N, Kopp F, Zhou H, Miranda-Roman MA, Nordstrøm LU, Narayanagari SR, Chi P, Vilar E, Tsirigos A, Gavathiotis E: Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer. *Nat Commu*, 13(1):1199, 2022.

Lowe SW, Lin AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3):485-495, 2000.

Luo Y, Jiang QW, Wu JY, Qiu JG, Zhang WJ, Mei XL, Shi Z, Di JM: Regulation of migration and invasion by Toll-like receptor-9 signaling network in prostate cancer. *Oncotarget*, 6(26):22564-22574, 2015.

Ma L, Qin N, Wan W, Song S, Hua S, Jiang C, Li N, Huang L, Gao X: TLR9 activation induces immunosuppression and tumorigenesis via PARP1/PD-L1 signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *Am J Physiol Cell Physiol*, 326(2):C362-C381, 2024.

Ma T, Yang S, Jing H, Cong L, Cao Z, Liu Z, Huang Z: Apparent diffusion coefficients in prostate cancer: correlation with molecular markers Ki-67, HIF-1 α and VEGF. *NMR Biomed*, 31(3), 2018.

Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N: bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology*, 52(6):1085-1090, 1998.

Magri V, Boltri M, Cai T, Colombo R, Cuzzocrea S, De Visschere P, Giuberti R, Granatieri CM, Latino MA, Larganà G, Leli C, Maierna G, Marchese V, Massa E, Matteelli A, Montanari E, Morgia G, Naber KG, Papadouli V, Perletti G, Rekleiti N, Russo GI, Sensini A, Stamatiou K, Trinchieri A,

Wagenlehner FME: Multidisciplinary approach to prostatitis. *Arch Ital Urol Androl*, 90(4):227-248, 2019.

Mahmud Z, Rahman A, Mishu ID, Kabir Y: Mechanistic insights into the interplays between neutrophils and other immune cells in cancer development and progression. *Cancer metastasis reviews*, 41(2):405–432, 2022.

Marcus DM, Goodman M, Jani AB, Osunkoya AO, Rossi PJ: A comprehensive review of incidence and survival in patients with rare histological variants of prostate cancer in the United States from 1973 to 2008. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 15(3):283– 288, 2012.

Marek L, Ware KE, Fritzsche A, Hercule P, Helton WR, Smith JE, McDermott LA, Coldren CD, Nemenoff RA, Merrick DT, Helfrich BA, Bunn PA Jr, Heasley LE: Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non- small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol*, 75(1):196-207, 2009.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR: Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental biology*, 253(2), 165–174, 2003.

Matijevic Glavan T, Cipak Gasparovic A, Vérillaud B, Busson P, Pavelic J: Toll-like receptor 3 stimulation triggers metabolic reprogramming in pharyngeal cancer cell line through Myc, MAPK, and HIF. *Mol Carcinog*. 56(4):1214-1226, 2017.

McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M, Andersen MM, LoP: (1996). Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia*, 52(10-11):1008–1017, 1996.

McNeal JE, Bostwick DG: Intraductal dysplasia: A premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol*, 17: 64–71, 1986.

McNeal JE: Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology*, 12(8):619-633, 1988.

McNeal JE: Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer*, 23(1):24-

34, 1969.

Morana O, Wood W, Gregory CD: The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int J Mol Sci*, 23(3):1328, 2022.

Moreira D, Zhang Q, Hossain DM, Nechaev S, Li H, Kowolik CM, D'Apuzzo M, Forman S, Jones J, Pal SK, Kortylewski M: TLR9 signaling through NF- κ B/RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells. *Oncotarget*, 6(19):17302-17313, 2015.

Moresco EMY, LaVine D, Beutler B: Toll benzeri reseptörler. *Current Biology*, 21(13), R488–R493, 2011.

Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S, Mazzarino MC: Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res*, 33(1):44-50, 2005.

