

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FENİTOİN'İN NAV 1.7 VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN DUNNING MODEL
PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur SÜTCÜ

2000006177

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

EKİM 2023

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FENİTOİN'İN NAV 1.7 VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN DUNNING MODEL
PROSTAT KANSER HÜCRELERİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur SÜTCÜ

2000006177

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Engin KAPTAN

Dr. Öğr Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

EKİM 2023

ÖNSÖZ

"Fenitoin'in Nav 1.7 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları Üzerindeki Etkisinin Dunning Model Prostat Kanseri Hücrelerinde Değerlendirilmesi" adlı yüksek lisans tez çalışmamda, danışmanlığımı üstlenen Sayın Prof. Dr. Seyhan ALTUN hocama teşekkür ederim.

Tez sürecim de her daim yanımda olan arkadaşlarım Mine Yıldırım BORUCU, Meltem DEMİREL, Fatme MUSTAPHE, Sevgi ÖZTÜRK, Didem SEZGİN ve Dilek YILMAZ'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi manevi katkılarını esirgemeyen annem Lütfiye SÜTCÜ, babam Çetin SÜTCÜ'ye her daim yanımda olan kardeşim Meryem SÜTCÜ ve Merve SÜTCÜ GÜRBÜZ'e teşekkür ederim.

Saygı&Sevgilerimle...

Ekim, 2023

İlknur SÜTCÜ

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| ÖNSÖZ | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| KISALTMALAR | vi |
| ŞEKİL LİSTESİ | vii |
| TABLO LİSTESİ | ix |
| ÖZET..... | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Prostat Kanseri ve Epidemiyolojisi | 4 |
| 2.1.1. Risk Faktörleri | 6 |
| 2.2. Prostat Anatomisi | 10 |
| 2.3. Prostat Patolojisi | 11 |
| 2.3.1. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH) | 11 |
| 2.3.2. Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PIN) | 12 |
| 2.3.3. Prostatit | 13 |
| 2.4. Gleason Skorlama Sistemi | 13 |
| 2.5. Prostat Kanseri ve Metastaz | 15 |
| 2.6. Dunning Model Prostat Kanseri | 17 |
| 2.7. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VGSC) | 17 |
| 2.7.1. Prostat Kanserinde Sodyum Kanalları | 21 |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM | 28 |
| 3.1. Hücre Kültürü | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Farmakolojik Ajanların Hazırlanması..... | 28 |
| 3.3. Hücrede Büyüme..... | 28 |
| 3.4. Toksikite | 29 |
| 3.5. Hücre Proliferasyonu | 29 |
| 3.6.Lateral Hücre Hareketi (Motilite=Migrasyon)..... | 30 |
| 3.7. Apoptotik Hücre Ölümü..... | 30 |
| 3.8. Koloni oluşumu | 31 |
| 3.9. İstatistiksel Analiz..... | 31 |
| 4.BULGULAR | 32 |
| 4.1. Hücrede Büyüme..... | 32 |
| 4.2. Hücrede Toksikite..... | 34 |
| 4.3. Hücre Proliferasyonu | 36 |
| 4.4. Lateral Motilite (Migrasyon)..... | 39 |
| 4.5. Apoptotik Hücre Ölümü..... | 43 |
| 4.6.Koloni Oluşumu | 49 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 53 |
| KAYNAKLAR | 58 |

