

**T.C.
SAKARYA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**METASTATİK PROSTAT KANSERİNDE 5-ALA’NIN
FOTODİNAMİK TEDAVİDE ANTİ-KANSER ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye KARADAĞ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ
Ortak Tez Danışmanı : Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER

Haziran 2022

T.C.
SAKARYA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

METASTATİK PROSTAT KANSERİNDE 5-ALA’NIN
FOTODİNAMİK TEDAVİDE ANTI-KANSER ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye KARADAĞ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 23/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ	BAŞARI DURUMU
Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ	BAŞARILI
Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER	BAŞARILI
Prof. Dr. Birsen AYDEMİR	BAŞARILI
Doç. Dr. Mustafa CAN	BAŞARILI
Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI	BAŞARILI

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Sümeyye Karadağ

23/06/2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde, tez çalışmamın belirlenmesinden yazılmasına kadar geçen tüm süreçte bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, beni özenle yönlendiren değerli danışmanım Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ'a ve sevgili ortak danışmanım Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı hazırlarken laboratuvar olanakları konusunda her daim destek olan Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Bölüm Başkanı Doç. Dr. Mustafa Zahid YILDIZ'a teşekkür ederim. Tez çalışmamın ana deneylerini gerçekleştirmem için Tıbbi Biyoloji Laboratuvarında çalışmama olanak tanıyan, değerli bilgilerinden faydalandığım sevgili ortak danışmanım Do. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e teşekkür ederim. Laboratuvardaki cihazlar ile ilgili teknik açıdan bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Ali Furkan KAMANLI'ya teşekkür ederim.

Ayrıca deneylerim sırasında desteğini ve yardımını esirgemeyen birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Özge ÖZTEN'e ve Elif SÖZEN KÜÇÜKKARA'ya teşekkür ederim.

Son olarak, yüksek lisans eğitimim dahil olmak üzere tüm eğitim hayatımda her zaman arkamda olan, desteklerini her daim hissettiğim canım AİLEME çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iv
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
SİMGELER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x

BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1

BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.1.1. Prostat kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi	3
2.1.2. Prostat kanserinin tedavisi	6
2.1.2.1. Cerrahi Yöntemler.....	6
2.1.2.2. Rayoterapi.....	7
2.1.2.3. Hormon tedavisi.....	8
2.1.2.4. Kemoterapi.....	8
2.2. Fotodinamik Tedavi.....	9
2.2.1. FDT etki mekanizması.....	11
2.2.2. FDT'de fotoduyarlı maddeler.....	13
2.2.2.1. 5-Aminolevulinilik asit.....	16
2.2.2.2. FS maddelerinin hücre içi birikimi.....	16
2.2.3. Işık kaynakları ve dalga boyu.....	17
2.2.4. FDT ile hücre ölümünün uyarılması.....	19
2.2.5. Prostat kanseri tedavisinde 5 ALA ile yapılan FDT çalışmaları.....	22

BÖLÜM 3.	
MALZEME VE YÖNTEM	23

3.1. Hücre Hattı ve Kültür Koşulları	23
3.2.1. Hücre hattı.....	23
3.2.2. Hücrelerin kültüre alınması ve saklama koşulları.....	23
3.2. Fotoduyarlı Madde ve Işık Kaynağı.....	24
3.3. Fotodinamik Tedavi Uygulama Protokolü.....	25
3.4. Optimizasyon Çalışmaları.....	25
3.4.1. Ana çalışma.....	27
3.5. Hücre Analizleri.....	29
3.5.1. WST-1 hücre analizi testi.....	29
3.5.2. Annexin V- apoptoz/nekroz analizi	30
3.5.3. Akridin oranj/Etidyum bromür boyama.....	31
3.6. İstatiksel Analiz.....	32
 BÖLÜM 4.	
BULGULAR	33
4.1. PC-3 Hücre Hattında İntraselüler PpIX-floresans Miktarının Belirlenmesi.....	33
4.2. PC-3 Hücreleri Üzerinde 5-ALA'nın Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	34
4.3. Annexin V Analizi ve Apoptotik Etkinin Belirlenmesi.....	37
4.4. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Bulguları.....	39
 BÖLÜM 6.	
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
 KAYNAKLAR	48

KISALTMALAR

5-ALA	: 5-Aminolevulinik asit
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
AO	: Akridin Oranj
CO₂	: Karbondioksit
CW	: Continious Mod
CRPC	: Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay
FECH	: Ferroşelataz enzimi
FBS	: Fetal sıgır serumu
FDA	: Food and Drug Administration
FS	: Fotosensitizer
HpD	: Hematoporfirin Türevleri
LED	: IşıkYayan Diyot
HSK	: Hepatosellüler Karsinom
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PpIX	: Protoporfirin IX
PRM	: Pulse Mod
PSM	: Prostata Özgü Antijen
Rpm	: Dakikada Dönüş
ROS	: Reaktif oksijen türleri
WST-1	: Suda çözünür tetrazolyum-1

SİMGELER

cm²	: Santimetrekaare
J	: Joule
MHz	: MegaHertz
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ms	: Milisaniye
mW	: MiliWatt
μL	: Mikrolitre
μs	: Mikrosaniye

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 : Klinikte kullanılan bazı FS'ler ve kullanım alanları	14
Tablo 3.1 : 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin parametreleri (1)	26
Tablo 3.2 : 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin parametreleri (2)	26
Tablo 3.3 : 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin parametreleri (3)	27
Tablo 4.1 : 5-ALA/FDT'e bağlı PC-3 sitotoksite sonuçları (1)	35
Tablo 4.2 : 5-ALA/FDT'e bağlı PC-3 sitotoksite sonuçları (2)	36



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: 2018 yılı Dünya’da prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi	4
Şekil 2.2: Tüm yaş grubundaki erkeklerde en sık görülen kanserlerin bu grup içinde ki yüzde dağılımları	5
Şekil 2.3: FDT’in 1900-1999 yılları arasındaki tarihçesi	11
Şekil 2.4: FDT’nin etki mekanizması. Hedef dokuya FS uygulanır (1) ve ışık FS tarafından absorbe edilir (2) . FS düşük enerjili singlet durumundan uyarılmış duruma geçer (3) . FS, sistemler arası geçiş olarak bilinen ışıktan aldığı enerjiyi moleküler oksijene transfer eder ve böylece (4) yüksek reaktiviteye sahip tekil oksijen ve serbest radikaller meydana gelir (5) Bunun sonunda hedef hücre ölümü gerçekleşir (6)	12
Şekil 2.5: FDT’de Tip 1 ve Tip 2 reaksiyonlarının şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.6: Optik pencere ve ışığın doku içerisinde soğurulması.....	18
Şekil 2.7: FDT sonrasında hücre ölüm mekanizmaları	20
Şekil 3.1: Lazer cihazı	25
Şekil 3.2: WST-1 analizi için 96 kuyucuklu plaka üzerinde uygulamaları	28
Şekil 3.3: WST-1 mitokondriyal dehidrojenaz ile formazon kristaline dönüşümü	29
Şekil 3.4: Annexin-V ile apoptoz/nekroz tayini	30
Şekil 3.5: Optimizasyon çalışmaları ve ana çalışma için belirlenen enerji yoğunlukları ile hücrelere verilen 5 ALA’nın FDT’de (A) WST-1 canlılık analizi ile sitotoksik etkinin değerlendirilmesi ve etkin enerji yoğunlukları belirlenerek PC-3 hücrelerinde (B) AO/EB boyaması yapılarak hücrelerin morfolojik değişimlerinin belirlenmesi ve (C) Annexin V ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi	32
Şekil 4.1 : 1 mM 5-ALA uygulanan PC-3 hücrelerinde intraselüler PpIX miktarı (A) Kontrol grubu ile karşılaştırılarak oluşturulan PC-3 hücrelerinde intraselüler PpIX floresans görüntüleri (B) Kontrol grubu ve 5-ALA uygulanan hücrelerdeki intraselüler PpIX floresans miktarının istatistiksel karşılaştırılması ($p<0.01^{**}$)	33
Şekil 4.2 : Uygulama 1’e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları	35
Şekil 4.3: Uygulama 2’e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları	36
Şekil 4.4: Ana çalışmaya ait PC-3 hücre hattında Annexin-V Apoptoz/Nekroz test sonuçları a) Kontrol b) 15 J/cm ² c) 30 J/cm ² d) 45 J/cm ² e) 60 J/cm ² (B) PC-3 hücrelerinin toplam apoptotik hücre yüzdesinin istatistiksel olarak karşılaştırılması ($p<0.01$)	38

Şekil 4.5: Farklı güç yoğunluklu lazer ışıma sonrasında PC-3 hücrelerinde 5-ALA/FDT'ye bağlı olarak morfolojik değişimlerin AO/EB boyaması (Oklar, DNA fragmentasyonunu ve hücre yapısının bozulmasını göstermektedir). **a)** Kontrol **b)** 15 J/cm² **c)** 30 J/cm² **d)** 45 J/cm² **e)** 60 J/cm² 40



METASTATİK PROSTAT KANSERİNDE 5-ALA’NIN FOTODİNAMİK TEDAVİDE ANTİ-KANSER ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Prostat kanseri, Dünya genelinde erkek nüfusu arasında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Prostat kanseri, prostat bezindeki hücrelerin sinyalizasyonunun bozulması sonucunda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla meydana gelmektedir. Primer prostat kanser hücreleri çoğunlukla androjen yoksunluğu tedavisine duyarlıdır. Ancak, prostat kanserinin ileri evrelerinde hastaların çoğunda metastaz gelişmektedir. Mevcut tedavi seçenekleri arasında yer alan cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi prostat kanserinde sınırlı etkiye sahiptir. Bu nedenle, metastatik prostat kanseri tedavisi için alternatif tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Fotodinamik tedavi (FDT) halihazırda malign kanser türlerinde alternatif tedavi seçeneklerinden biri olarak dikkat çekmektedir.

FDT’de, dokuda akümüle olabilen fotosensitizer (FS) adı verilen ışığa duyarlı ajana, FS’ı uyatabilecek belirli dalga boyunda ışık kaynağına ve ortamda oksijen varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu üç komponentden her birinin tek başına zararı bulunmazken uygun kombinasyonlarla ve koşullarda bir araya geldiklerinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak kanser hücrelerinde hücre ölümüne yol açmaktadır.

Bu çalışmada PC-3 metastatik prostat kanseri hücrelerinde, ışığa duyarlı ajan olarak kullanılan 5-Aminolevulinik asid (5-ALA) temelli FDT’nin anti-kanser etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. 5-ALA’nın dozu, lazer enerji yoğunluğu, hedef dokuda birikme süresi parametreleri araştırılarak, PC-3 hücrelerinde en etkin FDT protokolü belirlenmiştir. Bu kapsamda, 5-ALA/FDT’nin sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile belirlenmiş olup, Annexin V ve akridin oranj / etidyum bromür boyaması hücrelerde neden olduğu apoptotik etki analiz edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda 1 mM 5-ALA’nın 4 saat boyunca inkübe edilmesi ve 60 J/cm² lazer enerji yoğunluğunda gerçekleştirilen FDT sonrasında en iyi sonucu veren parametreler olarak belirlenmiştir. Bu parametreler ile ana çalışmaya geçilmiş ve yapılan analizler sonucunda 60 J/cm² enerji ile uyarılmış FDT grubundaki hücrelerin %32,20’i erken apoptotik ve %3,50’i geç apoptotik olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, 5-ALA temelli FDT’nin PC-3 hücrelerinde %32 oranında apoptoza neden olduğu ilk kez in vitro bir çalışma ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, Fotodinamik Tedavi, 5-ALA, Lazer Işık

DETERMINATION OF THE ANTI-CANCER EFFECT OF 5-ALA IN PHOTODYNAMIC THERAPY IN METASTATIC PROSTATE CANCER

SUMMARY

Prostate cancer is the second most common cause of cancer-related death among men worldwide. Prostate cancer is characterized by excessive cell growth induced by a breakdown in cell signaling in the prostate gland. Primary prostate cancer cells are mostly sensitive to androgen deprivation therapy. However, in the advanced stages of prostate cancer, most patients develop metastases. Surgical intervention, radiotherapy, chemotherapy and hormone therapy, which are among the current treatment options, have limited effects in prostate cancer. As a result, there is a need for innovative therapeutic options for metastatic prostate cancer.

Photodynamic therapy (PDT) is currently attracting attention as one of the alternative treatment options in malignant cancer types.

In PDT, a photosensitive agent called photosensitizer (FS) that can accumulate in the tissue, a light source of a certain wavelength that can stimulate FS, and the presence of oxygen in the environment are needed. While each of these three components is harmless on its own, when combined with appropriate combinations, it creates reactive oxygen species (ROS) and causes cell death in cancer cells.

The goal of this study was to see if 5-Aminolevulinic acid (5-ALA)-based PDT, which is utilized as a photosensitive agent in PC-3 metastatic prostate cancer cells, had an anti-cancer impact. The most effective PDT protocol in PC-3 cells was determined by investigating the parameters of 5-ALA dose, laser energy density, and accumulation time in the target tissue. In this context, WST-1 analysis was conducted to analyze the cytotoxic effect of 5-ALA/FDT, and Annexin V and acridine orange / ethidium bromide staining procedures were used to determine its apoptotic effect on cells. Following the optimization tests, the parameters that gave the best outcomes after PDT were identified to be 1 mM 5-ALA incubation for 4 hours and 60 J/cm² laser energy density. The main investigation was started with these parameters, and the analysis revealed that 32.20% of the cells in the FDT group stimulated with 60 J/cm² energy were determined as early apoptotic and 3.50% as late apoptotic.

In conclusion, it was revealed for the first time in an in vitro investigation that 5-ALA-based FDT causes 32% apoptosis in PC-3 cells.

Keywords: Prostate Cancer, Photodynamic Therapy, 5-ALA, Laser Light

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Prostat kanseri dünya genelinde erkek nüfusu için en önemli sağlık sorunlarından biridir. Avrupa'nın en sık görülen solid tümörü olarak prostat kanseri, akciğer kanseri ve kolorektal kanseri geride bırakmaktadır. Bununla birlikte prostat kanseri erkeklerde en yaygın ikinci ölüm sebebi olarak görülmektedir [1]. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri verilerine göre prostat kanseri, akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık rastlanan kanser türüdür [2].

Prostat kanserinin erkeklerde görülme sıklığı etnik popülasyonlar ve ülkeler arasında büyük farklılık göstermektedir. Bu farklılıklara genetik yatkınlık, ırksal özellikler, beslenme, sigara kullanımı, yaş gibi faktörlerin kombinasyonu sebep olmaktadır [3]. Prostat kanserinin görülme sıklığı yaş arttıkça artmaktadır. Kanserlin görülme sıklığı ve ölüm oranı 50 yaşından sonra büyük oranda artırmaktadır [4].

Öncelikle cerrahi, radyasyon tedavisi ve proton ışın tedavisi prostat kanserinin güncel tedavi yöntemlerindendir. Bu yöntemlere ek olarak kemoterapi, hormonal tedavi, kriyocerrahi tercih edilen tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinin hastanın yaşam kalitesini etkileyen önemli yan etkileri gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle prostat kanserinin tedavisinde alternatif yöntem arayışı sürmektedir [5]. Bu yöntemlerden birisi Fotodinamik Tedavidir. FDT lokalize solid tümörlerin tedavisinde kullanılan minimal invaziv ya da invaziv olmayan bir tedavi yöntemidir. Fotodinamik tedavi uygulamasında, belirli bir dalga boyunda ışığa maruz bırakılarak etkinleştirilen fotosentizere (FS) ve ortamda oksijen varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Tipik süreç lokal veya topikal olarak enjekte edilen FS alımı ile başlamaktadır. Kanserli hücrelerde FS konsantrasyonu sağlıklı hücrelere göre maksimum seviyeye ulaştığında ışık uygulaması gerçekleştirilmektedir [6]. FS'ın verilmesi ile ışık uygulanması arasındaki süreye ilaç-ışık aralığı denmektedir. Optimum ilaç-ışık aralıklarının çoğunlukla tümör ve normal doku arasında maksimum farklılığın olduğu zamanlar olduğu varsayılmaktadır. Ancak optimum ilaç-ışık aralığı hastadan hastaya

veya lezyondan lezyona farklılık göstermektedir. Optimum ilaç-ışık aralığının tamamlanmasının ardından FS belirli dalga boyundaki ışıkla uyarılarak hedef dokuda reaktif oksijen türlerinin (ROS) açığa çıkması beklenmektedir [7]. ROS ortaya çıkması ile kanserli hücrenin hasar görmesi sonucunda hücre apoptoz, nekroz veya otofajiye sürüklenmektedir. FDT’de ayrıca kanser hücrelerini besleyen kan damarlarının duvar bütünlüğü bozularak doku iskemisine yol açmaktadır. Böylece hem ilgili neovaskülatürde hem de yakındaki kanser hücrelerinde nekroz veya apoptoz beklenmektedir [8].

FDT’de öncelikli olarak tercih edilen ışık kaynakları, lazerler, ışık yayan diyotlar (LED’ler) ve lambalardır. Işık kaynağının seçimi, hedef konumuna, kullanılacak FS’a ve iletilecek ışık dozuna bağlıdır. Ayrıca dokunun optik özelliği de tedavi ışığının dağılımını etkilemektedir [9].

Lazer kaynaklarının ortaya çıkışı sayesinde, sayısız uygulama için koherent ışık kullanımı mümkün olmuştur. Fazlar arasındaki sabit ilişkiyi temsil eden lazer ışık kaynaklarının koherent özelliği ve eşit frekanslı (tek renkli) olması rastgele veya değişen faz ilişkisine sahip LED ve lambara göre daha etkin FDT uygulamasının gerçekleştirilebileceği göstermektedir. Koherent ışık kaynaklarının bir diğer avantajları, monokromatiklikleri (belirli FS için dar bantlara hedeflenebilir), yüksek güçleri ve fiberoptik donanım sağlamasıdır [10].

Geleneksel tedavilerle (cerrahi, radyasyon ve kemoterapi) karşılaştırıldığında, FDT’nin lokal olarak uygulanabilmesi, düşük toksisite, ihmal edilebilir sistemik etkiler, ilaç direnç yollarının inhibasyonu, immünolojik yanıtların aktivasyonu ve organ fonksiyonlarını koruyucu etkileri gibi avantajları vardır [11].