Mouraviev V, Polascik TJ: Update on cryotherapy for prostate cancer in 2006. *Curr. Opin. Urol*, 16:152–156, 2006.

Muresan XM, Slabáková E, Procházková J, Drápela S, Fedr R, Pícková M, Vacek O, Víchová R, Suchánková T, Bouchal J, Kürfürstová D, Král M, Hulínová T, Sýkora RP, Študent V, Hejret V, van Weerden WM, Pühr M, Pustka V, Potěšil D, Zdráhal Z, Culig Z, Souček K: Toll-Like Receptor 3 Overexpression Induces Invasion of Prostate Cancer Cells, whereas Its Activation Triggers Apoptosis. *Am J Pathol*, 192(9):1321-1335, 2022.

Nath D, White JR, Bratslavsky G, Kotula L: Identification, Histological Characterization, and Dissection of Mouse Prostate Lobes for In Vitro 3D Spheroid Culture Models. *J Vis Exp*, 18(139):58397, 2018.

Nazim SM, Jalbani IK, Abbas F, Minhas K: Sarcomatoid carcinoma of prostate involving the whole lower urinary tract and rectum. *Urol Ann*, 5(4):283-286, 2013.

Nelson RS, Epstein JI: Prostatic carcinoma with abundant xanthomatous cytoplasm. Foamy gland carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 20(4):419-426, 1996.

- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, 13(1):9–22, 1999.
- Newton K, Dixit VM:** Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(3):a006049, 2012.
- Ni L, Lu J, Chen Y:** TLR3 overexpression promotes cell invasion and migration via EGFR/Src-dependent pathway in prostate cancer. *Front Oncol*, 12:934012, 2022.
- Nouri Y, Weinkove R, Perret R:** T-cell intrinsic Toll-like receptor signaling: implications for cancer immunotherapy and CAR T-cells. *J Immunother Cancer*, 9(11):e003065, 2021.
- Obeng E:** Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz. J. Biol.*, 81(4):1133–1143, 2021.
- Olbert PJ, Kesch C, Henrici M, Subtil FS, Honacker A, Hegele A, Hofmann R, Hänze J:** TLR4- and TLR9-dependent effects on cytokines, cell viability, and invasion in human bladder cancer cells. *Urol Oncol*, 33(3): 110.e19-27, 2015.
- Oliveira DS, Dzinic S, Bonfil AI, Saliganan AD, Sheng S, Bonfil RD:** The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosn J Basic Med Sci.*, 16(1):8- 13, 2016.
- O'Reilly LA, Strasser A:** Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm Res*, 48(1):5-21, 1999.
- Ortiz-Rey JA, Bellas-Pereira A, San Miguel-Fraile P, Morellón-Baquera R, Domínguez-Aristegui P, González-Carreró Fojón J:** Intraductal Carcinoma of the Prostate without High-Grade Invasive Adenocarcinoma: Report of Two Cases and Review of the Literature. *Archivos españoles de urologia*, 75(9):738–745, 2022.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK:** Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 45(6):487-98, 2012.
- Pahlavanneshan S, Sayadmanesh A, Ebrahimiyan H, Basiri M:** Toll-Like

Receptor- Based Strategies for Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res.*, 22;2021:9912188, 2021.

Pandey S, Agrawal DK: Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol Cell Biol*, 84(4):333-341, 2006.

Paone A, Galli R, Gabellini C, Lukashev D, Starace D, Gorlach A, De Cesaris P, Ziparo E, Del Bufalo D, Sitkovsky MV, Filippini A, Riccioli A: Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia- inducible factor 1 alpha. *Neoplasia*, 12(7):539-549, 2010.

Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E, Riccioli A: Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis*, 29(7):1334-1342, 2008.

Pasche B: Role of transforming growth factor beta in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 186(2):153–168, 2001.

Pickup M, Novitskiy S, Moses HL: The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 13(11):788-799, 2013.

Pistritto G, Triscioglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G: Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4):603-619, 2016.

Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R: Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem*, 104(4):1124-1149, 2008.