Bu çalışmanın amacı, günümüzde dünya genelinde erkekler arasında sıkça görülen prostat kanseri tedavisine yönelik olarak, ışığa duyarlı 5-Aminolevulinik asitin FDT’de etkinliğinin belirlenmesidir. Bu kapsamda PC-3 metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri hücrelerinde 5-ALA’nın 685 nm de ışıma yapan bir lazer cihazı kullanılarak FDT parametrelerinin (ışığa duyarlı ajanın dozu, inkübasyon süresi, ısıtma süresi, ısıtma yoğunluğu, akümülyasyon süresi) in vitro belirlenmesi ve hücrelerde neden olduğu ölümün aydınlatılması amaçlanmaktadır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

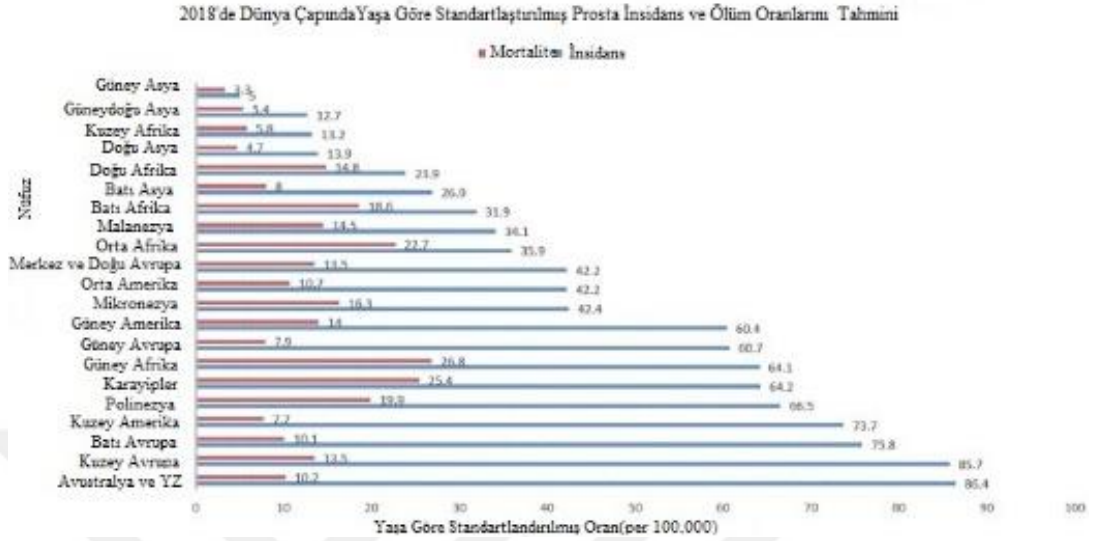
2.1. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, prostat bezinin hücrelerinde sinyal iletiminin bozulması sonucu hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasından kaynaklanır. Prostat kanseri prevalansının dünya genelinde erkekler arasında yaşla birlikte arttığı bilinmektedir. Bununla birlikte, hemen hemen tüm prostat kanseri türleri adenokarsinomdur ve prostat bezindeki prostat sıvısı üreten hücrelerden kaynaklanır. Prostat bezi erkek üreme sisteminin en önemli aksesuar bezi olmasıyla beraber erkek üretrasının ilk bölümünü oluşturan organdır. Erişkin erkeklerde prostat bezi 3 cm yüksekliğinde, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında olup yaklaşık 18-20 gr ağırlığındadır [12].

2.1.1. Prostat kanseri epimiyolojisi ve epidiyolojisi

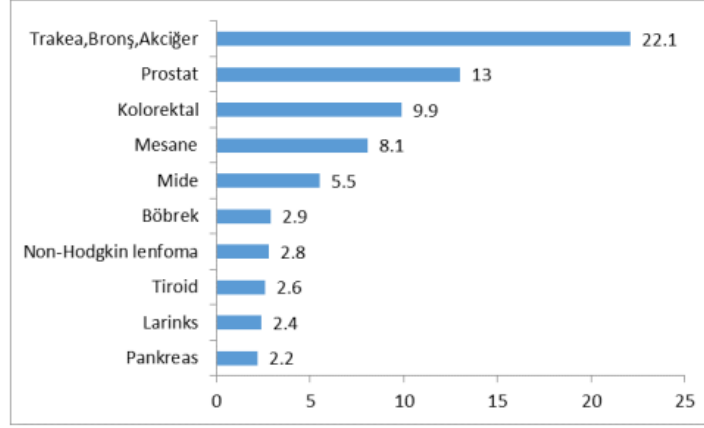
Prostat kanseri, epidemiyolojisi birçok çalışmanın konusu olmakla beraber klinik heterojenliği nedeniyle oldukça karmaşıktır [13]. Prostat kanserinin görülme sıklığının yaşa bağlı olarak artmasının yanı sıra coğrafi bölgeler ve ülkeler de kanserin insidansını ve mortalitesini etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. 2018 prostat kanserinin insidansının Asya ülkelerinde en düşük, Yeni Zellanda, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da en yüksek olduğu Şekil 2.1'de görülmektedir [14]. Ülkeler arasındaki bu farklılıkların nedeni tam olarak bilinmemekle beraber 1990'ların başında PSA (Prostata özgü antijen) testinin artan bulunabilirliği olduğu düşünülmektedir. PSA testi ile hastalığın teşhisi kolaylaşmış ve bu sayede hastalığın insidansında artışlar gözlemlenmiştir [15]. PSA, prostat bezi tarafından üretildiği bilinen bir proteindir. Büyük ölçüde sperm sıvısı içerisine salınan bu proteinin çok küçük bir kısmı kan dolaşımına sızmaktadır. Kanserli hücreler tarafından üretilen PSA seviyesinin sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla olması kandaki PSA seviyesinin artmasına neden olmaktadır. PSA

testi, kandaki bu değişimleri tespit ederek prostat kanseri olgularının erken evrede saptanmasına olanak sağlamaktadır [16] [17].



Şekil 2.1: 2018 yılı Dünya’da prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi [18].

Türkiye’de ilk insidans çalışması 1995-1996 yılları arasında İzmir’de yapılmıştır. Bu çalışmada prostat kanseri, erkekler arasında en yaygın 5. kanser türü olarak belirlenmiştir. 1995-1996 yıllarında prostat kanserinin insidansı 9.1/100.000 olarak tespit edilmiştir [18]. 2008-2009 yılları arasında Üroonkoloji Derneği tarafından 6693 hasta verisi kullanılarak Türkiye’nin çeşitli illerinde gerçekleştirilen epidemolojik çalışmada ise toplam prostat kanseri insidansı 35/100.000 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda bu çalışmada akciğer kanserinden sonra 2.sırada yer alan kanser türünün prostat kanseri olduğu tespit edilmiştir [19]. Sağlık Bakanlığı tarafından 2016 yılında yayınlanan Sağlık İstatistikleri verilerine göre ise, Türkiye’de erkeklerde en sık görülen kanser türlerinin tüm yaş gruplarındaki yüzde dağılımlarında prostat kanseri ikinci en sık görülen kanser türü olmuştur (Şekil 2.2) [20].



Şekil 2.2: Tüm yaş grubundaki erkeklerde en sık görülen kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları [20].

Prostat kanserinin etiyolojisi ile ilgili yapılan birçok çalışmaya rağmen hastalığın kesin nedeni hakkında çok az şey bilinmektedir. Ancak prostat kanserinin epidemiyolojisi göz önüne alındığında, hastalığın görülmesinde hem dış faktörlerin hem de genetik faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. En iyi bilinen risk faktörleri arasında ileri yaş, etnik köken, genetik faktörler ve aile geçmişi yer almaktadır. Prostat kanseriyle pozitif olarak ilişkili diğer risk faktörleri arasında diyet, sigara ve alkol kullanımı yer almaktadır [20].

- **Yaş:** Prostat kanseri yaş ilerledikçe erkeklerde en sık görülen malignitedir. Özellikle 50 yaşın üzerindeki erkeklerde riskin daha yüksek olduğu gözlenmiştir [21]. Yapılan çalışmalarda 40 yaşının altındaki erkeklerde prostat kanserinin görülme sıklığı 1/10.000 iken 40 yaş ve üzerindeki erkeklerde bu oran 1/38'e, 60 yaş ve üzerinde ise 1/15'e kadar artış göstermektedir [22].
- **Etnik Köken:** Prostat kanseri ırk grupları arasında dikkate değer ölçüde orantısız bir dağılıma sahiptir. Bu nedenle farklı ırk grupları arasında yapılan çalışmaların sonucunda Afrika kökenli Amerikalıların prostat kanserine yakalanma oranları Avrupa kökenli bireylere göre iki kat daha fazla belirtilmiştir. Bununla birlikte Asyalı erkeklerde ise bu kanserin görülme sıklığının en düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir [23]. Ancak Asya kökenli Amerikalı bireylerin yerli Asyalılara kıyasla prostat kanseri insidansı belirgin şekilde artmaktadır. Bu da batı yemek kültürünün ön planda olduğu yerlerde yaşayan bireylerin prostat kanserine yakalanma olasılıklarının arttığını göstermektedir. Bu durum prostat kanseri insidansında diyetin de önemli bir rolü olduğunun göstergesidir [24].

- **Diyet:** Batı diyetinin en belirgin özelliklerinden biri yüksek miktarda yağ alımıdır. Uzun yıllardır yapılan çalışmalar kişi başına düşen yağ miktarı ile prostat kanserinin ilişkili olduğunu göstermektedir [25]. Yüksek seviyelerde yağ oranı barındıran Batı diyeti daha fazla androjen ve östrojen üretimini tetiklerken vejeteryan ve Asya diyetleri düşük yağ oranı ve yüksek lif bulundurduğundan bu hormon seviyeleri dolaşımında daha düşük seviyelerdedir. Son zamanlarda epidemiyolojik çalışmalarda omega-3 yönünden zengin ve potansiyel olarak tümör engelleyici yağlı balık tüketimin prostat kanseri riskini azalttığını belirlenmiştir [26]. Ayrıca %80'i domatesten karşılanabilecek olan Likopen'in prostat kanseri riskini %21 oranında azalttığı belirtilmektedir [27]. Diğer yandan, alkol tüketimi ile prostat kanseri riski arasındaki ilişki için yapılan bir dizi çalışmada güçlü bir kanıt bulunamamasına karşın sigara kullanımı prostat kanseri riskini %24 ila %30 oranında arttığı belirtilmektedir [28, 29].
- **Genetik Faktör ve Aile Geçmişi:** Prostat kanserinin görülme sıklığında ailesel geçmiş ve genetik faktörlerin büyük rolü olduğu bilinmektedir. Birinci dereceden akrabaya sahip bireylerde prostat kanserine yakalanma riskinin iki ila üç kat arttığı belirtilirken, üç veya daha fazla prostat kanseri öyküsü olan birinci derece akrabaya sahip bireylerde bu oranın 11 kata kadar çıkmaktadır [30, 31]. Ayrıca genetik faktörün prostat kanseri oluşumunda %42 civarında rol oynadığı ifade edilmektedir [32].

2.1.2. Prostat kanserinin tedavisi

Prostat kanseri tedavi seçimi hastaların hangi risk grubunda olduğuna, hastalığın ilerleme hızına ve PSA düzeyine bağlı olarak belirlenmelidir. Tedavi planlamasında dikkate alınması gereken diğer unsurlar ise hastanın yaşı ve genel sağlık durumudur. Prostat kanseri hastalarının tedavisinde farklı yöntemler klinikte kullanılmaktadır. Ancak uygulanacak tedavilerin her birinin kendine özgü olumlu ve olumsuz yönleri bulunmaktadır [33]. Sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleri arasında gözlem altında tutma, cerrahi yöntemler, hormon tedavisi, radyoterapi ve kemoterapi yer almaktadır.

Gözlem altında tutma yöntemi, tekrar biyopsilerle birlikte PSA seviyesinin yakından izlenmesi esasına dayanır. Test sonuçlarında değişiklik olmadıkça herhangi bir tedavi

uygulanmadan hastanın durumu izlenmektedir. Özellikle belli bir yaşın üstündeki hastalar için tedavinin faydalarından çok olası yan etkileri dikkate alındığında gözlem altında tutma yöntemi önerilebilir. Fakat bu yöntem ileri evre prostat kanseri hastaları için yetersiz kalmaktadır [34].

2.1.2.1. Cerrahi yöntemler

Cerrahi yöntemler, kanserin prostat bezi dışına yayıldığı düşünölmüyorsa ve kanser erken evrelerde ise sık kullanılan bir tedavi yöntemidir. Prostat kanserini için öncelikli ameliyat türü radikal prostatektomidir [35]. Radikal prostatektomi uzun yıllardır hastalığın tedavisinde kullanılan standart yöntemlerden bir tanesidir. Radikal prostatektomi prostatı çevreleyen dokuyu ve seminal vezikülleri içeren çevre dokunun alınmasıdır. Ancak, tümör çevre dokulara sıçramışsa veya uzak metastazlar varsa radikal prostatektomi uygun bir tedavi yöntemi olmaktan çıkmaktadır [36]. Bu yöntem açık radikal prostatektomi, radikal laparoskopik prostatektomi ve robotik prostatektomi olarak uygulanmaktadır. Radikal prostatektomi cerrahi bir yöntem olduğu için alternatif tedavi yöntemlerine kıyasla iyileşme süresi daha uzundur [37]. Ayrıca, radikal prostatektomi ameliyatından sonra hastalarda erektil disfonksiyon, idrar kaçırma ve kasık fıtığı riskinde artış görülmesi de diğer dezavantajlarındanır [38]. Fakat bu tür ameliyatların çoğu artık robotik veya laparoskopik olarak yapılmaktadır. Bununla birlikte, laparoskopik radikal prostatektominin önemli bir dezavantajı yalnızca iki boyutlu bir perspektif sağlıyor olmasıdır [39]. Ayrıca laparoskopik radikal prostatektomide damar yaralanmaları, üreter veya mesane yaralanmalarıyla da karşı karşıya kalınmaktadır [40].

Amerika, Avrupa, Japonya, Moğolistan da dahil olmak üzere Orta Asya'nın bazı kısımlarında ve Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da ve özellikle Mısır HSK'nın önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır [24,27].

2.1.2.2. Radyoterapi

Radyoterapi (ışın tedavisi) sağlıklı dokunun minimum düzeyde hasar görmesini hedefleyerek, kanser hücrelerini öldürmeyi veya bölünüp çoğalmasını engellemek amacıyla kullanılan lokal tedavi yöntemidir. Prostat kanseri tedavisinde sıklıkla

kullanılan radyasyon tedavisinde temel amaç daha az komşu doku hasarı ile hedef dokuda maksimum radyasyon dozuna ulaşmaktır [41]. Ancak, prostat pelvis içinde hareketli olduğundan geleneksel radyasyon tedavisi hedefin yetersiz dozlanmasına ve çevre dokularda hasara yol açmaktadır. Bu sebeple, tedavinin daha etkili gerçekleştirilebilmesi için eksternal radyoterapi ve brakiterapi teknikleri geliştirilmiştir. Eksternal radyoterapide hastaya dış kaynaklı radyasyon verilmektedir [42]. Eksternal radyoterapi, tedavi sonrasında ortaya çıkabilecek yan etkileri en aza indirmek için çevre dokuların maruziyetini azaltmayı ve tümör dokusuna daha yüksek dozajların verilmesini amaçlamaktadır [43]. Ancak, eksternal radyoterapi tedavisinden kaynaklı komplikasyonlarda mevcuttur. Başlıca, uygulanan radyasyonun mesane ve bağırsakta oluşturduğu yan etkiler, artan hematüri riski, erektil disfonksiyon bu komplikasyonlar arasında yer almaktadır [44]. Brakiterapi, küçük radyoaktif çekirdeklerin cerrahi olarak prostat dokusuna yerleştirilmesi ile gerçekleştirilen başka bir radyasyon terapi şeklidir. Bu tedavi yöntemi uygulama şekli olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlar kalıcı brakiterapi ve geçici brakiterapidir. Kalıcı brakiterapi de radyoaktif kaynak tümörün içine veya yakınına yerleştirilirken geçici brakiterapide radyoaktif kaynak uygulanacak doz seviyesine erişildikten sonra vücuttan çıkarılmaktadır [45]. Ancak bu tedavi esnasında uygulanan yüksek doz etkisiyle üriner sistemde yanma hissi ve rektal problemler görülmektedir [46].

2.1.2.3. Hormon tedavisi

Hormon tedavisi, metastatik prostat kanseri olan hastalarda neredeyse evrensel olarak ilk tedavi seçeneği olarak görülmektedir [47]. Prostat kanseri hücreleri çoğalmak için androjene ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle kandaki androjen seviyesinin azaltılması veya hormonun hücrelere etkisinin engellenmesi hormon tedavisinin temelini oluşturmaktadır [48]. Ancak, çoğu hasta bu tedavi sonrasında kanser hücreleri androjen yokluğuna dirençli hale gelerek daha agresif kastrasyon dirençli hale gelmektedir. Bununla birlikte, hormon tedavisinin belirgin yan etkileri de mevcuttur. Başlıca görülen yan etkiler, cinsel isteksizlik, iktidarsız, meme dokusunda büyüme, anemi, osteoporoz (kemik incilmesi) ve yüksek kolesterol olarak karşımıza çıkmaktadır [49]. Ayrıca uzun süreli hormon tedavisi hastalarda kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasını tetikleyebilmektedir [50].

2.1.2.4. Kemoterapi

Katrasyon dirençli prostat kanseri (CRPC), androjen seviyesinin azaltılması ve/veya durdurulması rağmen, PSA seviyesinde sürekli artışın ve yeni metastazların ortaya çıktığı bir metastatik prostat kanser tipi olarak tanımlanmaktadır. Prostat kanserinin bu evresi çok şiddetli semptomlara sebep olduğundan, tedavi yöntemlerinin belirlenmesi ve tedavinin etkinliği açısından oldukça zorlu bir aşama olduğu kabul edilmektedir. Hormon tedavisi sonrası hastalarda katrasyon dirençli prostat kanseri gelişimi kemoterapi yaklaşımlarını gündeme getirmektedir [51, 52]. Son yıllarda gerçekleştirilen pek çok çalışmada geliştirilen kemoterapi ilaçları, kemoterapinin prostat kanseri tedavisinde etkinliğinin arttığını göstermektedir [53]. Özellikle ilerlemiş evrelerde ve metastatik prostat kanserinde daha uzun sağkalım, ağrı ve diğer kanser semptomlarında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Kemoterapi, hormon tedavisine dirençli olan hastalarda veya hormonal tedavi esnasında ilerleme gösteren hastalarda önemli faydalar sağlamaktadır [54]. Ancak, kemoterapi ajanlarının aktivite mekanizmalarının kansere özgü olmayışı ciddi yan etkileri de beraberinde getirmektedir. Özellikle hızlı proliferasyon gerektiren dokuların, kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerine karşı daha hassas olması ve hastaya özgü faktörler de kemoterapinin neden olduğu yan etkilerin artmasına sebep olmaktadır. Bu kapsamda prostat kanserinin tedavisinde yenilikçi terapötik yaklaşımlara ihtiyaç bulunmaktadır [55].

2.2. Fotodinamik Tedavi

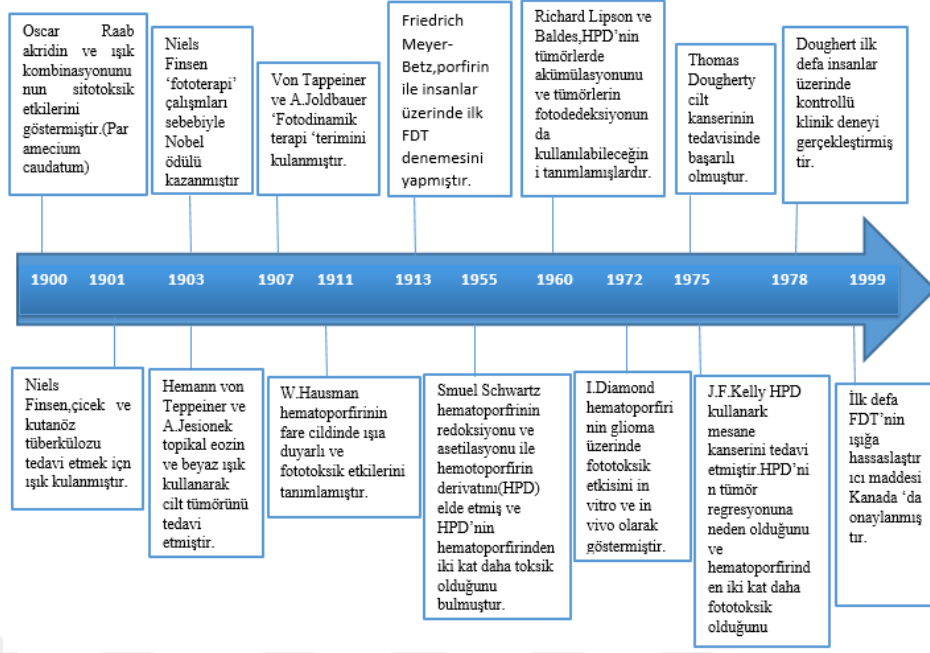
Fotodinamik tedavi (FDT), moleküler oksijenin ve hedef doku tarafından seçici olarak hücre içine alınan ışığa duyarlı maddelerin varlığında ışık aktivasyonunu içermektedir [56]. Işık, Antik Mısır, Hindistan ve Çin'de binlerce yıl öncesinde sedef hastalığı, vitiligo ve cilt kanser gibi çeşitli cilt hastalıklarının yanı sıra raşitizm ve hatta psikoz tedavisinde de kullanılan bir tedavi yöntemidir. Buna rağmen, güneş ışığı tıbbi bir tedavi yöntemi olarak 18. yüzyıla kadar yaygın olarak kullanılmamıştır. 18. ve 19. yüzyıllarda ise Fransa 'da tüberküloz, raşitizm, iskorbüt, romatizma, felç, gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır [57].