Pletcher A, Shibata M: Prostate organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 149(12): dev200394, 2022.

Pluta P, Smolewski P, Pluta A, Cebula-Obrzut B, Wierzbowska A, Nejc D, Robak T, Kordek R, Gottwald L, Piekarski J, Jeziorski A: Significance of Bax expression in breast cancer patients. *Pol Przegl Chir*, 83(10):549-553, 2011.

- Preziosi R, Sarli G, Benazzi C, Marcato PS:** Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in canine and feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 113(4):301–313, 1995.
- Prins GS:** Developmental estrogenization: Prostate gland reprogramming leads to increased disease risk with aging. *Differentiation*, 118:72-81, 2021.
- Priolo C, Agostini M, Vena N, Ligon AH, Fiorentino M, Shin E, Farsetti A, Pontecorvi A, Sicinska E, Loda M:** Establishment and genomic characterization of mouse xenografts of human primary prostate tumors. *Am J Pathol*, 176(4):1901-19013.
- Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y and Wang J:** The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front. Oncol.* 12:985363, 2022.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R:** Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(1):57–63, 2009.
- Ran Z, Hou L, Guo H, Wang K, Li X:** Expression of VEGF, COX-2 and MMP-9 in breast cancer and their relationship with ultrasound findings. *Int J Clin Exp Pathol*, 11(9):4264-4269, 2018.
- Ranasinha N, Omer A, Philippou Y, Harriss E, Davies L, Chow K, Chetta PM, Erickson A, Rajakumar T, Mills IG, Bryant RJ, Hamdy FC, Murphy D, G, Loda M, Hovens CM, Corcoran NM, Verrill C, Lamb AD:** Ductal adenocarcinoma of the prostate: A systematic review and meta-analysis of incidence, presentation, prognosis, and management. *BJUI compass*, 2(1):13–23, 2021.
- Rawla P:** Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*, 10(2):63-89, 2019.
- Recker F, Kwiatkowski MK, Huber A, Stamm B, Lehmann K, Tscholl R:** Prospective detection of clinically relevant prostate cancer in the prostate specific antigen range 1 to 3 ng./ml. combined with free-to-total ratio 20% or less: the Aarau experience. *J Urol*, 166(3):851-855, 2001.
- Reddy CA, Ciezki JP, Nyberg T, Klein EA:** Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*,

69(3):428-435, 2016.

Reina Y, Villaquirán C, García-Perdomo HA: Advances in high-risk localized prostate cancer: Staging and management. *Current problems in cancer*, 47(4):100993, 2023.

Reis ST, Pontes-Júnior J, Antunes AA, Sousa-Canavez JM, Abe DK, Cruz JA, Dall'oglio MF, Crippa A, Passerotti CC, Ribeiro-Filho LA, Viana NI, Srougi M, Leite KR: Tgf- β 1 expression as a biomarker of poor prognosis in prostate cancer. *Clinics (Sao Paulo)*, 66(7):1143-1147, 2011.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Korkmaz A, Fuentes-Broto L, Hardman WE, Rosales-Corral SA, Qi W: A walnut-enriched diet reduces the growth of LNCaP human prostate cancer xenografts in nude mice. *Cancer Invest*, 31(6):365-373, 2013.

Rembrink K, Romijn JC, van der Kwast TH, Rübber H, Schröder FH: Orthotopic implantation of human prostate cancer cell lines: A clinically relevant animal model for metastatic prostate cancer. *The Prostate*, 31(3): 168–174, 1997.

Ren T, Xu L, Jiao S, Wang Y, Cai Y, Liang Y, Zhou Y, Zhou H, Wen Z: TLR9 signaling promotes tumor progression of human lung cancer cell in vivo. *Pathol Oncol Res*, (4):623-630, 2009.

Riabov V, Tretyakova I, Alexander RB, Pushko P, Klyushnenkova EN: Anti-tumor effect of the alphavirus-based virus-like particle vector expressing prostate-specific antigen in a HLA-DR transgenic mouse model of prostate cancer. *Vaccine*, 33(41):5386– 5395, 2015.