FDT, fotokimya, fotofizik, fotobiyoloji içeren bir fototerapi şeklidir [58]. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından klinik olarak onaylanan FDT, neoplastik ve malign (kötü huylu tümör) olmayan hastalıkları tedavi etmekte en etkili tedavi seçeneklerinden birisi haline gelmiştir [59].

Fototerapi bir Danimarkalı Doktor Niels Finsen tarafından 19.yüzyılın sonlarında bir bilim haline getirilmiştir. Finsen, ışık üzerinde deneyler yaparak 1893'te çiçek hastalığının kırmızı ışıkla tedavisinde, püstüllerin iltihaplanmasının önlenebileceğini keşfetmiştir. Daha sonra aktinik ışınların güneş ışığının bakterisidal özelliğinden sorumlu olduğunu bularak lupus vulgaris'in (deri tüberkülozu) ultraviyole ışınları ile tedavi edilmesi için bir yöntem geliştirmesini sağlamıştır. 1903'te çalışmaları Nobel ödülüne layık bulunmuştur [60].

Işığın ve kimyasalların etkileşimi ile uyarılmış hücre ölümü kavramı 100 yıldır bilinmektedir. Bu ilk olarak Münih'te Profesör Herman von Tappeiner ile çalışan Oscar Raab tarafından bildirilmiştir. Bir tıp öğrencisi olan Oscar Raab, floresan boyaların belirli dalga boylarında yoğun ışığa maruz kalmasıyla mikroorganizmalar için öldürücü olabildiğini keşfetmiştir [61].

1913 yılının başlarına gelindiğinde FDT'de en çok kullanılacak olan porfrin Friedrich Meyer- Betz tarafından kullanılmaya başlamıştır. Samuel Schwart, 1955 yılında iki kat daha toksik etkiye sahip olan haematoporfirinin derivatı (HpD) üretmiştir. Diamond ve ark. HpD'nin ilk terapötik etkisinin olabileceğine dair in vitro ve in vivo çalışmaları yapmıştır. Bu çalışmayı takiben, Dougherty HpD'nin cilt kanseri tedavisinde etkili olduğunu 1980 yılında keşfetmiştir. 1987 yılında ise ilk defa FDT'de fotoduyarlı madde olarak kullanılan Photofrinâ (Porfimer Sodyum) FDA tarafından onaylanmıştır. Günümüzde ise FDA onayı almış çeşitli fotoduyarlı maddeler bulunmaktadır [62]. Şekil 2.3'te 1900-1999 yılları arasında FDT'nin gelişim sürecini belirten çizelge bulunmaktadır.



Şekil 2.3: FDT'in 1900-1999 yılları arasındaki tarihçesi [62].

2.2.1. FDT etki mekanizması

FDT, fotosensitizör (FS) adı verilen fotoduyarlı bir ajan varlığında, belirli dalga boyunda ışık uygulamasıyla reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu ve hedef hücrelerin canlılığının son bulmasını sağlayan bir tedavi yöntemidir [63]. Şekil 2.4 'te FDT'in aksiyon mekanizması ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

FDT'nin temel prensibi, bir dizi reaksiyon sonucu ortaya çıkan "öldürme etkisidir". Öldürme etkisinin meydana gelebilmesi için FS, oksijen ve ışık gereken 3 komponenttir. Bu üç komponentin tek başına zararı bulunmazken uygun koşullarda bir araya getirildiklerinde singlet oksijen ve ROS oluşturarak hücre zarında ve/veya organellerde zarara neden olmaktadır [64, 65].

Belirli bir dalga boyunda ve uygun dozda ışık uygulaması ile FS varlığında gerçekleşen birtakım fotokimyasal reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan toksik ürünler, hedef dokuda oksidatif hasar oluşturarak hücre ölümü gerçekleştirmektedir. ROS nükleik asitler, lipidler gibi biyolojik hedeflerin oksidasyonuna neden olarak, hücrelerde apoptoz, nekroz veya otofajiye neden olmaktadır [66].

FDT'nin kalbinde yer alan ışık Emilimi ve enerji transferinin ilk adımı ışık kaynağından gelen foton enerjisinin FS tarafından absorbe edilmesi ile başlamaktadır. FS'ler, en düşük enerji seviyesinde stabil bir elektronik konfigürasyona sahiptirler. Hedef bölgeye uygulanan ışığa duyarlı ilacın ışık enerjisine maruz bırakılmasının ardından bir takım enerji dağılımlarına uğrayarak bunun sonucunda enerji seviyesini yükseltmektedir [65].

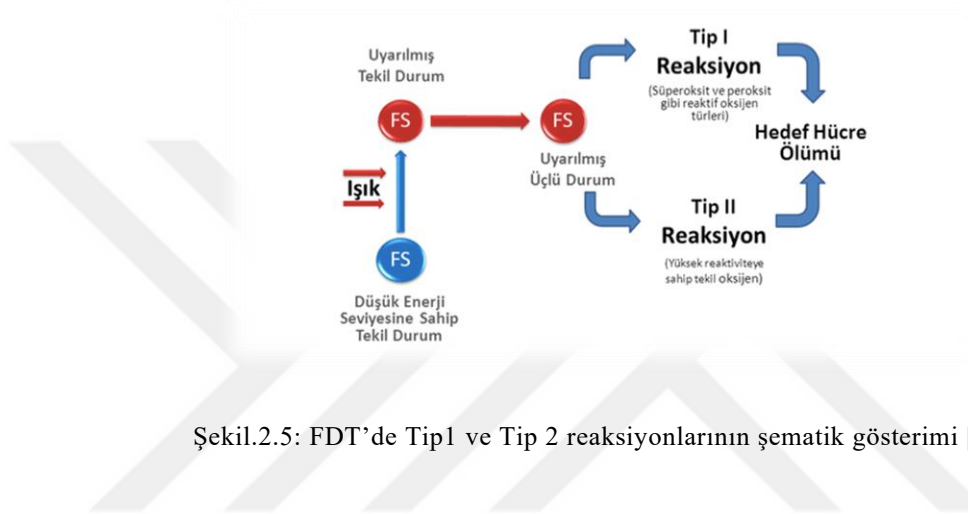


Şekil 2.4: FDT'nin etki mekanizması. Hedef dokuya FS uygulanır (1) ve ışık FS tarafından absorbe edilir (2) FS düşük enerjili singlet durumundan uyarılmış duruma geçer (3). FS, sistemler arası geçiş olarak bilinen ışıktan aldığı enerjiyi moleküler oksijene transfer eder ve böylece (4) yüksek reaktiviteye sahip tekil oksijen ve serbest radikaller meydana gelir. (5) Bunun sonunda hedef hücre ölümü gerçekleşir. (6) [67].

FDT'de fotooksidasyon mekanizması, ışık ile aktif hale getirilen FS'ın temel enerji seviyesinden (FS), birinci enerji (uyarılmış singlet) seviyesine ($^1\text{FS}^*$) geçmesiyle başlar. FS sistemler arası geçiş yaparak daha kararlı bir hal olan üçlü enerji (triplet) seviyesine ($^3\text{FS}^*$) geçer. Uyarılmış triplet haldeki FS, enerjisini hücre zarı, molekül gibi bir substrata transfer edip yeniden temel enerji seviyesine dönebilmektedir. Böylece yeni bir foton absorblamak için hazır hale gelmiş olur. FDT de gerçekleşen iki tip reaksiyon bulunmaktadır. Bu reaksiyonlardan birisi olan Tip 1 reaksiyonunda, FS bir substrat ile doğrudan reaksiyona girerek serbest radikaller oluşturmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda reaktif serbest radikaller, peroksit ve süperoksit gibi serbest radikaller oluşmaktadır. FDT de gerçekleşen bir diğer reaksiyon Tip 2 reaksiyonudur. Tip 2 reaksiyonunda FS üçlü enerji seviyesine ulaştıktan sonra temel enerji seviyesine dönebilmek için enerjisini moleküler oksijene transfer eder ve oldukça

reaktif olan singlet oksijen (1O_2) meydana gelir. Şekil 2.5'te FS'lerin fotokimyasal reaksiyon tipleri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Tip 1 reaksiyonu sonucu oluşan radikaller biyolojik sistemlerde tek başına oksidatif hasar oluşturmamaktadır. Ancak, Tip 2 reaksiyonu sonucu ortaya çıkan singlet oksijen birçok biyolojik yapıda hücre tahribatı gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte, hem Tip 1 reaksiyonun hem de Tip 2 reaksiyonunun gerçekleşmesi için ortamda yeterli miktarda oksijen bulunması gerekmektedir [66, 67, 68].



2.2.2. FDT'de fotoduyarlı maddeler

FDT için en önemli unsurlardan birisi belirli dalga boyunda ışık ile aktifleşen FS'lerin varlığıdır. FS molekülleri, yapısal olarak temel halde, zıt yönde 2 elektrona sahiptir. Uygun absorpsiyon, bu elektronlardan birinin daha yüksek enerjili bir yörüngeye uyarılmasına sebep olmaktadır. Ancak, bu singlet uyarılmış haldeki FS'ler çok kararsızdır ve enerjisini floresans veya ısı olarak kaybetmektedir. Bununla birlikte sistemler arası geçiş yaparak daha kararlı bir hal olan triplet hale geçebilir. Bu safhada daha uzun kalarak enerjisini oksijene transfer etmektedir. Böylece, FDT'de ideal olarak kabul edilen singlet oksijen oluşumuna yol açmaktadır [70]. Kanser tedavisinde kullanılan FS'lerin çoğu tetrapirel omurgasına dayanmaktadır. Tetrapirel omurgaları klorofil, bakteriyoklorofil gibi birkaç önemli biyomekülde doğal olarak bulunmaktadır. Etkili FS'ların dalga boyları 600 ile 800 nm bant aralığında olmalıdır. Dalga boyunun artmasıyla ışığın dokuya nüfus etmesi arttığından bu bant aralığındaki FS'ler daha yüksek emilim göstermektedir. Bu da

maddelerin verimliliğini arttırarak daha çok tercih edilmelerini sağlamaktadır [71]. FDT’de kullanılması onaylanmış FS’ler Tablo 1 de özetlenmiştir [72].

FS’ler üç grup şeklinde sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırma FS’lerin jenerasyonlarına, hedef doku, kimyasal yapıları ve özelliklerine göre yapılmaktadır [73]. İlk olarak tanıtılan ve birinci nesil olarak bilinen FS suda çözünebilen porfirin karışımı olan Hematoporfirindir (HPD). HPD daha sonra porfimer sodyum (Photofrin) adını almıştır. Birinci nesil FS’ler kimyasal olarak modifiye edilmiş hematoporfirin türevleridir. Birinci nesil FS’ler uzun yıllar kullanılmasına rağmen önemli dezavantajları olduğu bilinmektedir. Molar absorpsiyon katsayıların düşük olması sebebiyle daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulması, tümör dokular için seçici özellikte olmamaları ve vücudun fotosensitivitesini artırmaları devantajları arasında yer almaktadır [74]. Bu dezavantajlar ikinci nesil FS’lerin geliştirilmesine yol açan çalışmaları teşvik etmiştir.

İkinci nesil FS’ler daha yüksek absorbansa sahiptir ve daha kısa süreli fotosensitivite sağlarlar [75]. İkinci nesil FS’ler genişletilmiş porfirinler, klorofil türevleri ve boyalar da dahil çeşitli yapılara sahiptir. Tümör hücrelerinde seçici birikim için taşıyıcılara bağlanan ikinci nesil FS’lere üçüncü nesil fotoduyarlı madde denilmektedir. Üçüncü nesil FS’ler birinci ve ikinci neslin nanopartiküller veya antikolar, aminoasitler gibi çeşitli biyomoleküllerle konjuge edilmesiyle geliştirilmiştirler. İkinci ve üçüncü nesil birçok FS ticari değildir. Bu nedenle klinik başarıları öngörülememektedir [76].

Tablo 2.1: Klinikte kullanılan bazı FS’ler ve kullanım alanları [76].

Fotoduyarlı Madde (Kimyasal İsim ve Marka)	Aktifleştikleri Dalga Boyusu(nm)	Uygulama Alanları (Onaylı Ülkeler)
Porfimer Sodyum (Photofrin) (Hematoporfirin türevi olarak da adlandırılır.)	630	Rahim ağzı kanseri (Japonya) Mesane kanseri (Kanada) Yemek borusu kanseri ve displazisi (Kanada, ABD , Japonya) Mide kanse (Japonya) Akciğer kanseri (Kanada, AB, ABD, Japonya)
5-Aminolevulinik asit (ALA) (Levulan)	635	Aktinik keratoz (Kanada, ABD)

Tablo 2.1 (devam): Klinikte kullanılan bazı FS'ler ve kullanım alanları [76].

Fotoduyarlı Madde (Kimyasal İsim ve Marka)	Aktifleştikleri Dalga Boy (nm)	Uygulama Alanları (Onaylı Ülkeler)
Metil ester 5-ALA (Metvix, Metvixia)	635	Aktinik keratoz (Kanada, ABD) Bazal hücreli cilt kanseri (AB)
Meta-tetrahioksifenilklorin (m-THPC) (Foscan)	652	Baş ve boyun kanseri (AB)
Taporfrin sodyum (Talaporfrin), mono-(L)- aspartilklorin-e6 (MACE, Npe6, LS11) (Laserfirin)	664	Akciğer kanseri (Japonya)
Klor e6+polivinipirolidon (Fotolon)	600	Deri, vulva, rahim ağzı kanseri (Rusya)
Klor e6+klor p6 (Fotoditazin)	660	Cilt kanseri (Rusya, G. Kore)
Alüminyum sülfonlu ftalosiyanimler (Fotosense)	675	Yemek borusu, deri, mide, vulva ve meme metastazı (Rusya)

Bunlara ek olarak FS'ların klinikte kullanılabilir olması için sahip olması gereken bazı özellikler şunlardır;

- Seçici olarak tümör hücrelerinde akümüle olabilmelidir. En az birkaç saat hedef dokuda kalabilmeli fakat sağlıklı hücrelerden hızlı atılarak fototoksik etkisi en aza indirilmelidir.
- Karanlıkta toksisitesi olmamalıdır.
- Biyolojik dokularda 650-800 nm dalga boyundaki ışık kaynaklarını absorbe edebilmelidir. FS'ın 800 nm'den daha uzun dalga boyunu absorbe etmesi durumunda düşük miktarda ROS oluşumu meydana gelmektedir.
- Işık kaynağı ile uyarılmasının ardından üretilen singlet oksijen miktarı fazla olmalıdır.
- Sağlıklı dokulardan hızlı temizlenmelidir. Sistemik toksisitesi düşük olmalıdır. Gün ışığına duyarlılığı düşük olmalıdır.
- FS vücut içerisinde biyolojik dağılıma uğramadan hedefe yönelebilmesi için hidrofilik; hedeflenen bölgeye uygun bir şekilde bağlanabilmesi için hidrofobik olması gerekmektedir.

- Ticarileşmiş ve onaylanmış FS'lerin üretimi tekrarlanabilir ve standartlaşmış olmalıdır. FS kolay muhafaza edilebilir ve taşınabilir olmalıdır [71, 77, 78].

2.2.2.1. 5-Aminolevulinik asit

İkinci nesil FS'ler arasında yer alan 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) 1990 yılında keşfedilmiştir. 5-ALA hemoglobin metabolik yolunda üretilen doğal bir ara metabolittir. 5-ALA ve türevleri, aktif FS'ler haline gelebilmek için metabolik olarak Proto-Porfirin IX'e (PpIX) dönüştürülmesi gereken "ön ilaçlar" olarak kabul edilmektedir. 5-ALA'nın PpIX'e dönüşümü mitokondri ve sitoplazma içerisinde bulunan heme biyosentetik enzimleri yoluyla gerçekleşmektedir. Gerek 5-ALA'nın hücre içine alımı gerekse PpIX 'e dönüşü neoplastik hücrelerde normal çevre doku hücrelerine göre daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Hücrede PpIX oluşumundan sonra yaklaşık 410 nm yakın ışıkla uyarıldığında 635 nm'lik dalga boyu kırmızı floresans yaymaktadır. Kırmızı PpIX floresansı, floresans filtreler ile donatılmış cerrahi mikroskoplar kullanılarak tümörlü dokunun normal dokudan daha iyi tanımlanmasına ve ayırt edilmesine imkân sağlamaktadır [72, 79].

2.2.2.2. FS maddelerin hücre içi birikimi

FDT için kanser ve diğer hücreler tarafından FS alımının oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Güvenli ve etkili bir FDT uygulaması için hedef hücreye terapötik konsantrasyonlarda FS gönderilmeli ve bu madde hedef olmayan hücreler tarafından eser miktarda emilmelidir. FS'lerin hedef hücrelerde birikimi, normal hücreler ve tümör hücreleri arasındaki fizyolojik bazı farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Tümör hücrelerinin pH değeri normal hücrelerden daha düşüktür ve bu durum FS'lerin hücre içine alımını arttırmaktadır. Düşük pH değerine, tümör dokularının düşük oksijen miktarı ve yüksek glikolitik aktiviteye sahip olmaları neden olmaktadır. Ayrıca, tümör hücrelerinde artan lipoprotein reseptörü, interstisyel hacminin ve damarlanmanın daha fazla olması diğer farklılıklar arasında yer almaktadır [80, 81].

FDT'nin verimliliğini artırmanın temel unsurlarından birisi FS seçimidir. Her bir FS kendine özgü avantajlara sahip farklı fiziko-kimyasal özelliklerle karakterize edilmiştir. Bu nedenle FS lokalizasyonunu anlamak, daha etkili FDT uygulamaları için önemlidir [70]. İkinci nesil FS'lerin kimyasal olarak saf bileşik olma eğilimleri, hücre içerisinde biriktikleri organelleri belirlemeye olanak sağlamaktadır. FS'lerin hidrofilik özelliklerine bağlı olarak, tümör hücrelerinin mitokondri, lizozom, plazma membranı ve endoplazmik retikulum gibi organellerde birikmesi beklenmektedir [82].

Hidrofobik FS'ler intravenöz olarak uygulandıktan sonra kan dolaşımını içinde dağılarak lipoproteinlerle güçlü bir bağ kurmaktadır. Bu özellikleri sayende tümörlü dokuda yüksek oranda birikebilmektedir. Hidrofobik FS'ler ise tümör hücrelerini doğrudan etkilemektedir.

Lipofilik FS'ler, çok sayıda düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne sahip neoplastik hücrelerde birikme eğilimi göstermektedir. Hücre plazması, mitokondri, endoplazmik retikulum, lizozom gibi tümör hücrelerinin lipofilik bölmeleri, lipofilik FS'lerin bu organlerde birikmesine neden olmaktadır [83, 84].

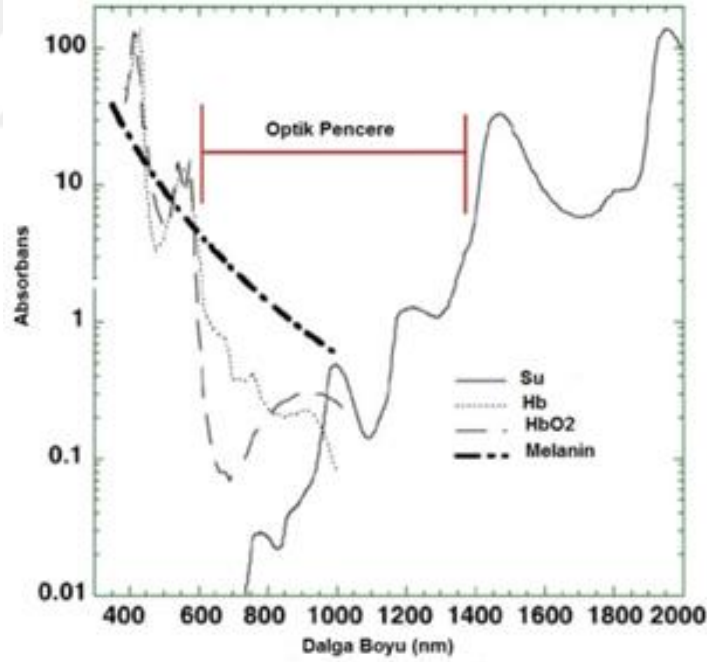
Hidrofilik FS'ler ise intravenöz olarak dolaşıma girdiklerinde büyük ölçüde albümin ve diğer serum proteinleri tarafından taşınmaktadır. Hidrofilik karakterleri nedeniyle, plazma zarından sitoplazmaya geçişleri daha zor olduğundan tümör dokunun interstisyel boşlukları ve vasküler stroma içerisinde birikmektedir. Bu nedenle hidrofilik FS'ler, kan damarlarına verdiği hasar ile oksijen ve/veya besin maddelerinin teminini engellediğinden dolayı hücreyi dolaylı olarak öldürmektedir [85].

2.2.3 Işık kaynakları ve dalga boyu

FDT'nin üç komponentinden biri olan ışık, fotodinamik etkileşimin başlaması açısından büyük önem taşımaktadır. Işığın doku üzerindeki etkisinin bilinmesi FDT'in başarı oranını artıran unsurlardandır. Işığın doku ile etkileşimleri yansıma, saçılma ve absorpsiyon içermektedir. Meydana gelecek olan bu etkileşimler doku türüne ve ışığın dalga boyuna bağlıdır. FDT'de kullanılacak ışık seçilirken, ışığın

uzaysal/zamansal dağılımının ölçülmesi, hedef dokunun absorpsiyon ve saçılma özellikleri dikkate alınmalıdır [86]. Dokuların homojen yapılar olmayışı doku optiğinin önemini ortaya çıkarmaktadır. Turbid (bulanık) dokuda absorpsiyon büyük ölçüde endojen doku kromoforlarından kaynaklanmaktadır. Işığın doku içerisinde absorbe edilmesi nüfuz edeceği derinliği azaltmaktadır [87].

Biyolojik dokularda ışığın dokuya maksimum seviyede nüfuz edebildiği spektruma “optik pencere” denmektedir. Şekil 2.6 ‘da “Optik Pencere” gösterilmiştir. Optik pencere 650 nm ile 1300 nm aralığında yer almaktadır. Işığın optik pencere içerisinde kromoforlar tarafından absorpsiyonu düşüktür. FDT uygulamalarında 650 nm’den daha kısa dalga boylarını kromoforlar absorbe ederken, 1300 nm’den daha uzun dalga boylarını su absorbe etmektedir. FDT uygulamalarında ışık ortalama 650 nm’de 1-3 mm nüfuz ederken, 700-850 nm’de bu değer yaklaşık iki katına çıkmaktadır. Bu sebeple FDT’de, görünür ve yakın kızıl ötesi spektrumda absorpsiyon yapan fotoduyarlı maddeler tercih edilmektedir [88].



Şekil 2.6: Optik pencere ve ışığın doku içerisinde soğurulması [77].

Işık kaynağının seçimi hedef dokunun konumuna, kullanılacak FS'in etkili olduğu spektrum aralığına, ışık kaynağının bakım kolaylığına, maliyet ve boyutuna göre seçilmelidir [8]. Lazerler, ışık yayan diyotlar (LED) ve lambalar FDT’de en sık

kullanılan ışık kaynaklarıdır. Lazerler, yüzeysel ve interstisyel FDT uygulamaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Lazerlerin en büyük avantajı monokromatik (tek renk) ve coherent (uyumlu) olmalarıdır. Bunun yanı sıra, sabit dalga boyunda ve doğrusal ışık yaymaları ışığın odaklanmasını sağladığından fiber optik uygulamalar için avantajlıdır. Odak hassasiyetiyle bağlantılı olarak yüksek güçte monokromatik ışık yayma kapasitesi, küçük lezyonların tedavisine olanak sağlamaktadır. Böylece, çevre dokuya minimum hasarla ve kısa zaman aralığında tedavinin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır [90].

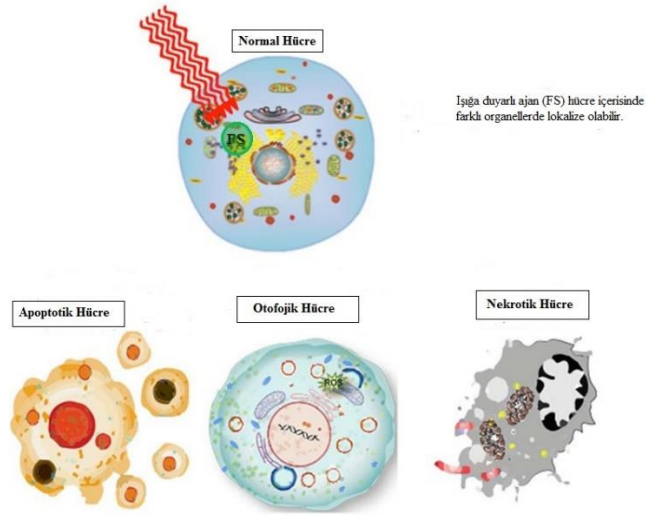
LED'ler ise yarı iletken malzemelerdir. LED'lerden yayılan ışık lazer ışık kaynaklarının aksine geniş bir dalga boyu aralığına sahiptir ve ışık doğrusal yayılmadığı için büyük oranda sapmaya neden olmaktadır. Bu durum, FS'lerin ışığı daha düşük oranda absorbe etmesi ile sonuçlanmaktadır. LED'lerin düşük maliyetli, lazerlere kıyasla daha küçük yapıda ve daha geniş alanda ısıtma yapabilme özellikleri dermatolojik FDT uygulamaları için avantaj sağlamaktadır [87, 90].

Geniş alanda ısıtma yapmak için kullanılan bir diğer ışık kaynağı lambalardır. FDT uygulamaları için; floresan, akkor, metal halojenür, ksenon ark ve sodyum ark tercih edilen lambalardır. Lambalardan üretilen ışık geniş bant spektrumuna (300-1200 nm) sahip olduğundan FS'nin aktivasyon bandıyla eşleştirmek için optik filtreleme yapılması gerekmektedir. Ancak bu durum ışık gücünde kayba sebep olmaktadır [87, 91].

2.2.4. FDT ile Hücre Ölümünün Uyarılması

FDT tedavi sonrasında beklenen hücre ölümü, FS'nin konsantrasyonuna, fizikokimyasal özelliklerine ve hücre altı konumuna, ışığın dalga boyu ve yoğunluğuna, oksijen konsantrasyonuna ve hücrenin spesifik özelliklerine bağlı olarak gerçekleşmektedir [92].

FDT tedavi uygulamalarında FS'in aktive olması sonucu oluşan ROS genellikle protein ve lipidler olmak üzere diğer moleküllerle reaksiyona girmektedir. Reaksiyon sonucunda apoptoz, nekroz, otofaji gibi ölüm yollarının aktivitesine neden olmaktadır [93]. Hücre ölümleri Şekil 2.7 'de görsel olarak verilmiştir.



Şekil 2.7: FDT sonrasında hücre ölüm mekanizmaları [71].

Apoptoz, 1972’de Kerr ve arkadaşları tarafından ilk kez “programlı hücre ölümü” şeklinde tanımlanmıştır. Apoptoz, hücre ölümü ile dokulardaki hücre popülasyon dengesinde rol almaya ek olarak homeostatik dengeyi sürdürmekte de rol almaktadır. Programlı hücre ölümündeki bozulmalar, kanser veya otoimmün hastalıklara sebep olurken aşırı apoptoz kronik dejeneratif hastalıklara neden olmaktadır [94]. FDT uygulamalarında mitokondride lokalize olan FS’lar hücreyi apoptoza süreklemektedir. Mitokondride meydana gelen değişimler ile ölüm reseptörleri uyarılır ve mitokondrinin membranında bulunan sitokrom-c’nin sitoplazmaya salınmasına neden olmaktadır. Sitozol içerisine (hücre içi sıvısı) giren sitokrom-c apoptozom kompleksini oluşturmak için Apaf-1 (apoptozu aktive edici faktör) ve prokaspaz-9’a bağlanmaktadır ve kaspaz-3, 6, 7’in aktifleşmesini sağlamaktadır. Aktive edilmiş kaspazlar hücresel substratları parçalayarak apoptozun karakteristik ve morfolojik değişikliklerine yol açmaktadır. Apoptoz gerçekleşen hücrelerde, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması, hücre küçülmesi, DNA fragmentasyonu mitokondriyal hasar ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi bazı morfolojik değişimler gözlemlenmektedir [95, 96]. FDT sırasında, düşük doz FS konsantrasyonu ve ışık kaynağı kullanılmasının daha fazla apoptoz ile hücre ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir [92, 97].

Nekroz, fiziksel ve/veya kimyasal hasarın neden olduğu ve genellikle programlanmamış hücre ölümü olarak adlandırılmaktadır. Nekrotik hücre ölümü,

sitoplazma şişmesi, organellerin zarar görmesi, plazma zarının parçalanması ve hücre içi içeriklerin dışarı salınması sonucunda hücrel inflamasyonun meydana gelmesiyle karakterizedir [92, 98]. FDT sırasında hücreyi nekroza sürükleyen unsurlar hala araştırma konusudur. Bununla birlikte, aşırı mitokondriyal ROS üretimi, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artış, reseptör etkileşimli protein (RIP1) kinazın aktivasyonu nekrotik hücre ölümüne neden olan unsurlar olarak görülmektedir. Aynı zamanda, FS'lerin hücre membranında birikmesiyle meydana gelen hasar sonucu hücrenin nekroza sürüklendiği de düşünülmektedir. Hücre membranında biriken FS'lerin hücre membran bütünlüğünün bozulmasına ve hücre içi ATP'nin hızla tüketilmesi sonucuyla nekrozun başlaması neden olduğu belirlenmiştir [98] [99]. Tüm bunlara ek olarak yapılan çalışmalar FDT sırasında yüksek FS konsantrasyonu ve yüksek ışık akışının hücrelerde nekrotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir [92, 97].

Otofaji; hasarlı organellerin, yanlış katlanmış veya kümelenmiş proteinlerin lizozomal sistem yoluyla yıkımına neden olmaktadır. Otofajik hücre ölümü, kromatin yoğunlaşmasının olmadan büyük sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterizedir [95, 100]. Otofaji başlangıçta açlığa karşı bir hayatta alma tepkisi olarak tanımlanmasına rağmen FDT gibi toksik uyarılarla tedavi sırasında hücre ölüm mekanizması olarak da görev görmektedir. Apoptotik hücre ölümü gözlenmeyen hücrelerde, hücrenin otofajiye yönlendiği gözlemlenmiştir. Bu durum hücre tipine, uygulanan FS dozu ve uygulanan ışık dozuna bağlı olarak gelişmektedir [101]. Otofajinin FDT ile tedavi edilen hücrelerdeki rolü hala tartışmalı bir konudur. Ancak yapılan çalışmalar, otofaji ve hücre ölümü arasındaki muhtemel ilişkinin ROS oluşumuna dayandığını öne sürmektedir. Otofaji ile hücre yıkımı, ROS'un yüksek reaktivitesi nedeniyle oksidatif olarak hasar görmüş organelleri ve fotokimyasal reaksiyonlar tarafından üretilen kümelenmiş proteinleri uzaklaştırmak için gerçekleşmektedir. Otofaji, FS'lerin mitokondri ve /veya endoplazmik retikulumda birikmesi durumunda optimal dozda uygulanan FDT sırasında korucuyu bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak yüksek doz uygulamalarında hücreyi ölüme sürüklediği gözlemlenmiştir [95, 102].

2.2.5. Prostat kanseri tedavisinde 5-ALA ile yapılan FDT çalışmaları

Yapılan klinik çalışmalarda 5-ALA'nın, tümörlü dokularda yüksek seçiciliğe sahip olması, vücuttan kolay uzaklaştırılması, toksik etki yaratmadan tekrar uygulanabilir olması ve tolere edilir fotosensitizasyon özellikleri prostat kanseri tedavisinde uygulanabilir bir FS olmasına sebep olmuştur [103].

1998 yılında Chakrabarti ve arkadaşları üç farklı (PC-3, LNCaP ve TP-2) prostat kanseri hücre hattı üzerinde 5-ALA temelli in vitro FDT uygulaması yapmışlardır. Endojen olarak PpIX'e dönüşerek etki eden 5-ALA'nın görünür ışıkla etkileşimini inceleyerek PC-3 hücre hattında PpIX'un arttığını belirlemişlerdir. Bu kapsamda hedef hücrelerin mitokondrilerinin fonksiyonel ve yapısal özelliklerindeki farklılıkların ve PpIX oluşumunun FDT'nin etkisini değiştirebileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, 5-ALA'nın hücre içine alımı, PpIX oluşumu, oksidatif hasar için mitokondri hassasiyeti, uygulanan ışık yoğunluğu ve mevcut oksijen miktarının FDT'nin etkisini değiştirdiğini ancak bu değişkenleri etkileyen mekanizmaların hala açıklanabilmiş olmadığını ifade etmişlerdir [104].

2003 yılında Sroka ve arkadaşları tarafından in vivo prostat kanseri çalışmasında ise, 50 J/cm² lazer ışıması ile dokuda büyük termal etkiye sebebiyet vermeden nekrotik hücre ölümleri gözlemlenmiştir. Yapılan çalışma, 1995 yılında benzer parametreleri kullanarak Jonhson ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen köpek prostat kanseri üzerinde FDT çalışmasıyla karşılaştırılarak, insan prostat kanseri üzerinde 5-ALA'nın uygulanabileceği öngörülmüştür [105].

2004 yılında Zaak ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir diğer in vivo çalışmada, sıçan prostat kanserinde kullanılan 5-ALA'nın FDT'yi takiben tümörlü dokuda büyük ölçüde tahribata neden olduğu belirtilmiştir. Fakat, hücre hasarlarında gözlemlenen farklılıkların ve farklı ışık dozlarının FDT'de etkinliğinin incelenmesi gerektiğini ortaya çıkarmıştır [106].

BÖLÜM 3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Hücre Hattı ve Kültür Koşulları

3.1.1. Hücre hattı

Çalışmada kullanılan PC-3 (ATCC® CRL-1435™) prostat kanser hücre hattı Amerikan Tür Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak satın alınmıştır.

3.1.2. Hücrelerin kültüre alınması ve saklama koşulları

PC-3 kanser hücreleri sodyum bikarbonat ve L-glutamin ile desteklenen Roswell Park Memorial Institute 1670 (RPMI) besiyerinde %10 fetal sıgır serum (FBS) (Biological Industries, ABD), %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek %5 karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörde 37°C'de çoğaltılmıştır.

Dondurulmuş hücrelerin içinde bulundukları kriyotüpler -80°C'den çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda çözöldü. Kriyotüp içersinde bulunan 1 ml hacmindeki hücreler falkonlara alınarak üzerine 5 ml taze besiyer eklendi. Ardından 1500 rpm'de 5 dakika santriföjlenerak süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler, taze besiyeri içeren flasklara ekildi. Hücrelerin proliferasyonları her gün inverted mikroskop yardımıyla kontrol edilerek besiyerleri yenilendi. Hücreler büyüyüp istenilen morfolojik özellikleri göstermeye başladığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin pasajlanması için; flaks içindeki besiyer uzaklaştırıldıktan sonra besiyer kalıntılarının uzaklatırılması için 1 kez PBS (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile yıkandı. Ardından hücrelerin kaldırılması için Tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek inkübatörde 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon ardından kalkmış olan hücreler besiyer ortamıyla beraber serolojik pipet yardımıyla 15 ml hacimli falkon tüp içersine alındı. Falkon içersine alınan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti taze besiyeri ile süspanse edildi. Yoğunluğa uygun olarak 75 cm²'lik flaska

alındı. Pasajlanan hücreler 37° C 'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra çalışılacak hücrelere ise dondurma işlemi uygulandı. Dondurma işlemi için, hücre peleti 900 µl besiyer ile süspanse edildi ve ependorf tüpler içerisine alındı. Üzerine 100 µl DMSO (Merck Milipore, Almanya) eklenerek önce -20° C'de bekletilip ardından -80° C'de muhafaza edilmiştir.

Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, hücre sayımı gerçekleştirilerek 96 ve 12'lik plakalara ekilip 24 saat inkübe edildi.

3.2. Fotoduyarlı Madde ve Işık Kaynağı

Çalışmada kullanılan fotoduyarlı madde 5-aminolevulinik asit (5- ALA, Sigma, A3785)'dir. Çözücü madde olarak steril su kullanılmıştır. 96 ve 12'lik plakalara ekilen hücrelerin, 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücre ortamı FBS içermeyen DMEM (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile değiştirildi. Hücrelere, 1mM konsantrasyonda taze hazırlanmış 5-ALA verildi ve 4 saat 37°C'de inkübe edildi. Sonrasında her bir kuyucuktan 5-ALA içeren besiyer aspire edildi. Ve FBS içeren taze besiyer verilerek lazer uygulamaları gerçekleştirildi.

Yapılan deneylerde lazer ışık kaynağı kullanıldı. Kullanılan lazer cihazı, Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Biyomedikal Enstrümantasyon Laboratuvarında TÜBİTAK 1005 projesi kapsamında geliştirilmiştir. Bu projede, dört farklı radyasyon modu ile yeni bir Çok Modlu FDT Lazer Sistemi (MPTL) geliştirilmiştir. Daha da önemlisi, hedef dokuya verilen termal hasarı en aza indirmek için açık literatürdeki FDT Lazer sistemleri arasında ilk kez Süper Darbe Modu (SPM) uygulandı. Geliştirilen sistemde, Lazer rezonatörünün hassas akım ve sıcaklık kontrolü ile yüksek optik çıkış kararlılığı sağlanmıştır. MPTL, 0-1500 mW (± 1 mW) aralığında yüksek optik çıkış kararlılığı, 635 nm'de (± 1 nm) yüksek dalga boyu kararlılığı ve tüm radyasyon modlarında yüksek sıcaklık kararlılığı ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) elde edilmiştir.

Her deney öncesinde lazerin çıkış gücü optik güç ölçer (PM100 Thorlabs, Almanya) ile kontrol edilmiştir. Yapılan deneylerde sürekli dalga (CW) modu ve pulse mod

kullanılmıştır. Lazer probu plakaların üstüne en uygun mesafede konumlandırılmıştır. Işınlama sırasında ilgili kuyucuk dışındaki kuyucukların üzeri kapatılmıştır.