Riaz IB, Naqvi SAA, He H, Asghar N, Siddiqi R, Liu H, Singh P, Childs DS, Ravi P, Hussain SA, Murad MH, Boorjian SA, Sweeney C, Van Allen EM, Bryce AH: First- line Systemic Treatment Options for Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer: A Living Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA Oncol*, 9(5):635-645, 2023.

Ricca A, Biroccio A, Del Bufalo D, Mackay AR, Santoni A, Cippitelli M: bcl-2 over- expression enhances NF-kappaB activity and induces mmp-9

transcription in human MCF7(ADR) breast-cancer cells. *Int J Cancer*, 86(2):188-196, 2000.

Rivera-Pérez J, Monter-Vera MDR, Barrientos-Alvarado C, Toscano-Garibay JD, Cuesta-Mejías T, Flores-Estrada J: Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies. *Oncol Lett*, 15(1):1072-1078, 2018.

Robinson B, Magi-Galluzi C, Zhou M: Intraductal carcinoma of the prostate. *Arch Pathol Lab Med*, 136: 418-25, 2012.

Roth KA: Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 60(9):829–838, 2001.

Ruusuvuori P, Valkonen M, Nykter M, Visakorpi T, Latonen L: Feature-based analysis of mouse prostatic intraepithelial neoplasia in histological tissue sections. *Journal of pathology informatics*, 7:5, 2016.

Saar M, Körbel C, Linxweiler J, Jung V, Kamradt J, Hasenfus A, Stöckle M, Unteregger G, Menger MD: Orthotopic tumorgrafts in nude mice: A new method to study human prostate cancer. *Prostate*, 75(14):1526-1537, 2015.

Sahillioğlu B, Erden G, Erdoğan S, Yıldırımkaaya MM: Evaluation of the Diagnostic Value of Free/Total Prostate Specific Antigen for Prostat Cancer in Turkish Males, Investigating the Appropriate Cut off Value. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65 (3): 121-125, 2008.

Salaun B, Romero P, Lebecque S: Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *European Journal of Immunology*, 37(12):3311–3318, 2007.

Salaun B, Zitvogel L, Asselin-Paturel C, Morel Y, Chemin K, Dubois C, Massacrier C, Conforti R, Chenard MP, Sabourin JC, Goubar A, Lebecque S, Pierres, M, Rimoldi D, Romero P, Andre F: TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer research*, 71(5):1607–1614, 2011.

Sarı A, Ermete M, Callı A, Sengül F: Psödohiperplastik Prostat Adenokarsinomu:

Olgu Sunumu. *Turgut Özal Tıp Merk Derg.*, 13(4):263-267, 2006.

Sasaki T, Ishii K, Iwamoto Y, Kato M, Miki M, Kanda H, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y: Fibroblasts prolong serum prostate-specific antigen decline after androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Lab Invest*, 96(3):338-349, 2016.

Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DS: Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 2 Suppl 1(Suppl 1):205-214, 2009.

Savitskaya MA, Onishchenko GE: Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry Moscow*, 80:1393–1405, 2015.

Schatten H: Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. *Advances in experimental medicine and biology*, 1095:1-4, 2018.

Sciacqua LV, Vanzulli A, Di Meo R, Pellegrino G, Lavorato R, Vitale G, Carrafiello G: Minimally Invasive Treatment in Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). *Technology in cancer research & treatment*, 22, 2023.

Seipel AH, Delahunt B, Samaratunga H, Egevad L: Ductal adenocarcinoma of the prostate: histogenesis, biology and clinicopathological features. *Pathology*,(5):398-405, 2016.

Sekhoacha M, Riet K, Motlounge P, Gumenu L, Adegoke A, Mashele S: Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*, 27(17):5730, 2022.