Şekil 3.1: Lazer Cihazı

3.3. Fotodinamik Tedavi Uygulama Protokolü

FDT uygulaması optimizasyon çalışması ve ana çalışma olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.4. Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmasında, en etkili ışıma süresi, lazer enerji ve güç yoğunluğu belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma, 2 farklı uygulama gerçekleştirilerek tasarlanmıştır. Tablo 2 ve Tablo 3'te optimizasyon parametreleri verilmiştir.

1. uygulama için; 3 J/cm², 6 J/ cm², 9 J/ cm², 12 J/ cm², 18 J/ cm², 24 J/ cm², 30 J/ cm² olmak üzere yedi farklı lazer ışığı enerjisi uygulamaları yapılmıştır. Cihazın çıkış gücü 30 mW olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, WST-1 (Biovision, ABD) hücre canlılık testi ile değerlendirilmiştir.

1. uygulama parametreleri ile aynı lazer yoğunlukları ile yapılan bir diğer uygulamada lazer cihazının pulse modu (PRM) seçilerek gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar WST-1 hücre canlılık testi ile değerlendirilmiştir.

Optimizasyon çalışması için hücreler, FBS içermeyen DMEM ortamında 1mM 5-ALA ile 4 saat inkübe edildi. Ardından her bir kuyucuğa FBS içeren taze besiyer verilerek belirlenen lazer enerji değerleri ile hücreler uyarıldı. Kontrol grubu hücrelerinin ışımadan etkilenmesini engellemek için üzeri kapatılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda her bir kuyucuğa WST-1 solüsyonu eklendi ve 45 dakika 37 C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Kontrol grubu aynı ortamda inkübe edilmiştir.

Tablo 3.1: 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin parametreleri (1).

Dalga Boyu(nm)	635±3 nm
Mod	CW
Güç Çıkışı	30 Mw
Maruz Kalma Süresi(s)	100,200,300,400,600,800,1000
Enerji Yoğunluğu (j/cm²)	3,6,9,12,18,24,30
Fotosensitizör	5-ALA

Tablo 3.2: 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin parametreleri (2).

Dalga Boyu(nm)	635±3 nm
Mod	PRM
Güç Çıkışı	30 mW
Maruz Kalma Süresi(s)	200,400,600,800,1200,1600,2000
Enerji Yoğunluğu (j/cm²)	3,6,9,12,18,24,30
Fotosensitizör	5-ALA

2. uygulama için; 30 J/ cm², 45 J/ cm², 60 J/ cm², 90 J/ cm² olmak üzere dört farklı lazer ışığı enerjisi uygulamaları yapılmıştır. Cihazın çıkış gücü 50 mW olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, WST-1 hücre canlılık testi ile değerlendirilmiştir.

Optimizasyon çalışması için hücreler, FBS'siz ortamda 1mM 5-ALA ile 4 saat inkübe edildi. Ardından her bir kuyucuğa FBS içeren taze besiyer verilerek belirlenen lazer enerji değerleri ile hücreler uyarıldı. Kontrol grubu hücrelerinin ışımadan etkilenmesini engellemek için üzeri kapatılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda her bir kuyucuğa WST-1 solüsyonu eklendi ve 45 dakika 37 C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Kontrol grubu aynı ortamda inkübe edilmiştir.

Tablo 3.3: 5-ALA tabanlı FDT deneylerinin parametreleri (3).

Dalga Boyu (nm)	635±3 nm
Mod	CW
Güç Çıkışı	50 mW
Maruz Kalma Süresi(s)	600,900,1200,1800
Enerji Yoğunluğu(J/cm²)	30,45,60,90
Fotosensitizör	5-ALA

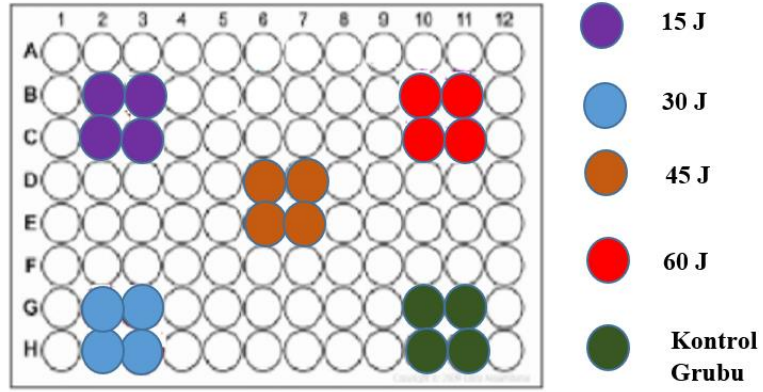
Deney sonunda yapılan WST-1 hücre canlılık testi sonuçlarına göre ana çalışma parametreleri belirlenmiştir.

3.4.1. Ana çalışma

Ana çalışmada, WST-1 hücre canlılık testi sonuçları değerlendirilerek optimizasyonu yapılan ışınma süresi, lazer enerji ve güç yoğunluğu ile FDT uygulamaları yapılarak hücre ölüm şekilleri araştırılmıştır. Annexin V ile Akridin Oranj/Etidyum Bromür metotları kullanılarak ana çalışma etkinliği değerlendirilmiştir. Uygulama için belirlenen gruplar aşağıdaki gibidir.

- 1.Kontrol Grubu: Yalnızca hücre,5-ALA ve lazer uygulanmamıştır.
- 2.FDT Grubu:5-ALA ve lazer uygulanmıştır. (15 J)
- 3.FDT Grubu: 5-ALA ve lazer uygulanmıştır. (30 J)
- 4.FDT Grubu: 5-ALA ve lazer uygulanmıştır. (45 J)
- 5.FDT Grubu: 5-ALA ve lazer uygulanmıştır. (60 J)

Grupların plaka üzerindeki dizaynı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: WST-1 analizi için 96 kuyucuklu plaka üzerinde uygulamaları.

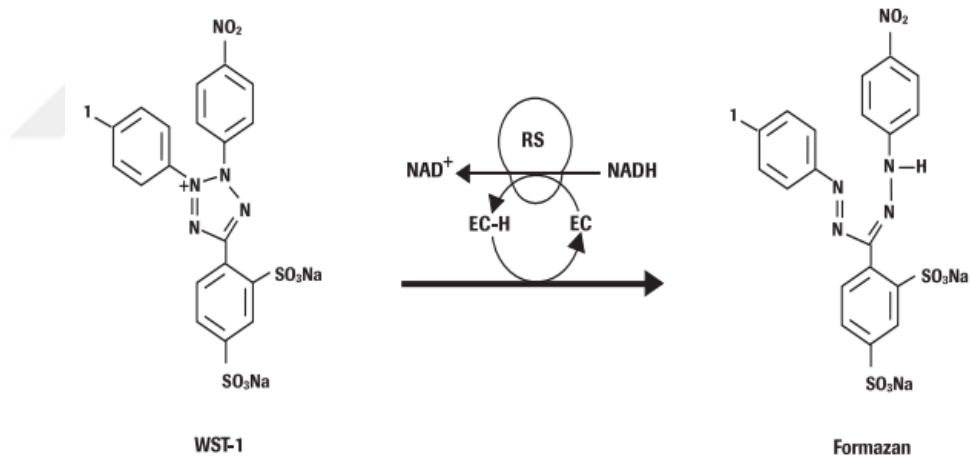
Ana çalışmada hücre hatlarının kültüre alınmasından tedavi sonuna kadar gerçekleştirilen protokol aşağıdaki gibidir;

1. Flakslarda çoğalmaya bırakılan hücrelerin besi ortamları 2 gün ara ile yenilenmiştir. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin ile kaldırılarak hücre sayımı yapılmıştır. 96'lık hücre plakalarına her kuyuda 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonunda tedavide kullanılacak olan 1mM taze 5-ALA çözeltisi hazırlanmıştır. Hücrelere 5-ALA çözeltisi verildikten sonra 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bütün kuyucuklardaki besiyerler mikropipet ile çekilerek taze besiyer verilmiştir.
3. Optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen lazer ışığı enerjisiyle hücreler uyarılmıştır.
4. Işıtma sonrası 24 saat inkübasyon ortamında bekletilen hücrelerin her bir kuyucuğuna WST-1 solüsyonu eklenerek 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin ardından WST-1 analizi yapılmıştır.
5. Uygulamalar bittikten sonra hücre ölüm şekillerinin analiz edilmesi için Annexin V ile Akridin Oranj (Sigma Aldrich, ABD) /Etidyum Bromür (Amresco, ABD) analizleri yapılmıştır.

3.5. Hücre Analizleri

3.5.1. WST-1 hücre canlılık testi

WST-1 canlılık analiz, hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini spektrofotometrik olarak ölçen kolorimetrik bir testtir. Çalışma prensibi, tetrazolyum tuzunun proliferasyona uğrayan hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz enzimi tarafından parçalanarak formazan kristallerine dönüşmesi sonucu oluşan renk değişiminin ELISA ile ya da spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Tetrazolyum tuzunun farmazon kristaline dönüştürülmesi yalnızca metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Metabolik olarak aktif hücre sayısındaki artış, oluşacak farmazon kristallerinin miktarını artırır. Dolayısıyla, farmazon kristallerinin saptanmasıyla canlı/ölü hücre sayısı belirlenebilmektedir. Farmazon kristalleri 420-480 nm dalga boyu aralığında absorbans vermektedir [107].



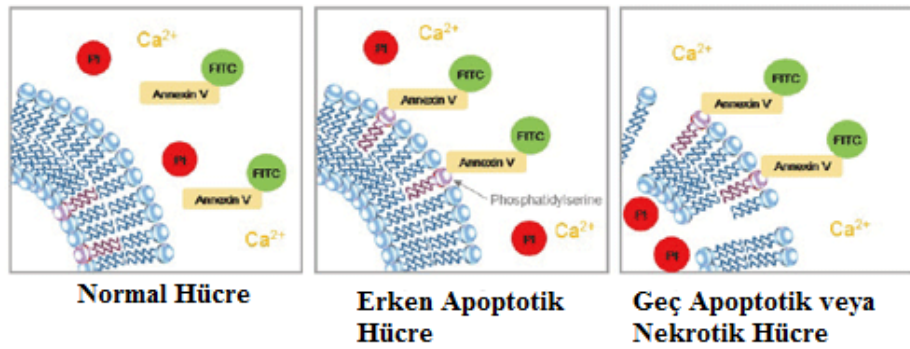
Şekil 3.3: WST-1 mitokondriyal dehidrojenaz ile farmazon kristaline dönüşümü [107].

5-ALA'nın PC-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 kullanılarak belirlenmiştir. WST-1 deneyi için hücreler 96'lık plakalara her kuyucukta 2×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ l besiyeri ile ekilerek 37 C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından hücrelere FBS'siz ortamda 1mM 5-ALA verilerek 4 saat inkübe edildi. Ardından, her bir kuyucuğa FBS içeren taze besiyer verilerek hücreler 15 J/ cm², 30 J/ cm², 45 J/ cm², 60 J/ cm² lazer ışığı enerjisiyle uyarıldı.

10 µl WST-1 solüsyonu 24 saat inkübasyon sonunda her bir kuyucuğa eklendi ve 45 dakika 37 C’de %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ELISA okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. 5-ALA ile muamele edilmeyen kontrol grubunun absorbans ölçümleri %100 canlılık olarak kabul edildi ve diğer grupların absorbans değerleri kontrol grubuna göre belirlendi.

3.5.2. Annexin-V apoptoz/nekroz analizi

Normal fizyolojik şartlar altında sağlıklı hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Hücrelerin apoptoza girmesi durumunda ise sitoplazmanın iç yüzeyine yerleşmiş olan fosfatidilserin hücrenin dış yüzeyine geçiş yapmaktadır. Annexin-V, hücrenin dış yüzeyine geçiş yapan fosfatidilserine bağlanabilen monokloner antikor olduğu için, floresan bir madde olan FITC ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin-V bağlanması görüldüğü için ikinci bir boya olarak propidyum iyodür (PI) kullanılmaktadır. Floresan bir boya olan PI nekrotik hücrelerin zarar görmüş hücre zarından geçer ve nükleik asitlere bağlanarak nekrotik hücreler görünür hale getirilmektedir [108].



Şekil 3.4: Annexin-V ile apoptoz/nekroz tayini [108].

Ana çalışma sonunda PC-3 hücre hattı üzerinde 5-ALA temelli FDT’nin indüklediği apoptotik/nekrotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla Annexin-V analizi yapılmıştır. Annexin-V analizi için, her bir hücre grubu 12 kuyucuklu plakalara ekilerek 1mL

besiyerinde 37 C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre ortamına FBS içermeyen DMEM eklenerek, hücrelere 1mM 5-ALA verildikten sonra 15 J/ cm², 30 J/ cm², 45 J/ cm², 60 J/ cm² enerji yoğunluklu lazer ışımaya maruz bırakılmıştır. 24 saat inkübe edilen hücreler inkübasyon sonrasında tripsin ile kaldırılarak ependorf tüpler içinde 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre peleti PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında pellet PBS ile süspanse edildi ve hücreler Muse[®] Annexin-V & Dead Cell Assay Kit ile 45 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. Boyanan hücreler Muse[®] Cell Analyzer (Merc Millipore, Almanya) cihazında analize edildi.

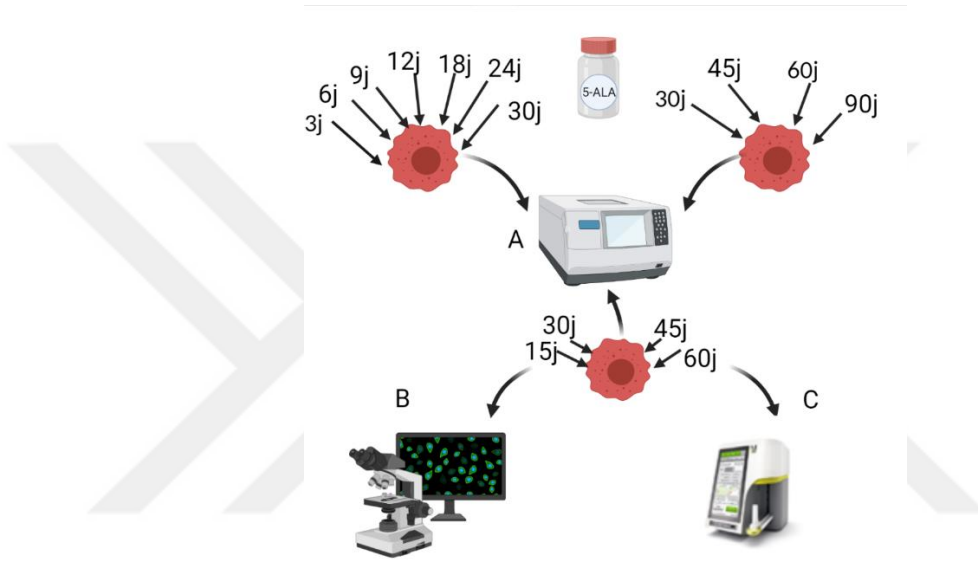
3.5.3. Akridin oranj/Etidyum bromür boyama

Apoptoz süreci sırasında, hücre zarında ve nükleustaki değişiklikleri saptamak için Akridin Oranj (AO) / Etidyum Bromür (EB) boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, apoptotik hücrelerin farklı aşamalarını ayırt etmekte kullanılmaktadır [109]. AO ve EB nükleik asitler ile etkileşime giren floresan boyalardır. AO hem canlı hem de cansız hücreler tarafından absorbe edilen ve çift sarmallı nükleik asit baz çiftleri (DNA) arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu yeşil floresan yayan veya tek sarmallı nükleik asitlere (RNA) bağlanması sonucu kırmızı floresan yayan bir boyadır. EB ise yalnızca cansız hücreler tarafından absorbe edilen ve DNA içerisinde birikerek kırmızı floresan yayan bir boyadır. Dolayısıyla, canlı hücreler ve erken apoptotik hücreler yeşil renk floresan yaymaktadır. Geç apoptotik hücreler de ise EB, AO'a göre daha baskındır ve çekirdekteki yoğunlaşmış kromatinden dolayı hücre turuncu/kırmızı renge boyanmaktadır. Membran bütünlüğü bozulan nekrotik hücreler ise EB ile boyanarak parlak turuncu renge boyanmaktadır [110, 111].

Ana çalışma sonunda PC3 hücre hattı üzerinde 5-ALA temelli FDT'nin indüklediği hücre ölüm şeklinin belirlenmesi amacıyla AO/EB boyaması yapılmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 5×10⁵ hücre olacak şekilde 1 mL besiyeri ile ekildi ve 37 C, %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücre ortamı FBS'siz ortamla değiştirilerek 1mM 5-ALA uygulandı ve 4 saat inkübe edildi. Ardından, 15 J/ cm², 30 J/ cm², 45 J/ cm², 60 J/ cm² enerji yoğunluklu lazer ışımı gerçekleştirildi.

24 saat inkübasyon sonunda her bir kuyuya 1mL %4'lük paraformaldehit eklenerek 30 dakika fikse edildi. Fiksasyon sırasında her kuyu PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Her bir kuyuya AO/EB solüsyonu eklendi ve üzeri kapatılarak 30 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Boyama işleminde sonra kuyular 3 kez PBS ile yıkandı. Boyanan hücreler EVOS Hücre Görüntüleme Sisteminde (Thermo Fisher Scientific, ABD) görüntülendi.

Optimizasyon çalışmasında ve ana çalışmada gerçekleştirilen deneyler Şekil 3.5'te özetlenmiştir.



Şekil 3.5: Optimizasyon çalışmaları ve ana çalışma için belirlenen enerji yoğunlukları ile hücrelere verilen 5-ALA'nın FDT'de (A) WST-1 canlılık analizi ile sitotoksik etkinin değerlendirilmesi ve etkin enerji yoğunlukları belirlenerek PC-3 hücrelerinde (B) AO/EB boyaması yapılarak hücrelerin morfolojik değişimlerinin belirlenmesi ve (C) Annexin V ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi.