Shafeghat M, Kazemian S, Aminorroaya A, Aryan Z, Rezaei N: Toll-like receptor 7 regulates cardiovascular diseases. *International immunopharmacology*, 113(Pt A): 109390, 2022.

Shapiro E, Becich MJ, Hartanto V, Lepor H: The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic benign prostate hyperplasia. *J Urol*, 147: 1293-1300, 1992.

Shapiro E, Hartanto V, Lepor H: Quantifying the smooth muscle content of the

prostate using double-immunoenzymatic staining and color assisted image analysis. *The Journal of urology*, 147(4):1167–1170.

Sharma M, Gupta S, Dhole B, Kumar A: The Prostate Gland. In: Kumar, A., Sharma, M. (eds) *Basics of Human Andrology*. Springer, Singapore, 2017.

Shen SS, Lerner SP, Muezzinoglu B, Truong LD, Ameil G, Wheeler TM: Prostatic involvement by transitional cell carcinoma in patients with bladder cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol*, 37: 726-34, 2006.

Shi M, Chen X, Ye K, Yao Y, Li Y: Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy: Systematic review. *Medicine*, 95(25), e3951, 2016.

Shi X, Yang J, Deng S, Xu H, Wu D, Zeng Q, Wang S, Hu T, Fanglong Wu F, Zhou G: TGF- β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies. *J Hematol Oncol*, 15:135, 2022.

Siech C, de Angelis M, Jannello LMI, Di Bello F, Rodriguez Peñaranda N, Goyal JA, Tian Z, Saad F, Shariat SF, Puliatti S, Longo N, de Cobelli O, Briganti A, Hoeh B, Mandel P, Kluth LA, Chun FKH, Karakiewicz PI: Rare histological prostate cancer subtypes: Cancer-specific and other-cause mortality. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 10, 2024.

Siiteri PK, Wilson JD: Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab*, 38(1):113-125, 1974.

Singh O, Bolla SR: Anatomy, Abdomen and Pelvis, Prostate. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from, 2024

So EY, Ouchi T: The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci*, 6(7):675-681, 2010.

Sohn EJ, Jung DB, Lee H, Han I, Lee J, Lee H, Kim SH: CNOT2 promotes proliferation and angiogenesis via VEGF signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Lett*, 412:88-98, 2018.

Sohn SK, Jung JT, Kim DH, Kim JG, Kwak EK, Park Ti, Shin DG, Sohn KR,

- Lee KB:** Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*, 73(2):101-107, 2003.
- Sokoll LJ, Chan DW:** Prostate-specific antigen. Its discovery and biochemical characteristics. *Urol Clin North Am*, 24(2):253-259, 1997.
- Spitz AZ, Gavathiotis E:** Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends Pharmacol Sci*, 43(3):206-220, 2022.
- Steiner MS:** Expression of transforming growth factor-beta 1 in prostate cancer. *Endocrinology*, 135(5): 2240–2247, 1994.
- Sun H, Li Y, Zhang P, Xing H, Zhao S, Song Y, Wan D, Yu J:** Targeting toll-like receptor 7/8 for immunotherapy: recent advances and perspectives. *Biomark Res*, 10(1):89, 2022.
- Takahashi H, Shibuya M:** The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109(3):227–241, 2005.
- Takeda K, Akira S:** Toll-Like Receptors. *Curr. Protoc. Immunol*, 109:14, 2015.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S:** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21:335-1376, 2003.
- Tan KN, Avery VM, Carrasco-Pozo C:** Metabolic Roles of Androgen Receptor and Tip60 in Androgen-Dependent Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(18):6622, 2020.
- Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL:** Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*, 36(1):3-23, 2015.
- Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP:** The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 7:408-415, 2005.
- Thomas MU, Messex JK, Dang T, Abdulkadir SA, Jorcyk CL, Liou GY:** Macrophages expedite cell proliferation of prostate intraepithelial neoplasia through their downstream target ERK. *FEBS J*, 288(6):1871-1886, 2021.
- Toivanen R, Shen MM:** Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal

regulation and cell type specification. *Development*, 144(8):1382-1398, 2017.