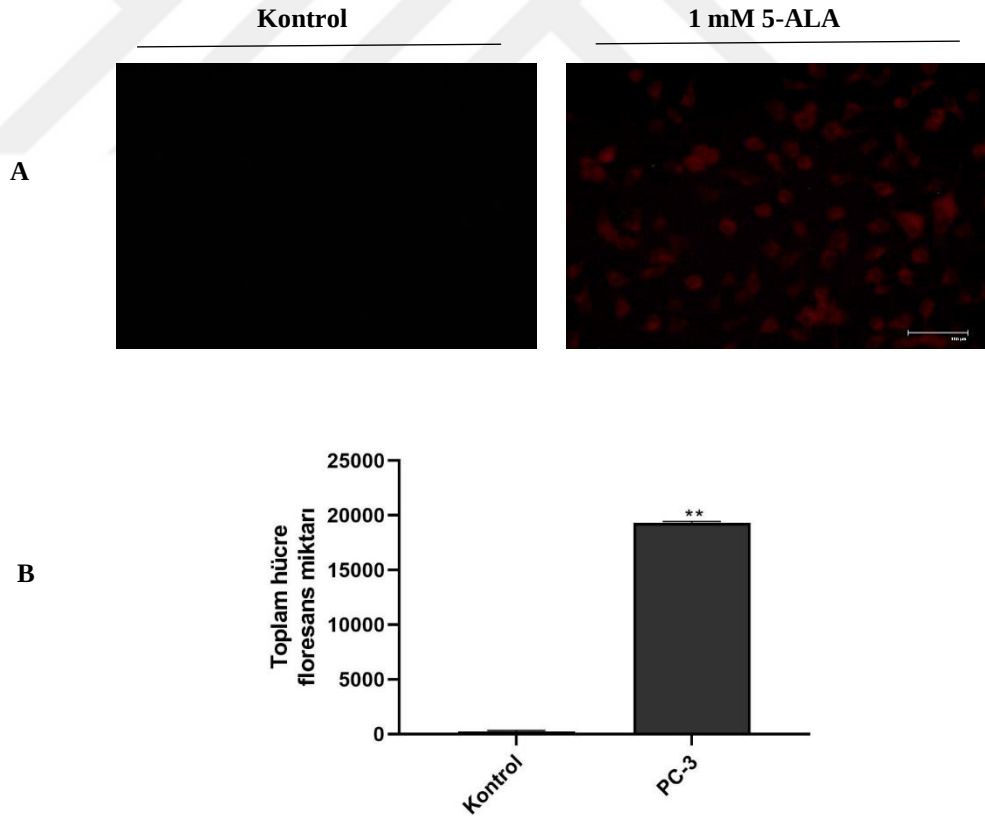
3.6. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatiksel analizi için GraphPad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. Her uygulama içerisindeki gruplar arası farklılıkları belirlemek amacıyla One Way ANOVA Post Hoc Tukey analizi uygulanmıştır. İstatiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

BÖLÜM 4. BULGULAR

4.1. PC-3 Hücre Hattında İntraselüler PpIX Floresans Miktarının Belirlenmesi

Optimizasyon çalışması için PC-3 hücrelerinin 1mM 5-ALA ile 4 saat inkübasyon süresi ardından 628 ± 40 nm kırmızı filtrede intrasellüler PpIX seviyesi belirlenmiş ve Şekil 4.1A'da gösterilmiştir. Şekil 4.1B' de görüldüğü gibi 5-ALA uygulanan PC-3 hücrelerindeki toplam intrasellüler PpIX seviyesi $19322,3\pm132$ olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak, FDT gruplarında 1 mM 5-ALA 'nın 4 saatlik inkübasyon süreci sonrasında kontrol gruplarına göre intraselüler PpIX miktarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.01$).



Şekil 4.1: 1 mM 5-ALA uygulanan PC-3 hücrelerinde intraselüler PpIX miktarı (A) Kontrol grubu ile karşılaştırılarak oluşturulan PC-3 hücrelerinde intraselüler PpIX floresans görüntüleri (B) Kontrol grubu ve 5-ALA uygulanan hücrelerdeki intraselüler PpIX floresans miktarının istatistiksel karşılaştırılması ($p<0.01$ **).

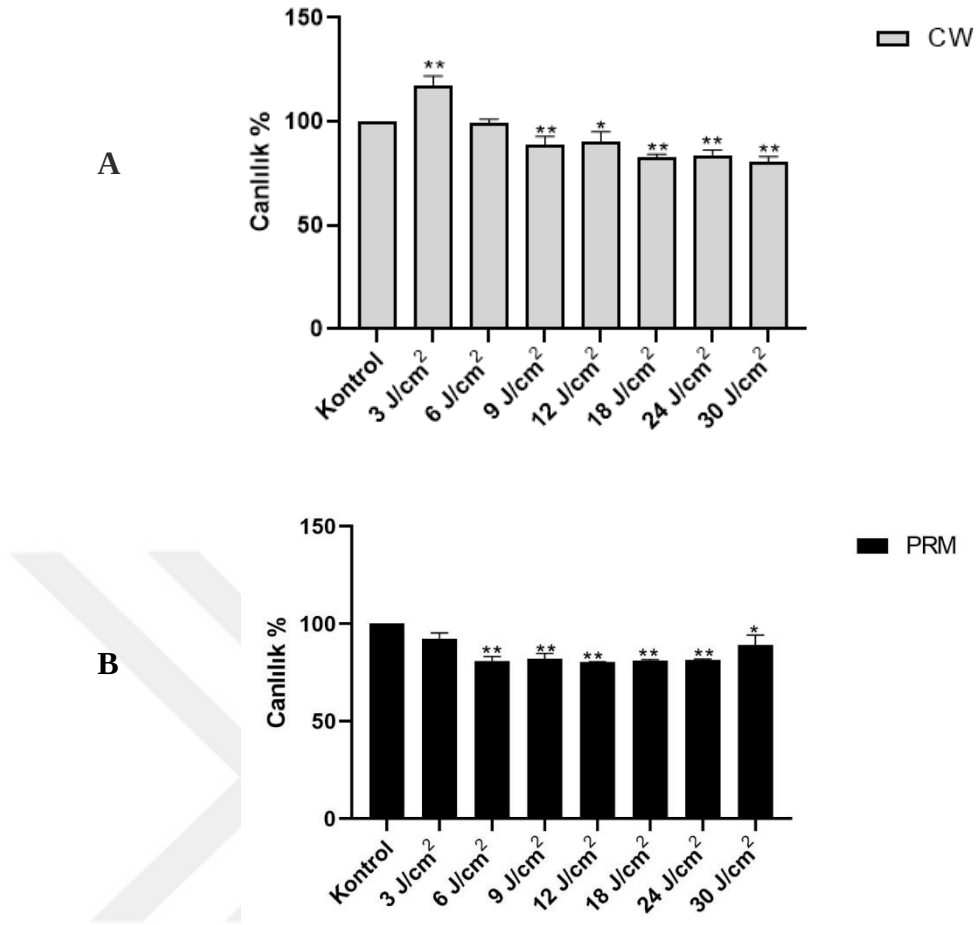
4.2. PC-3 Hücreleri Üzerinde 5-ALA'nın Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

PC-3 hücre hattı üzerinde 5-ALA temelli FDT uygulamaları için 2 farklı optimizasyon çalışması yapılmıştır. Her iki çalışma sonunda WST-1 canlılık analizleri gerçekleştirilerek temel çalışma parametreleri belirlenmiştir.

Uygulama 1 için; PC-3 hücre hattı üzerinde FDT gruplarına 1 mM 5-ALA uygulanmasının ardından 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm², 12 J/cm², 18 J/cm², 24 J/cm², 30 J/cm² enerji yoğunluğunda, 30 mW güç yoğunluğu ile sürekli modda lazer uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre canlılık oranını tespit etmek için WST-1 analizi yapılmıştır.

Uygulanan enerji yoğunluğuna göre lazer ışıması sonrasında hücre canlılığı yüzdeleri 3 J/cm² için %117,7 ±4,2, 6 J/cm² için %99,3±1,9, 9 J/cm² için %89,0±3,8, 12 J/cm² için 90,4 ±4,6, 18 J/cm² için %83,1±1,1, 24 J/cm² için %83,9±2,5, 30 J/cm² için %80,5 ±2,7 olarak tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.2A'da gösterilmiştir (p<0.01).

Yukarıda belirtilen lazer yoğunlukları ile yapılan bir diğer çalışma lazer cihazının pulse modu seçilerek 30 mW güç yoğunluğu ile gerçekleştirilmiştir. 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm², 12 J/cm², 18 J/cm², 24 J/cm², 30 J/cm² ışıma sonrasında 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından hücre canlılıkları sırasıyla; %92,4±2,9, %80,9±2,3, %82,2±2,6, %80,3±0,3, %81,0±0,7, %81,5±0,4, %89,2±5,0 olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.2B'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2: Uygulama 1'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Tablo 4.1: 5-ALA/FDT'e bağlı PC-3 sitotoksite sonuçları (1).

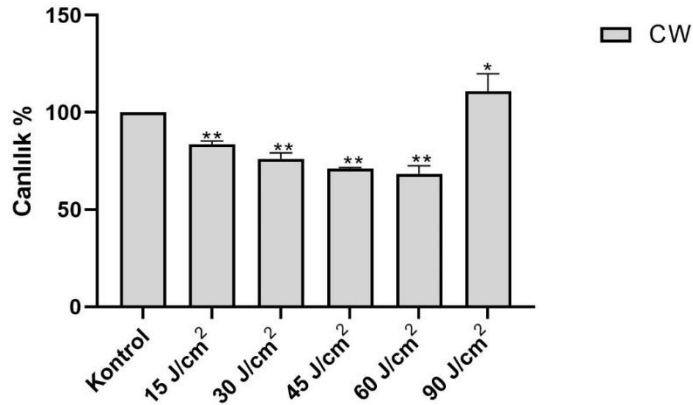
CW	PC-3	PRM	PC-3
Kontrol	%100	Kontrol	%100
3 J/cm ²	%117,7 ±4,2	3 J/cm ²	%92,4±2,9
6 J/cm ²	%99,3±1,9	6 J/cm ²	%80,9±2,3
9 J/cm ²	%89,0±3,8	9 J/cm ²	%82,2±2,6
12 J/cm ²	%90,4 ±4,6	12 J/cm ²	%80,3±0,3
18 J/cm ²	%83,1±1,1	18 J/cm ²	%81,0±0,7
24 J/cm ²	%83,9±2,5	24 J/cm ²	%81,5±0,4
30 J/cm ²	%80,5±2,7	30 J/cm ²	%89,2±5,0

Sonuç olarak, PC-3 hücre hattında lazer ışımasına bağlı olarak 5-ALA 'nın CW modda PRM moduna göre daha anlamlı bir şekilde canlılık oranında azalma olduğu

belirlenmiştir (Tablo 4). Ancak, belirlenen lazer enerji yoğunluğu ve güç yoğunluğunda canlılık oranlarının yüksek olması sebebiyle ikinci bir optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Uygulama 2 için; PC-3 hücre hattı üzerinde FDT gruplarına 1 mM 5-ALA uygulanarak 4 saat boyunca inkübe edilmiş ve ardından 15 J/cm², 30 J/cm², 45 J/cm², 60 J/cm², 90 J/cm² enerji yoğunluğunda, 50 mW güç yoğunluğu ile CW modda lazer uygulanmıştır. Lazer uygulamasının ardından 24 saatlik inkübasyon süresi uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücre canlılık oranını tespit etmek için WST-1 analizi yapılmıştır.

Uygulanan enerji yoğunluğuna ve güç yoğunluğuna göre lazer ışıması sonrasında hücre canlılığı yüzdeleri 15 J/cm² için %83,6 ±41,7, 30 J/cm² için %76,2±3,0, 45 J/cm² için %71,1±0,6, 60 J/cm² için 68,4 ±4,2, 90 J/cm² için %110,9±9,1 olarak tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.3'te gösterilmiştir (p<0.01).



Şekil 4.3: Uygulama 2'e ait WST-1 hücre canlılık testi sonuçları.

Tablo 4.2: 5-ALA/FDT'e bağlı PC-3 sitotoksite sonuçları (2).

CW	PC-3
Kontrol	%100
15 J/cm ²	%83,6 ±41,7
30 J/cm ²	%76,2±3,0
45 J/cm ²	%71,1±0,6
60 J/cm ²	%68,4 ±4,2
90 J/cm ²	%110,9±9,1

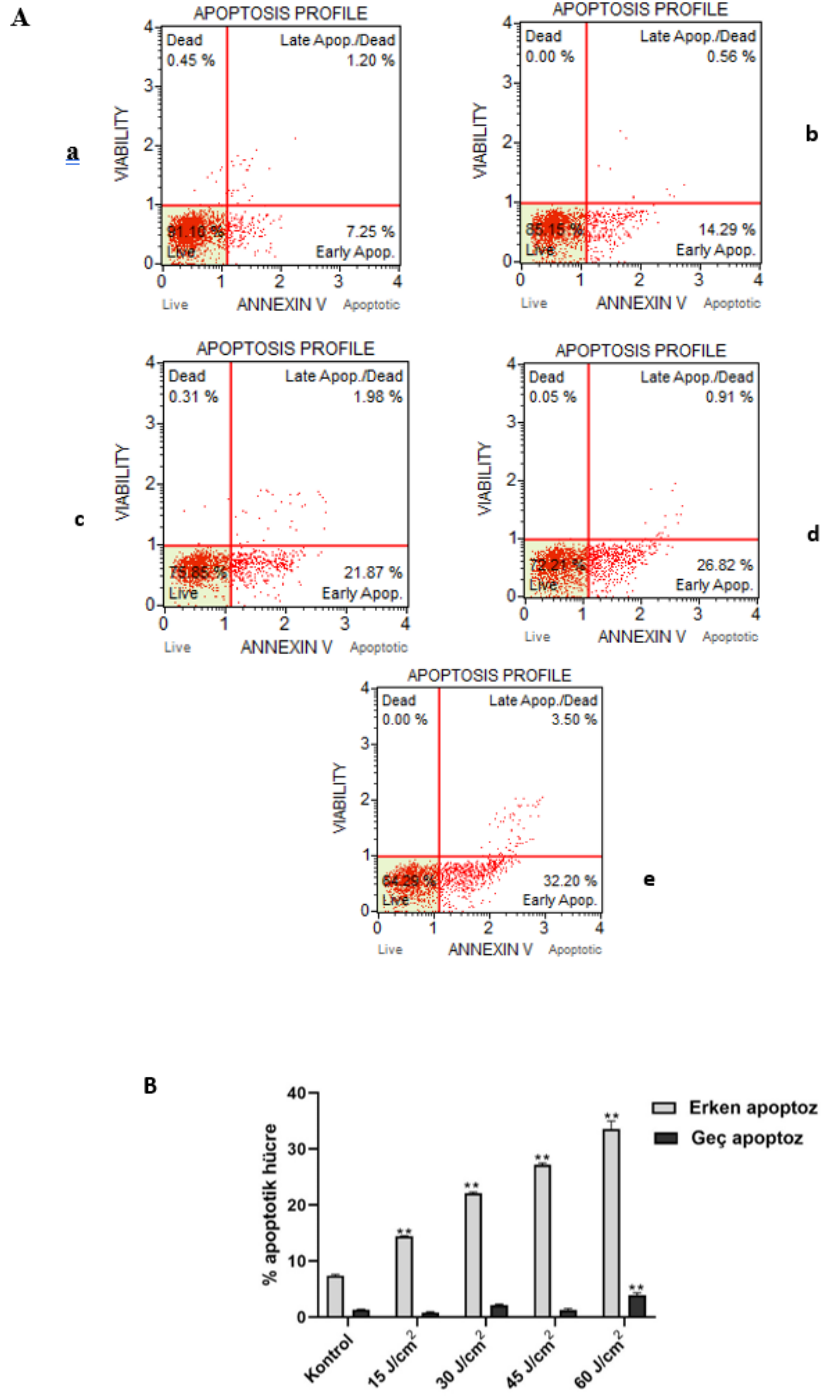
Optimizasyon çalışması sonunda optimum lazer enerji yoğunluğu ve güç yoğunluğu belirlenmiş ve optimum uygulama parametreleri olarak 15 J/cm², 30 J/cm², 45 J/cm², 60 J/cm² enerji yoğunluğu ve 50 mW güç yoğunluğu seçilmiştir.

4.3. Annexin V Analizi ile Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmaları sonrasında belirlenen etkin FDT protokolü doğrultusunda, PC-3 hücrelerine 1 mM 5-ALA uygulanarak 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından FDT grupları 15 J/cm², 30 J/cm², 45 J/cm², 60 J/cm² enerji ile uyarılmıştır. Lazer uygulamalarının ardından sonuçları değerlendirmek için bütün gruplar 24 saat inkübe edilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.4A'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre; kontrol grubu hücrelerinde %7,25'i erken apoptotik ve %1,20'i geç apoptotik ölüm belirlenmiştir. Ayrıca, uygulanan enerji dozuna bağlı olarak hücrelerde apoptotik ölümün istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.,

15 J/cm² enerji ile uyarılmış FDT grubundaki hücrelerin %14,29'i erken apoptotik ve %0,56'i geç apoptotiktir. 30 J/cm² enerji ile uyarılmış FDT grubundaki hücrelerin %21,87'i erken apoptotik ve %1,98'i geç apoptotiktir. 45 J/cm² enerji ile uyarılmış FDT grubundaki hücrelerin %26,82'i erken apoptotik ve %0,91'i geç apoptotiktir. 60 J/cm² enerji ile uyarılmış FDT grubundaki hücrelerin %32,20'i erken apoptotik ve %3,50'i geç apoptotik olarak belirlenmiştir (p<0.01**).

FDT gruplarındaki PC-3 hücre hattında lazer ışıması sonrası apoptotik hücre ölümünün istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiş ve bulgular Şekil 4.4B gösterilmiştir (p<0.01).



Şekil 4.4: Ana çalışmaya ait PC-3 hücre hattında Annexin-V Apoptoz/Nekroz test sonuçları **a)**Kontrol **b)** 15 J/cm² **c)** 30 J/cm² **d)** 45 J/cm² **e)** 60 J/cm² **(B)** PC-3 hücrelerinin toplam apoptotik hücre yüzdesinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (p<0.01).

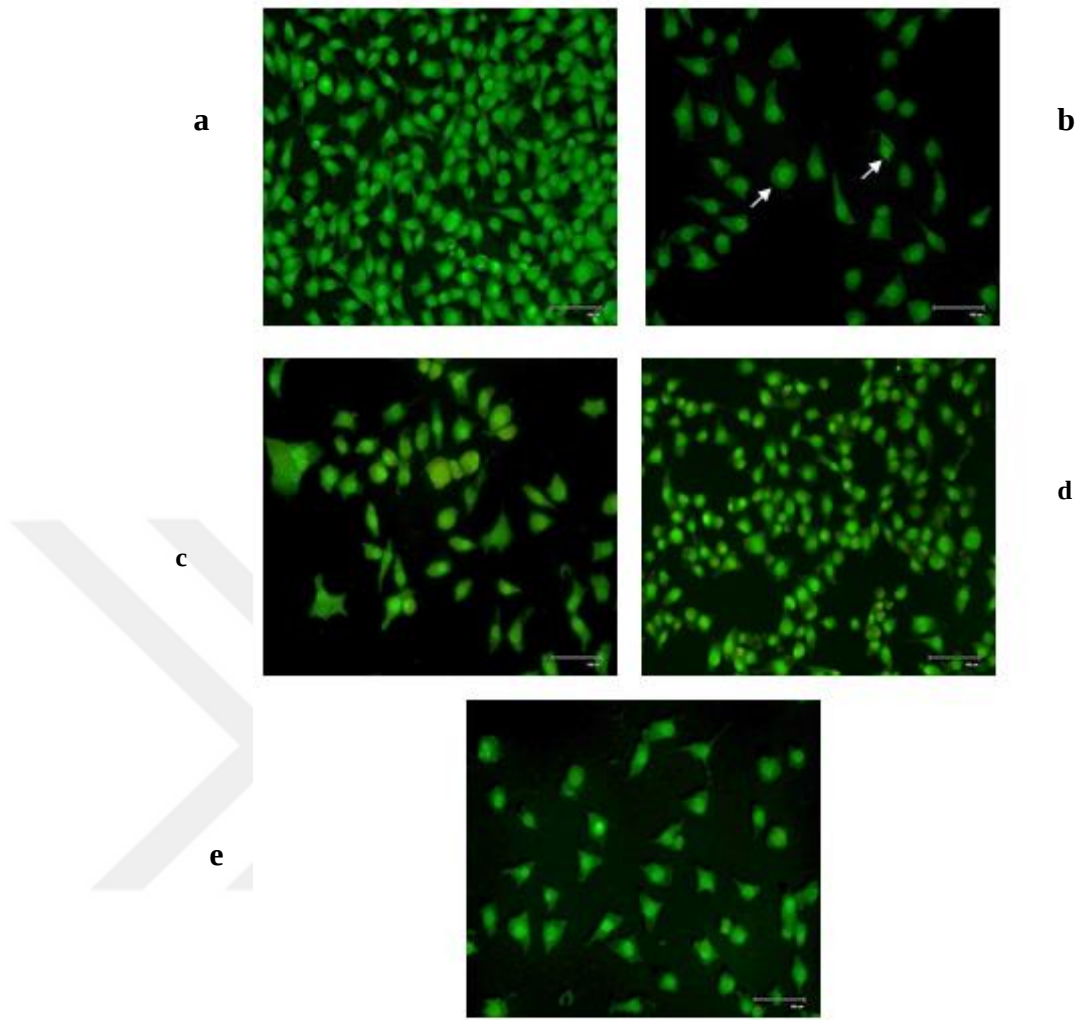
Bu bulgular ışığında, PC-3 hücrelerinde lazer enerji yoğunluğun artmasına bağlı olarak apoptozun arttığı ve en yüksek apoptotik etkinin 60 J/cm² enerji yoğunluğundaki lazer ışımasında olduğu belirlenmiştir.

4.4. Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama Bulguları

Optimizasyon çalışmaları sonrasında belirlenen etkin FDT protokolü doğrultusunda, 5-ALA temelli lazer ışımasının PC-3 hücrelerindeki morfolojik etkisi AO/EB boyama yöntemi ile belirlenmiş ve bulgular Şekil 4.5’ de gösterilmiştir.

FDT gruplarının 1 mM 5-ALA uygulanmasının ardından 15 J/cm², 30 J/cm², 45 J/cm², 60 J/cm² enerji yoğunluklu lazer ışıması yapılmış ve uygulamanın ardından sonuçları değerlendirmek için 24 saat inkübe edilmiştir. FDT tedavi grubu hücreleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, hücrelerdeki sitoplazma oranında azalma, kromatin yoğunlaşması, hücre membran bütünlüğünün bozulması, DNA fragmentasyonu ve nükleer parçalanmalarının olduğu görüntülenmiştir.

Bu sonuçlara göre, 5-ALA temelli FDT uygulamasının PC-3 hücrelerinde apoptotik ölüme neden olduğu morfolojik olarak görüntülenmiştir.



Şekil 4.5: Farklı güç yoğunluklu lazer ışıma sonrasında PC3 hücrelerinde 5-ALA/FDT'ye bağlı olarak morfolojik değişimlerin AO/EB boyaması (Oklar, DNA fragmentasyonunu ve hücre yapısının bozulmasını göstermektedir). **a)** Kontrol **b)** 15 J/cm² **c)** 30 J/cm² **d)** 45 J/cm² **e)** 60 J/cm².

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolon ve akciğer kanserine göre ölüm riski daha düşük olan prostat kanseri, yüksek prevalansa sahip bir kanser türüdür. 1941 'de Huggins ve Hugles tarafından keşfedilmesinden bu yana androjen temelli bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. 25 yıl önce bir tarama aracı olarak uygulanmaya başlanan PSA taraması ile prostat kanserinin farkındalığı artmıştır [112]. Primer prostat kanser hücreleri çoğunlukla androjen yoksunluğu tedavisine duyarlıdır. Ancak, androjen yoksunluğu tedavisine rağmen prostat kanserinin ileri evresi olarak katrasyon dirençli prostat kanseri (CRPC) hastaların %50-70'te metastaz gelişmektedir. Ayrıca, CRPC hastalarında çeşitli üriner sorunlar, bel, kalça veya üst uyluk bölgelerinde kalıcı ağrılar gibi semptomlar görülmektedir. Bunun yanısıra kemiğe metastaz gerçekleştiğinde tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır [113].

Prostat kanserinin tedavisinde sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleri; cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisidir. Ancak, mevcut tedavi seçenekleri etkili olmalarına rağmen, hastaların yaşam kalitesinin etkileyen ciddi yan etkiler oluşturabilmektedir. Prostat kanserinin erken evrelerinde prostatın çıkarılması için cerrahi bir müdahale olan prostatektomi uygulanması rağmen inkontinans ve erektil disfonksiyon gibi hastanın yaşam kalitesini bozan rahatsızlıklar gözlemlenmektedir [114]. Hormonal tedavi, ilerlemiş prostat kanseri vakalarında %90'ından fazlasında ilk tercih olarak görülen tedavi yöntemidir. Hormon tedavisinin ileri prostat kanseri üzerindeki etkinliği kabul görmüş olsa da hastalık hormona dirençli prostat kanseri olarak nüks etmektedir. Ayrıca, hormon tedavisinin bilinen diğer yan etkileri arasında kalp rahatsızlıkları, kemik kırıklarının insidansında artış ve cinsel iktidarsızlık yer almaktadır [115]. Prostat kanseri tedavisinde kullanılan diğer bir tedavi yöntemi olan kemoterapinin ise, kullanılan kemotöropatik ajanların plazma membranından geçememesi ve normal hücre içerisinde birikmesiyle sitotoksik etkiye neden olduğu bilinmektedir [116].

Bu nedenle, prostat kanseri tedavisi için farklı tedavi arayışları, tedavinin yararları ve zararları arasındaki denge gözetilerek devam etmektedir. Bu kapsamda FDT diğer yöntemlere kıyasla daha az yan etkisinin olduğu bilinen non-invaziv alternatif bir tedavi seçeneği olarak dikkat çekmektedir.

FDT, dokuda birikebilen ve uygun dalga boyundaki bir ışık ile uyarıldığında aktif hale gelerek singlet oksijen ve ROS üreterek hedef tümör dokuyu tahrip eden ışığa duyarlı ajanların kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. Bu ajanlar oksijen varlığında ışığa maruz kalana kadar farmakolojik olarak inaktiftir.

Onkolojik hastalıkların tedavisinde, FDT’de kullanılan ışığa duyarlı ajanların tek başına toksik etkisinin bulunmaması ve tümörlü dokuda seçici olarak akümüle olması birden fazla lezyonu tedavi etme ve iyileşme sağlanana kadar tedavinin tekrarlanabilmesine imkân vermektedir. Aynı zamanda, FDT’nin uygulama kolaylığı ve hasta üzerinde oluşturduğu ciddi bir kontrendikasyonun olmaması radyoterapi, kemoterapi gibi ışın tedavileri ile beraber olarak uygulanabilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle, FDT büyük ölçüde güvenli bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Fakat, ışığa duyarlı ajanın tümör dokusunda akümüle olması ve ışık ile uyarılma süresinin uzun olması durumunda hasta da meydana gelebilecek cilt hassasiyetleri söz konusudur. Özellikle birinci ve ikinci nesil ışığa duyarlı ajanların kullanımında karşılaşılan bu durum üçüncü nesil ajanların üretilmesi ve doz çalışmaları ile büyük ölçüde azaltılmıştır [117].

FDT’nin lokalize prostat kanseri üzerindeki ilk klinik etkileri 1990 yılında Windahl ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. Bu çalışma iki hasta üzerinde gerçekleştirilmiş ve biri hematoporfirin diğeri Photofrin olmak üzere iki farklı ışığa duyarlı ajan kullanılmıştır. 3 ay sonunda yapılan biyopsi sonuçlarında iki hastada da rezidüel hastalık olmadığı belirlenmiştir [118].

FDT çalışmalarında sıkça kullanılan ve doğal bir aminoasit bileşeni olan 5-ALA’nın yüksek seçiciliğe sahip olması, vücuttan hızla atılabilir (24 saat içinde), kutanöz ışığa duyarlı hale gelmeden iyi tolere edilebilir ve kümülatif toksisite olmadan tekrar tekrar uygulanabilir olması sebebiyle prostat kanseri tedavisinde kullanımına dair klinik ve deneysel araştırmalar sürmektedir [119]. 5-ALA normal hücrelerde tarafından alındığında hem biyosentezlemek için porfirin metabolik yolu izlerken, kanser hücreleri

tarafından alındığında heme'nin öncüsü olan PpIX olarak mitokondride birikmektedir. PpIX fotoaktiviteye sahip olduğundan, ışığın belirli dalga boylarında özellikle kırmızı ışıktaki (600-740 nm) ve yeşil ışıktaki (480-580 nm) ile uyarılması sonucunda ışıma yaparak siglet oksijen gibi sitotoksik ROS üreterek hücre hasarını indüklemektedir [120]. Fakat intraselüler PpIX oluşumu hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle, Zaak ve arkadaşları (2003) tarafından insan prostat kanserinde 5-ALA aracılığıyla intraselüler PpIX oluşumu 5 hasta üzerinde incelenmiş ve etkilerini değerlendirmiştir. Yapılan floresan spektrumunda normal hücrelere göre prostat kanser hücrelerinde PpIX miktarının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 250 J/cm² enerji yoğunluğunda gerçekleştirilen lazer ışığının ardından 6 hafta sonra PSA değerlerinin %70'ten %20'e kadar azaldığı tespit edilmiştir. Fakat, prostat kanserinde FDT'nin tam ve iyileştirici tedavi hedefine ulaşması için ışık iletimi ve dozimetri ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir [121].

Sroka ve arkadaşları (2003) köpek prostat kanserinde 5-ALA ile indüklenen PpIX'in in vivo farmokinetiğini araştırmışlardır. 5-ALA'nın uygulanmasından 0, 5 ve 10 saat sonra üç ayrı zaman diliminde PpIX floresan seviyeleri analiz edilmiştir. Maksimum PpIX floresan yoğunluğunun ise 5-ALA uygulamasından 3-4 saat sonra elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca 5-ALA enjeksiyondan 9 saat sonra ise floresan yoğunluğunun otofloresan seviyesine geri döndüğü belirtilmiştir [122].

Zaak ve arkadaşları (2004) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, R3327 sıçan prostat kanseri modelinde 5-ALA intravenöz olarak uygulanmıştır. Çalışmada, 633 nm dalga boyunda bir diyot lazer kullanılmış ve 100 J/cm² 'lik enerji yoğunluğunda ışıma gerçekleştirilmiştir. FDT'yi takiben gerçekleştirilen histolojik incelemede, %94 oranında hasar olduğu belirlenmiştir [123]. Fakat, Bozzini ve arkadaşları tarafından (2013) R3327-AT2 sıçan tümör modeli üzerinde gerçekleştirilen 5-ALA temelli FDT'de, 5-ALA'nın tümör dokusunda düşük oranlarda birikerek dağılımının heterojen olduğu belirtilmiştir [124]. Belirtilen iki çalışmada bu farklılıklar nedeniyle prostat kanserinde 5-ALA temelli FDT'nin etkinliğinin anlaşılması için daha fazla klinik çalışmanın yapılması gerektiği belirtilmektedir.

Yamamoto ve arkadaşları (2021) 5-ALA temelli FDT'nin insan prostat kanseri üzerinde terapötik etkinliği belirlemek için PC3, 22Pv1, DU145 ve LNCap olmak üzere dört farklı

insan prostat kanseri hatlarında terapötik etkisi araştırılmıştır. Gerçekleştirilen analizler sonucunda PC3 ve LNCaP hücrelerinde yüksek PpIX birikimi, düşük hücre canlılığı gözlemlenirken 22Rv1 ve DU145 hücre hatlarında düşük PpIX birikimi, yüksek hücre canlılığı olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, hücre içi PpIX birikiminin ve 5-ALA temelli FDT yoluyla hücre canlılığının negatif ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışmada 5-ALA'nın FDT ile prostat kanseri hücreleri üzerinde terapötik etkilerinin öngörücü faktörlerini belirlemek amacıyla ilaç direncinde rol alan ABCG2 geninin ekspresyon düzeyinde değişimleri in vivo olarak araştırılmıştır. Beş ila altı haftalık erkek BALB/c farelerinin kanser hücrelerinin belirli bir düzeye kadar gelişim göstermesinin ardından 5-ALA uygulanmış ve 3 saat inkübe edilmiştir. Ardından, 629 nm dalga boyunda, 100 mW güç yoğunluğuna sahip LED cihazı kullanılarak 10 dakika boyunca 60 J/cm² enerji yoğunluğunda ısıtma yapmışlardır. Sonuç olarak, düşük ABCG2 ekspresyonuna sahip prostat kanseri hücrelerinin 5-ALA temelli FDT'ye duyarlı olabileceğini ve yüksek ABCG2 taşıyıcı ekspresyonuna sahip hücrelerde ise tedaviye dirençli olabileceğini belirlemişlerdir [125]. Hagiya ve arkadaşlarının (2012) mide kanseri hücrelerinde ALA-FDT duyarlılığında PEPT1 ve ABCG2'nin ekspresyon düzeylerinde potansiyel etkilerini araştırdığı çalışmada, PEPT ve ABCG2 taşıyıcı ekspresyonunun PpIX üretimi ve fotositotoksisite ile ilişkili olduklarını bulmuşlardır [126]. Bu iki çalışma birbirini destekler niteliktedir ve prostat kanserinde ABCG2 geninin 5-ALA-FDT'nin etkinliği ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ancak, prostat kanserinde 5-ALA'nın neden olduğu ölüm tipinin aydınlatıldığı bir literatür çalışması mevcut değildir. Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında literatürde farklı 5-ALA temelli FDT uygulamaları göz önüne alındığında öncelikle en etkin 5-ALA temelli FDT protokolünün belirlenmesi ve hücrelerde neden olduğu ölüm tipinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Optimizasyon ve ana çalışma olmak üzere iki bölümden oluşan tez çalışmasının ilk aşamasında uygulanacak enerji yoğunluğu, güç yoğunluğu ve maruziyet süresi olmak üzere üç parametrenin 5-ALA temelli FDT etkinliğindeki rolleri araştırılmıştır.

Uygulama 1 için; 1 mM 5-ALA'nın PC3 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm², 12 J/cm², 18 J/cm², 24 J/cm², 30 J/cm² olmak üzere 7 farklı enerji yoğunluğunda ısıtma gerçekleştirilmiş ve 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından WST-1 analizi yapılarak hücre canlılık oranının tespit edilmiştir.

Analiz sonucunda, canlılık oranının artan enerji yoğunluğuna bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir ($p<0.01$).

Uygulama 1 için belirlenen enerji yoğunluğu parametreleri aynı tutularak, lazer cihazının pulse modunda maruziyet süresini de değiştiren diğer bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. 5-ALA uygulanan PC3 hücrelerinde aynı enerji uygulamaları ile ışıma yapıldıktan 24 saat sonra WST-1 analizi ile canlılık oranlarında azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0.01$). Bunun sebebi, hedeflenen bölgedeki oksijen tüketiminin, FDT uygulamasında önemli bir etkiye sahip olmasıdır. Pulse modunda gerçekleştirilen FDT uygulaması ile CW modda gerçekleştirilen FDT uygulamasını karşılaştırılması sonucu lazer kaynağına bağlı olarak sitotoksik etkinin farkı olduğu görülmüştür. CW modda oksijenin hücre ölümünü indükleyen singlet oksijen gibi ROS oluşumu için kullanıldığı bilinmektedir. Aynı mekanizmanın pulse modunda gerçekleştirilen FDT uygulamalarının da temelini oluşturduğu düşünülmektedir. Fakat, Kawauchi ve arkadaşlarının (2004), pulse lazer ve CW modda lazer temelli FDT'in sitotoksikite arasındaki farkları belirlemek için yapmış olduğu çalışmada, pulsatif ışıpta sitotoksik etkinin azalmasının, mevcut fotonların yetersiz kullanımı ile ilişkili olduğunu belirtilmiştir. Yüksek tepe akıcılık hızına sahip pulsatif ışık kullanımında, fotonların sayısı ışınlanan bölgede bulunan FS moleküllerinin sayısını aşarak reaksiyona giremeyen birçok fotona neden olduğu belirlenmiştir [127]. Bu durum etkili toplam ışık dozunun azalmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, düşük ışık dozu nedeniyle oksijen tüketimi baskılanmakta ve yetersiz sitotoksikite gözlemlenmektedir.

Pulse modunda gerçekleştirilen FDT uygulamasının ardından hücre canlılığının en fazla %19,5 oranında azalmasından dolayı CW modda çalışılmasına karar verilmiştir. Ancak, 3 J/cm², 6 J/cm², 9 J/cm², 12 J/cm², 18 J/cm², 24 J/cm², 30 J/cm² olmak üzere 7 farklı enerji yoğunluğunda canlılık oranının en fazla %20 azalmasından dolayı enerji yoğunluğunun arttırılarak 5-ALA'nın etkisinin aydınlatılmasına ikinci bir optimizasyon çalışması ile odaklanılmıştır.

Uygulama 2 için; enerji yoğunlukları 15 J/cm², 30 J/cm², 45 J/cm², 60 J/cm², 90 J/cm² olarak belirlenmiş ve 50 mW güç yoğunluğu ile CW modda 4 saat boyunca 1 mM 5-ALA ile muamele edilen hücrelere lazer uygulanmıştır. Hücre canlılık oranını tespit etmek için 24 saat inkübasyon süresinin ardından WST-1 analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda

hücre canlılığının 90 J/ cm² 'e kadar anlamlı bir şekilde azaldığı, 90 J/ cm² enerji yoğunluğunda ise tekrar proliferasyon gerçekleştiği belirlenmiştir (p<0.01). Yapılan optimizasyon çalışmaları ile hücre canlılığının en fazla %32 oranında azaldığı belirlenmiş ve ana çalışma parametreleri elde edilen WST-1 analizi sonuçlarına göre oluşturulmuştur.

Optimizasyon deneyleri sonucunda ortaya çıkan tüm veriler değerlendirildiğinde en iyi FDT sonuçlarının 15 J/cm², 30 J/cm², 45 J/cm², 60 J/cm² lazer enerji yoğunluğu ile 5-ALA'nın uyarılması sonucunda elde edildiği belirlenmiştir. Annexin V analizi sonuçlarına göre, artan enerji yoğunluğuna bağlı olarak apoptotik ölümün istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (p<0.01**). Sayısal verilere göre, en yüksek apoptotik ölümün 60 J/cm² lazer enerji yoğunluğunda gerçekleştiği saptanmıştır. Annexin V analizinde elde edilen sonuçların morfolojik olarak desteklenmesi için AO/EB boyaması yapılmıştır. 1 mM 5-ALA uygulanan ve 15 J/cm², 30 J/cm², 45 J/cm², 60 J/cm² enerji yoğunluğunda lazer ışması yapılan hücrelerde, sitoplazma oranında azalma, kromatin yoğunlaşması, hücre membran bütünlüğünün bozulması, DNA fragmentasyonu ve nükleer parçalanmalarının olduğu görüntülenmiştir. Sonuç olarak, metastatik katrasyon dirençli PC-3 prostat kanseri hücreleri üzerinde 5-ALA temelli FDT'nin etkisi sayısal ve görsel olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda elde edilen verilerin WST-1 analizinde elde edilen verileri destekler nitelikte olduğu saptanmıştır. Ancak, hücre ölümünü tetikleyen moleküler mekanizmanın aydınlatılması için daha fazla in-vitro ve in-vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan tez çalışmasında ilk kez 5-ALA temelli FDT prostat kanser hücrelerini apoptoza neden olduğu ve yüksek enerji dozlarına bağlı olarak hücre canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, en etkin FDT protokolünde PC-3 hücrelerinde apoptotik ölümün %32 oranında olması katrasyon dirençli metastatik prostat kanseri hücrelerinde 5-ALA temelli FDT'nin tek başına etkin bir tedavi seçeneği oluşturamayacağını göstermektedir. Bu nedenle, FDT'nin etkinliğinin artırılması için metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanları veya hormon tedavi seçenekleri ile kombin tedavide etkinliğinin belirlenmesine yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Yaptığımız çalışmanın protat kanseri tedavisi için literatüre özgün katkı sağlayacağını ve prostat kanserinde gerçekleştirilecek 5-ALA temelli FDT için uygulaması yapılan parametrelerin yapılacak çalışmalar için veri kaynağı olabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Lütje, S. (2014). *Antibody-based imaging of prostate cancer* (Doctoral dissertation). Retrieved from <https://hdl.handle.net/2066/129656>
- [2] Kara F, İlter H, Kesinkiliç B, Türkyilmaz M, Hacıkamiloğlu E, Baran Deniz E., (2018). Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı, Ankara.
- [3] Grönberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, 361(9360), 859–864.
- [4] Pienta, K. J. (1993). Risk Factors for Prostate Cancer. *Annals of Internal Medicine*, 118(10), 793.
- [5] Chen, F. Z., Zhao, X. K. (2013). Prostate cancer: current treatment and prevention strategies. *Iranian Red Crescent Med. J.*, 15(4), 279.
- [6] Algorri, J. F., Ochoa, M., Roldán-Varona, P., Rodríguez-Cobo, L., López-Higuera, J. M. (2021). Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers*, 13, 4447.
- [7] Gunaydin, G., Gedik, M. E., Ayan, S. (2021). Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer—a review of the current clinical status. *Frontiers in Chem*, 608.
- [8] Luksiene, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Med*, 12(39), 1137-1150.
- [9] Allison, R. R., & Moghissi, K. (2013). Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc*, 46 (1): 24–29.
- [10] Algorri Genaro, J. F., Ochoa Gómez, M., Roldán Varona, P., Rodríguez Cobo, L., López Higuera, J. M. (2021). Light technology for efficient and effective photodynamic therapy: A critical review.
- [11] Luo, D., Carter, K. A., Miranda, D., Lovell, J. F. (2017). Chemophototherapy: an emerging treatment option for solid tumors. *Advanced Sci*, 4(1), 1600106.
- [12] Kosova F, Arı, Z., (2011). Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. *Klinik ve Deneyisel Araştırmalar Dergisi*, 2(1): 124-131.
- [13] Lee, D. J., Mallin, K., Graves, A. J., Chang, S. S., Penson, D. F., Resnick, M. J., Barocas, D. A. (2017). Recent changes in prostate cancer screening practices and epidemiology. *The J. Urology*, 198(6), 1230-1240.
- [14] Rawla, P. (2019). Epidemiology of prostate cancer. *J. Onc.*, 10(2), 63.