Tolkach Y, Kristiansen G: Cribriform and glomeruloid acinar adenocarcinoma of the prostate-an intratumoural intraductal carcinoma? *Histopathology*, 74(6):804-808, 2019.

Trejo-de la O A, Hernández-Sancén P, Maldonado-Bernal C: Relevance of single- nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun*, 15(4):199-209, 2014.

Tsamandas AC, Kardamakis D, Petsas T, Zolota V, Vassiliou V, Matatsoris T, Kalofonos H, Vagianos CE, Scopa CD: Bcl-2, bax and p53 expression in rectal adenocarcinoma. Correlation with classic pathologic prognostic factors and patients' outcome. *In vivo (Athens, Greece)*, 21(1):113–118, 2007.

Turner N, Grose R: Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(2):116-129, 2010.

Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, Natrajan R, Marchio C, Iorns E, Mackay A, Gillett C, Grigoriadis A, Tutt A, Reis-Filho JS, Ashworth A: FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res*, 70(5):2085-2094, 2010.

Ultimo A, Giménez C, Bartovsky P, Aznar E, Sancenón F, Marcos MD, Amorós P, Bernardo AR, Martínez-Mañez R, Jiménez-Lara AM, Murguía JR: Targeting Innate Immunity with dsRNA-Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticles Promotes Antitumor Effects on Breast Cancer Cells. *Chemistry*, 22(5):1582-1586, 2016.

Urban-Wojciuk Z, Khan MM, Oyler BL, Fåhraeus R, Marek-Trzonkowska N, Nita- Lazar A, Hupp TR, Goodlett DR: The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection. *Front Immunol*, 10:2388, 2019.

Väisänen MR, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, Selander KS, Vaarala MH: Expression of Toll-like receptor-9 is associated with poor progression-free survival in prostate cancer. *Oncol Lett*, 5(5):1659-1663, 2013.

Väisänen MR, Väisänen T, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, Desmond R,

- Selander KS, Vaarala MH:** Expression of toll-like receptor-9 is increased in poorly differentiated prostate tumors. *Prostate*, 70(8):817-824, 2010.
- Väisänen MR, Väisänen T, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, Desmond R, Selander KS, Vaarala MH:** Expression of toll-like receptor-9 is increased in poorly differentiated prostate tumors. *Prostate*, 70(8):817-824, 2010.
- van Leenders GJLH, Verhoef EI, Hollemans E:** Prostate cancer growth patterns beyond the Gleason score: entering a new era of comprehensive tumour grading. *Histopathology*, 77(6):850-861, 2020.
- Vardı N:** Erkeke Genital Sistem Histolojisi," In *Histoloji & Patoloji*, Malatya: İnönü Üniversitesi, 451-473, 2022.
- Vardiyan R, Ezati D, Anvari M, Ghasemi N, Talebi A:** Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax. *Clin Exp Reprod Med*, 47(3):155-160, 2020.
- Veneziani I, Alicata C, Moretta L, Maggi E:** Human toll-like receptor 8 (TLR8) in NK cells: Implication for cancer immunotherapy. *Immunology letters*, 261: 13–16, 2023.
- Verze P, Cai T, Lorenzetti S:** The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol*, 13(7):379-386, 2016.
- Wallner K, Lee H, Wasserman S, Dattoli M:** Low risk of urinary incontinence following prostate brachytherapy in patients with a prior transurethral prostate resection. *Int. J. Radiat. Oncol*, 37:565–569, 1997.
- Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA:** Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*, 32(17-18):1105-1140, 2018.
- Wang H, Wei X, Zhang D, Li W, Hu Y:** Lncap-AI prostate cancer cell line establishment by Flutamide and androgen-free environment to promote cell adherent. *BMC Mol Cell Biol*, 23(1):51, 2022.
- Wang L, Kong W, Liu B, Zhang X:** Proliferating cell nuclear antigen promotes cell proliferation and tumorigenesis by up-regulating STAT3 in non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother*, 104:595-602, 2018.

- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM:** Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*, 17(2):159-163, 1979.
- Wang X, An Z, Geller J, Hoffman RM:** High-malignancy orthotopic nude mouse model of human prostate cancer LNCaP. *Prostate*, 39(3):182-186, 1999.
- Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G:** Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68(4-5):270-279, 2001.
- Wang YL, Wu WR, Lin PL, Shen YC, Lin YZ, Li HW, Hsu KW, Wang SC:** The Functions of PCNA in Tumor Stemness and Invasion. *Int J Mol Sci*, 23(10):5679, 2022.
- Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA:** BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*, 10(3):177, 2019.
- Warren HS:** Toll-like receptors. *Crit Care Med*, 33(12 Suppl):457-459, 2005.
- Wasim S, Lee SY, Kim J:** Complexities of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*, 23(22):14257, 2022.
- Waters DJ, Janovitz EB, Chan TC:** Spontaneous metastasis of PC-3 cells in athymic mice after implantation in orthotopic or ectopic microenvironments. *Prostate*, 26(5):227- 234, 1995.
- Weinkopff T, Mariotto A, Simon G, Hauyon-La Torre Y, Auderset FS, Chuster S, Zangger H, Fasel N, Barral A, Tacchini-Cottier F:** Role of Toll-Like Receptor 9 Signaling in Experimental *Leishmania braziliensis* Infection. *Infect Immun* 81,2013.
- Wiedlocha A, Haugsten EM, Zakrzewska M:** Roles of the FGF-FGFR Signaling System in Cancer Development and Inflammation. *Cells*, 10(9):2231, 2021.
- Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S:** Cumulative expression of HIF-1- alpha, Bax, Bcl-xL and P53 in human colorectal cancer. *Pathology*, 39(3):334-338, 2007.
- Wojtkowska A, Małek A, Giziński S, Sapieryński R, Rodo A, Sokołowska J, Zabielska-Koczywas KA, Wojtalewicz A, Walewska M, Kautz E, Ostrzeszewicz M, Lechowski R:** Comparison of MMP-2, MMP-9, COX-2,

and PGP Expression in Feline Injection-Site and Feline Noninjection-Site Sarcomas-Pilot Study. *Animals (Basel)*, 14(14):2110, 2024.

Wong RS: Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30:87, 2011.

Wu F, Shan S, Han Y, Wang Y, Wang K, Ren T: PUB051 TLR9 Is Functional Marker for Cancer Stem Cell in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(11): S2381- S2382, 2017.

Xie X, Clausen OPF, Angelis PD, Boysen M: The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer*, 86(6):913–920, 1999.

Xu X, Lai Y, Hua ZC: Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*, 39(1): BSR20180992, 2019.

Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X, Cao X: Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone research*, 6:2, 2018.

Yamazaki T, Galluzzi L: BAX and BAK dynamics control mitochondrial DNA release during apoptosis. *Cell death and differentiation*, 29(6):1296–1298, 2022.

Yang D, Yao X, Zhou J, Zhou H, Lu G, Wang Y: Correlations of PCNA expression with thyroid cancer ultrasound and histopathologic features. *Int J Clin Exp Pathol*, 12(4):1378-1384, 2019.

Yang H, Wang B, Yan J, Wang T, Zhou XN, Wen HY, Zhu XM: Toll-like receptor 2 promotes invasion by SGC-7901 human gastric carcinoma cells and is associated with gastric carcinoma metastasis, *Ann. Clin. Lab. Sci*, 44 (2):158–166, 2014.

Yang J, Ning J, Peng L, He D: Effect of curcumin on Bcl-2 and Bax expression in nude mice prostate cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(8):9272-9278, 2015.

Yang L, Li A, Wang Y, Zhang Y: Intratumoral microbiota: roles in cancer initiation, development and therapeutic efficacy. *Signal transduction and*

targeted therapy, 8(1):35, 2023.