- [15] Bashir, M. N. (2015). Epidemiology of prostate cancer. *Asian Pacific J Cancer Pre.*, 16(13), 5137-5141.
- [16] Duffy, M. J. (2011). Prostate-specific antigen: does the current evidence support its use in prostate cancer screening. *Annals of Clinical Biochemistry*, 48(4), 310–316.
- [17] Adhyam, M., & Gupta, A. K. (2012). A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian Journal of Surgical Onc.*, 3(2), 120–129.
- [18] Zorlu, F., Eser, S. Y., Fidaner, C. (2004). İzmir ilinde ürogenital kanserlerin insidans hızları. *Üroonkoloji Bülteni*, 1, 2-9.
- [19] <<http://uroonkoloji9.naklenkongre.com/sunumlar/210800.pdf>> erişim tarihi 10.11.2021.
- [20] Schulman, C., Zlotta, A. (2003). Prevention of Prostate Cancer: The Role of Diet. Prostate Cancer: Science and Clinical Practice, 185-191.
- [21] Leitzmann, M. F., Rohrmann, S. (2012). Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol*, 4: 1-11.
- [22] Rentsch CA, Cecchini MG, Thalmann GN. (2009). Loss of inhibition over master pathways of bone mass regulation results in osteosclerotic bone metastases in prostate cancer. *Swiss Medical Weekly*, 139(15-16), 220-225.
- [23] Edward Giovannucci, Jinhee Hur (2020) Racial Differences in Prostate Cancer: Doing Timing of Puberty Play a Role. *British J Cancer*, 349-354.
- [24] Ito K. Prostate cancer in Asian men, 2014, *Nat Rev Urol*. 11, 197–212.
- [25] Peter H Gann Risk Factors for Prostate Cancer *Rev Urol* (2002), 4 (5), 3-10.
- [26] Masip, C. (2014). Prostate cancer epidemiology. *Archivos Urol.*, 67(5), 373-382.
- [27] Giovannucci, E., Rimm, E. B., Wolk, A., Ascherio, A., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C. (1998). Calcium and fructose intake in relation to risk of prostate cancer. *Cancer Resc.*, 58(3), 442-447.
- [28] Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., Timms, B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer: Interdisciplinary International J American Cancer Soc.*, 101(10), 2371-2490.
- [29] Huncharek, M., Haddock, K. S., Reid, R., & Kupelnick, B. (2010). Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American J Pub Health*, 100(4), 693-701.
- [30] Gann, P. H., Ma, J., Catalona, W. J., Stampfer, M. J. (2002). Strategies combining total and percent free prostate specific antigen for detecting prostate cancer: a prospective evaluation. *The J Urol.*, 167(6), 2427-2434.

- [31] Stanford, E. J., Cassidenti, A., Moen, M. D. (2012). Traditional native tissue versus mesh-augmented pelvic organ prolapse repairs: providing an accurate interpretation of current literature. *Int Urol. J*, 23(1), 19-28.
- [32] Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England J Med*, 343(2), 78-85.
- [33] Chen, F. Z., Zhao, X. K. (2013). Prostate cancer: current treatment and prevention strategies. *Iranian Red Crescent Med J*, 15(4), 279.
- [34] Cooperberg MR, Carroll PR, Klotz L. (2011). Active surveillance for prostate cancer: progress and promise. *J Clin Oncol*, 29 (27), 3669-3676.
- [35] <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8796.00.pdf>> erişim tarihi:03.02.2021.
- [36] Stephen W. Leslie , Taylor L. Soon-Sutton , Hussain Sajjad , Larry E. Siref (2021), *Prostate Cancer Surgical Oncol.*, 45.
- [37] Lapor, H. (2005). A review of surgical techniques for radical prostatectomy. *Reviews in urology*, 7(2), 11.
- [38] <https://www.uroloji-laparoskopi.com/prostat-kanseri-tedavisinde-laparoskopik-cerrahi/>> erişim tarihi:11.03.2021.
- [39] Bivalacqua, T. J., Pierorazio, P. M., Su, L. M. (2009). Open, laparoscopic and robotic radical prostatectomy: optimizing the surgical approach. *Surgical Oncol.*, 18(3), 233-241.
- [40] Ahmad, G., Baker, J., Finnerty, J., Phillips, K., Watson, A. (2019). Laparoscopic entry techniques. *Cochrane Database of Systematic Rew.*, (1).
- [41] Martin, N. E., D'Amico, A. V. (2014). Progress and controversies: Radiation therapy for prostate cancer. *CA: A Cancer J. Clin.*, 64(6), 389–407.
- [42] Yilmaz, H., Aksu, G., Dillioglugil, O. (2015). External beam radiotherapy for localized prostate cancer. *Asian J Andrology*, 17(6), 892.
- [43] Das, S., Liu, T., Jani, A. B., Rossi, P., Shelton, J., Shi, Z., Khan, M. K. (2014). Comparison of image-guided radiotherapy technologies for prostate cancer. *American J Clin Oncol.*, 37(6), 616-623.
- [44] Mallick, S., Madan, R., Julka, P. K., & Rath, G. K. (2015). Radiation induced cystitis and proctitis-prediction, assessment and management. *Asian Pacific J Cancer Prevent.*, 16(14), 5589-5594.
- [45] Cosset, J. M., Hannoun-Lévi, J.-M., Peiffert, D., Delannes, M., Pommier, P., Pierrat, N., Chauveinc, L. (2013). Curiethérapie du cancer prostatique par implants permanents. *Radiothérapie*, 17(2), 111–117.

- [46] Dutta, S. W., Alonso, C. E., Libby, B., Showalter, T. N. (2018). Prostate cancer high dose-rate brachytherapy: review of evidence and current perspectives. *Expert Rev Med Devices*, 15(1), 71-79.
- [47] Shelley, M., Harrison, C., Coles, B., Stafforth, J., Wilt, T., Mason, M. (2006). Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cochrane Database of Systematic Rev.*, (4).
- [48] Brawer K M, (2006). Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *Rew. Urol.*, (2): 35-47.
- [49] Ramalingam, S., Ramamurthy, V. P., Njar, V. C. (2017). Dissecting major signaling pathways in prostate cancer development and progression: Mechanisms and novel therapeutic targets. *The J Steroid Biochem and Molecular Bio.*, 166, 16-27.
- [50] Cereda, V., Falbo, P. T., Manna, G., Iannace, A., Menghi, A., Corona, M., Lanzetta, G. (2020). Hormonal prostate cancer therapies and cardiovascular disease: a systematic review. *Heart Failure Reviews*, 1-16.
- [51] Moghadam J F M., Saeed T., Peiravian F. (2018). A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Iran J Pharm Res*, 17, 17-37.
- [52] McKay, R. R., Silver, R., Bhak, R. H., Korves, C., Cheng, M., Appukkuttan, S., Taplin, M.-E. (2020). Treatment of metastatic castration resistant prostate cancer with radium-223: a retrospective study at a US tertiary oncology center. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*.
- [53] Hurwitz, M. (2015). Chemotherapy in Prostate Cancer. *Current Oncol. Rep.*, 17(10).
- [54] Gilligan, T., & Kantoff, P. W. (2002). Chemotherapy for prostate cancer. *Urol.*, 60(3), 94–100.
- [55] Beer T. M., Bubalo J. S. (2001). Complications of chemotherapy for prostate cancer. *Semin Urol Oncol.*, 19(3), 222-30.
- [56] Mahmoud H. Abdel-kader. (2012). The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present in Photodynamic Medicine: From Bench, *Clinic*, 1-21.
- [57] Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5).
- [58] Yi, C., Yu, Z., Ren, Q., Liu, X., Wang, Y., Sun, X., Huang, X. (2020). Fotodinamik terapi için nano ölçekli ZnO tabanlı fotosensitizörler. *Foto Tanı ve Fotodinamik Terapi*, 101694.
- [59] Sun, Y., Zhao, D., Wang, G., Wang, Y., Cao, L., Sun, J., ... & He, Z. (2020). Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges, and future development. *Acta pharmaceutica Sinica B*, 10(8), 1382-1396.

- [60] Daniell, M. D., Hill, J. S. (1991). A history of photodynamic therapy. *Australian and New Zealand J Surg.*, 61(5), 340-348.
- [61] Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2007). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochem and Photobio.*, 74(5), 656-669.
- [62] Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3(5), 380-387.
- [63] Allison, R. R., Moghissi, K. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clinical Endoscopy*, 46(1), 24.
- [64] Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L., Kinsella, T. J. (2000). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(8), 869-880.
- [65] Robertson, C., Evans, D., Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): a hort review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Photochem and Photobio.*, 96(1), 1-8.
- [66] Zuluaga, M., & Lange, N. (2018). Combination of photodynamic therapy with anti-cancer agents. *Current Med. Chem*, 15(17), 1655-1673.
- [67] Soukos, N. S., Goodson, J. M. (2010). Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology*, 55(1), 143-166.
- [68] Konopka, K., Goslinski, T. (2007). Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent. Resc.*, 86(8), 694-707.
- [69] Raghavendra, M., Koregol, A., & Bhola, S. (2009). Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Australian Dent. J.*, 54, 102-109.
- [70] Foote, C. S. (1968). Mechanisms of Photosensitized Oxidation. *Sci.*, 162(3857), 963-970.
- [71] Abrahamse, H., Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.*, 473(4), 347-364.
- [72] Anand, S., Ortel, B. J., Pereira, S. P., Hasan, T., Maytin, E. V. (2012). Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. *Cancer Lett.*, 326(1), 8-16.
- [73] Wilson, B. C., Patterson, M. S. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Physics in Med Biol.*, 53(9), 61-109.
- [74] Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J (2005). Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol*, 52(2): 339-352.
- [75] Ben Mihoub, A., Larue, L., Moussaron, A., Youssef, Z., Colombeau, L., Baros, F., Acherar, S. (2018). Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment. *Mol.*, 23(8), 1936.

- [76] Allison, R. R., Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2), 61–75.
- [77] Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 279–293.
- [78] Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X.-H., Childs, C. J., & Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 27–42.
- [79] Mahmoudi, K., Garvey, K. L., Bouras, A., Cramer, G., Stepp, H., Jesu Raj, J. G., Hadjipanayis, C. G. (2019). 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *J Neuro-Oncol.*, 55-56.
- [80] Juzeniene, A., Peng, Q., Moan, J. (2007). Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci.*, 6(12), 1234.
- [81] Khorsandi K., Hosseinzadeh R., Chamani E. (2020). Molecular interaction and cellular studies on combination photodynamic therapy with rutoside for melanoma A375 cancer cells. *Cancer Cell Int.*
- [82] Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korblik, M., Peng, Q. (1998). Photodynamic Therapy. *JNCI*, 90(12), 889–905.
- [83] Berg, K., Bommer, J. C., Moan, J. (1989). Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies. *Cancer Lett.*, 44(1), 7–15.
- [84] Allison, B., Pritchard, P., & Levy, J. (1994). Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative. *Bri. J Cancer*, 69(5), 833–839.
- [85] Luksiene, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve efficiency treatment. *Med*, 39(12), 1137-1150.
- [86] Kessel, D., Reiners, J. J. (2007). Apoptosis and Autophagy After Mitochondrial or Endoplasmic Reticulum Photodamage. *Photochem and Photobiol.*, 83(5), 1024–1028.
- [87] Alexiades-Armenakas, M. (2006). Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin Dermatol.*, 24(1), 16–25.
- [88] Kim, M. M., Darafsheh, A. (2020). Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol.*
- [89] Wilson, B. C., Jeeves, W. P., Lowe, D. M. (1985). In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem and Photobiol.*, 42(2), 153-162.

- [90] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer J Clin.*, 61(4), 250–281.
- [91] Brancalion, L., Moseley, H. (2002). Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers in Med Sci.*, 17(3), 173–186.
- [92] Bäuml, W. (2001). Chapter 6 Light sources for photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in dermatology. *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diag Dermatol.*, 83–98.
- [93] Güleş Ö, Eren Ü (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008(2), 73-78.
- [94] Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(1), 1-23.
- [95] Kessel, D., Oleinick, N. L. (2010). Photodynamic therapy and cell death pathways. *Humana Press*, Totowa, 35-46.
- [96] Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- [97] Panzarini, E., Inguscio, V., Dini, L. (2011). Overview of cell death mechanisms induced by rose bengal acetate-photodynamic therapy. *Int J Photoenergy*, 70.
- [98] Oleinick, N. L., Morris, R. L., Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol. Sci.*, 1(1), 1-21.
- [99] Nancy L. Oleninick, Rachel L. Morris Irina Belichenko (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol. Sci.*, 1(1), 1–21.
- [100] Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), 2516-2539.
- [101] Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Dif.*, 16(1), 3-11.
- [102] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O. Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer J Clin.*, 61(4), 250–281.
- [103] Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Path.*, 221(1), 3-12.

- [104] Ouyang, G., Xiong, L., Liu, Z., Lam, B., Bui, B., Ma, L., Wen, Y. (2018). Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells. *Photodiag Photodynamic Therapy*, 21, 396-403.
- [105] Chang, S. C., Buonaccorsi, G. A., MacRobert, A. J., & Brown, S. G. (1997). Interstitial photodynamic therapy in the canine prostate with disulfonated aluminum phthalocyanine and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *The Prostate*, 32(2), 89-98.
- [106] Chakrabarti, P., Orihuela, E., Egger, N., Neal Jr, D. E., Gangula, R., Adesokun, A., Motamedi, M. (1998). Delta-aminolevulinic acid-mediated photosensitization of prostate cell lines: Implication for photodynamic therapy of prostate cancer. *The Prostate*, 36(4), 211-218.
- [107] Zaak, Dirk. Photodynamic therapy by means of 5-ALA induced PPIX in human prostate cancer—preliminary results. *Med Laser Application*, 18.1 (2003): 91-95.
- [108] Zaak, D., Sroka, R., Stocker, S., Bise, K., Lein, M., Höppner, M., Hofstetter, A. (2004). Photodynamic therapy of prostate cancer by means of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX—in vivo experiments on the dunning rat tumor model. *Urol. Int.*, 72(3), 196-202.
- [109] Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksiste testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- [110] Liu, K., Liu, P. C., Liu, R., Wu, X. (2015). Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Med Sci*, 21, 15.
- [111] Takahashi, A., Matsumoto, H., Yuki, K., Yasumoto, J. I., Kajiwarra, A., Aoki, M., Ohnishi, T. (2004). High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. *Int J Radiation Oncol., Biol., Physics*, 60(2), 591-597.
- [112] Barqawi, A. B., Krughoff, K. J., Eid, K. (2012). Current challenges in prostate cancer management and the rationale behind targeted focal therapy. *Advances Urol.*, 2012.
- [113] Semenas, J., Allegrucci, C., A Boorjian, S., P Mongan, N., Liao Persson, J. (2012). Overcoming drug resistance and treating advanced prostate cancer. *Current Drug Targets*, 13(10), 1308-1323.
- [114] Stephen Frankel, George Davey Smith, Jenny Donovan, David Neal (2003). *Screening for Prostate Cancer*, 361(9363), 0–1128.
- [115] Namiki, M., Ueno, S., Kitagawa, Y. (2012). Role of hormonal therapy for prostate cancer: perspective from Japanese experiences. *Translational Andrology and Urol.*, 1(3), 160.
- [116] Mahon, K. L., Henshall, S. M., Sutherland, R. L., Horvath, L. G. (2011). Pathways of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer. *Endocrine-related Cancer*, 18(4), 103-123.

- [117] Calin, M. A., Parasca, S. V. (2006). Photodynamic therapy in oncology. *J Optoelectronics and Ad Materials*, 8(3), 1173.
- [118] Kinsella, T. J., Colussi, V. C., Oleinick, N. L., Sibata, C. H. (2001). Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2(6), 917-927.
- [119] Windahl, T., Andersson, S. O., & Lofgren, L. (1990). Photodynamic therapy of localised prostatic cancer. *The Lancet*, 336(8723), 1139.
- [120] Inoue, K. (2017). 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *Int J Urol.*, 24(2), 97-101.
- [121] Probst-Cousin, S., Villagran-Lillo, R., Lahl, R., Bergmann, M., Schmid, K. W., Gullotta, F. (1997). Secretory meningioma: clinical, histologic, and immunohistochemical findings in 31 cases. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 79(10), 2003-2015.
- [124] Zaak, D., Sroka, R., Höppner, M., Khoder, W., Reich, O., Tritschler, S., Hofstetter, A. (2003). Photodynamic therapy by means of 5-ALA induced PPIX in human prostate cancer—preliminary results. *Medical Laser Application*, 18(1), 91-95.
- [125] Sroka, R., Zaak, D., Höppner, M., Muschter, R., Knüchel, R., Perlmutter, A., Hofstetter, A. (2003). In-vivo investigations of photodynamic therapy by means of 5-ALA induced PPIX on canine prostates. *Med Laser Application*, 18(1), 87-90.
- [126] Bozzini, G., Colin, P., Betrouni, N., Maurage, C. A., Leroy, X., Simonin, S., Mordon, S. (2013). Efficiency of 5-ALA mediated photodynamic therapy on hypoxic prostate cancer: a preclinical study on the Dunning R3327-AT2 rat tumor model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(3), 296-303.
- [127] Yamamoto, S., Fukuhara, H., Seki, H., Kawada, C., Nakayama, T., Karashima, T., Inoue, K. (2021). Predictors of therapeutic efficacy of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in human prostate cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 35, 102452.
- [128] Hagiya, Y., Endo, Y., Yonemura, Y., Takahashi, K., Ishizuka, M., Abe, F., Ogura, S. I. (2012). Pivotal roles of peptide transporter PEPT1 and ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 in 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photocytotoxicity of gastric cancer cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9(3), 204-214.
- [129] Kawauchi, S., Morimoto, Y., Sato, S., Arai, T., Seguchi, K., Asanuma, H., Kikuchi, M. (2004). Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: study of oxygen consumption and photobleaching. *Lasers in Med Sci*, 18(4), 179-183.