- Yang M, Li J, Gu P, Fan X:** The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. *Bioact Mater*, 6(7):1973-1987, 2020.
- Yang Y, Feng R, Wang YZ, Sun HW, Zou QM, Li HB:** Toll-like receptors: Triggers of regulated cell death and promising targets for cancer therapy. *Immunology Letters*, 223 (2020):1-9, 2020.
- Ye J, Mills BN, Qin SS, Garrett-Larsen J, Murphy JD, Uccello TP, Han BJ, Vrooman TG, Johnston CJ, Lord EM, Belt BA, Linehan DC, Gerber SA:** Toll-like receptor 7/8 agonist R848 alters the immune tumor microenvironment and enhances SBRT-induced antitumor efficacy in murine models of pancreatic cancer. *J Immunother Cancer*, 10(7):e004784, 2022.
- Ye Y, Mo R, Zheng R, Zou J, Liu S, Mi Q, Zhong W:** Identification and Validation of FGF-Related Prognostic Signatures in Prostate Cancer. *Dis Markers*, 2023:7342882, 2023.
- Yip K, Reed J:** Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27:6398–6406, 2008.
- Yoo YS, Seo M, Woo HY, Lee CH, Choi JH:** Expression of p53, PCNA, EGFR in Rat Submandibular Gland Tumor Induced Experimentally. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, 43(6):631-637, 2000.
- Yuan MM, Xu YY, Chen L, Li XY, Qin J, Shen Y:** TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis. *BMC Cancer*, 15:245, 2015.
- Yuk JM, Jo EK:** Toll-like receptors and innate immunity. *J Bacteriol Virol*, 41(4):225– 235, 2011.
- Zhang C, Guo Y, Cui J, Zhu HH, Gao WQ:** Cytokeratin 18 is not required for morphogenesis of developing prostates but contributes to adult prostate regeneration. *Biomed Res Int*, 2013:576472, 2013.
- Zhang F, Wang D, Chen F:** Toll-like receptor-9 in hypoxic nasopharyngeal carcinoma cells and its correlation with cell proliferation and apoptosis.

Oncol Lett, 14(6):7829- 7832, 2017.

Zhang Y, Liang C: Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation. *Sci. China Life Sci*, 59:1210–1217, 2016.

Zhang Y, Wang Q, Ma A, Li Y, Li R, Wang Y: Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. *Oncology reports*, 31(5):2298–2304, 2014.

Zhou J, Xu Y, Wang G, Mei T, Yang H, Liu Y: The TLR7/8 agonist R848 optimizes host and tumor immunity to improve therapeutic efficacy in murine lung cancer. *Int J Oncol*, 61(1):81, 2022.

Zhou M, McFarland-Mancini MM, Funk HM, Husseinzadeh N, Mounajjed T, Drew AF: Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. *Cancer Immunol Immunother*, 58(9):1375-1385, 2009.

Zhou M: High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 31(S1):S71–S79, 2018.

Zhou, Y: The roles of FGF/FGFR signaling in tumorigenesis and therapeutic responses. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(12):1215–1234, 2016.

Zingiryan A, Farina NH, Finstad KH, Stein JL, Lian JB, Stein GS: Dissection of Individual Prostate Lobes in Mouse Models of Prostate Cancer to Obtain High Quality RNA. *J Cell Physiol*, 232(1):14-18, 2017.

Zizi-Sermpetzoglou A, Savvaidou V, Tepelenis N, Galariotis N, Olympitis M, Stamatiou K: Sarcomatoid carcinoma of the prostate: a case report. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(3):319-22, 2010.

Zou G, Zhang X, Wang L, Li X, Xie T, Zhao J, Yan J, Wang L, Ye H, Jiao S, Xiang R, Shi Y: Herb-sourced emodin inhibits angiogenesis of breast cancer by targeting VEGFA transcription. *Theranostics*, 10(15):6839-6853, 2020.

8.EKLER

Ek1 : Etik Kurul Kararı