KISALTMALAR

| | |
|--------------|--|
| ADT | :Androjen yoksunluğu tedavisi |
| AR | : Androjen reseptörü |
| AÜSS | : Alt üriner sistem semptomları |
| BPH | :Benign prostat hiperplazisi |
| DMSO | :Dimetilsülfoksit |
| HGPIN | :Yüksek dereceli PIN |
| MTT | :3 - (4,5-Dimetil tiazol-2yl) – 2,5 – Difenil tetrazolyum bromid |
| PCa | :Prostat kanseri |
| PHT | :Fenitoin |
| PIN | :Prostatik intraepitelyal neoplazi |
| PSA | :Prostata özgü antijen |
| TTX | :Tetrodotoksin |
| VGSC | :Voltaj kapılı sodyum kanalları |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Kanser çeşitlerinin içerisinde yıllık prostat kanseri mortalite (GLOBOCAN, 2020). | 4 |
| Şekil 2.2. Amerika Birleşik Devletleri'nde ırk / etnik kökene göre prostat kanseri insidansı ve ölüm oranları (2010-2014 100.000'de) (Pernar v.d., 2018)..... | 5 |
| Şekil 2.5. Prostat kanseri biyopsisi. a,b. İyi huylu prostat hiperplazisinden yapılan histolojik kesitler. c, d. Prostat kanserinden alınan kesitler (Munkley v.d. 2017) | 14 |
| Şekil 4.1. Mat- LyLu hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki ve doğru denklemi..... | 33 |
| Şekil 4.2.AT-2 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbansı arasındaki ilişki ve doğru denklemi..... | 34 |
| Şekil 4.3.PHT'nin Mat-LyLu hücreleri üzerine uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdeleri..... | 35 |
| Şekil 4.4. PHT'nin AT-2 hücreleri üzerine uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdesi ... | 36 |
| Şekil 4.5. Mat-LyLu hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda PHT'nin 24 saat süreyle uygulanması sonucu (\pm SE) normalize edilmiş hücre sayıları (* P<0.05) | 37 |
| Şekil 4.6. Mat-LyLu hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda PHT'nin 48 saat süreyle uygulanması sonucu (\pm SE) normalize edilmiş hücre sayıları (* P<0.05) | 37 |
| Şekil 4.7. AT-2 hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda 24.saat süre ile PHT uygulanması sonucu normalize edilmiş hücre sayısı (\pm SE) (*P<0.05)..... | 38 |
| Şekil 4.8. AT-2 hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda 48. saat süre ile PHT uygulanması sonucu normalize edilmiş hücre sayısı (\pm SE) (*P<0.05)..... | 39 |
| Şekil 4.9. PHT'nin, Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareket üzerine etkisi (* p<0,05)..... | 41 |
| Şekil 4.10. PHT'nin, AT-2 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (* p<0,05) | 42 |
| Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan Mat-LyLu hücrelerinin ışık mikroskobu (20 x) görüntüsü. | 44 |
| Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan ve propidyum iyodür ile boyanmış Mat-LyLu hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (20 x) (Kırmızı noktalar ölü hücreleri göstermektedir) | 45 |
| Şekil 4.13. PHT'nin Mat-LyLu hücre soyu üzerinde apoptotik hücre sayısı..... | 47 |
| Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan AT-2 hücrelerinin ışık mikroskobu (20x) görüntüsü. | 48 |
| Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan ve propidyum iyodür ile boyanmış AT-2 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (20x) görüntüsü. | 50 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.16. PHT'nin AT-2 hücre soyu üzerinde apoptotik hücre sayısı | 51 |
| Şekil 4.17. PHT uygulanan Mat-Lylu hücrelerinin koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi | 52 |
| Şekil 4.18. PHT uygulanan AT-2 hücrelerinin koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi | 53 |



TABLO LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 2.1. VGSC'ler, α ve β alt birimleri (Bouza v.d., 2018) | 20 |
| Tablo 4.1. Mat-LyLu hücrelerine TTX ve PHTuygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (\pm SE) | 40 |
| Tablo 4.2. AT-2 hücrelerine TTX ve PHT uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (\pm SE) | 42 |
| Tablo 4.3. PHT'nin koloni yüzdesi üzerindeki etkisi ($P>0.05$) | 50 |



ÖZET

Prostat kanseri (PCa); dünyada ve ülkemizde akciğer kanserinden sonra en sık teşhis edilen ikinci kanser türüdür. 55 yaşın üstündeki erkeklerde oran giderek artış göstermektedir. Prostat kanserinde primer tümörler günümüz tedavi metodlarıyla tedavi edilirken, metastaz oluşumu ile tedavi zorlaşmakta ve mortalite oranı artmaktadır. Bu nedenle PCa tedavisindeki başarıyı artırmak ve ölüm oranlarını azaltmak için yapılacak çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, hücrelerde ekspresyon düzeyleri artan voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC) hücrenin hareketini dolayısıyla da metastatik potansiyeli artırdığı görülmüştür. Birçok çalışma ile meme, akciğer, prostat ve kolon gibi kanser çeşitlerinde VGSC'lerin bloke edilmesi sonucu hücre hareketlerinin azaltılabildiği ve metastazın engellenebildiği görülmüştür. Antiepileptik ilaç olarak kullanılan fenitoin (PHT) etkisini iyon kanal blokeri olarak göstermektedir. Meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalar kanser hücrelerindeki VGSC'leri bloke ettiğini ve metastazı azalttığını ortaya koymuştur.

Çalışmada PHT'nin prostat kanseri yüksek metastatik Mat-Lylu ve düşük metastatik AT-2 hücrelerinde ekspresyonu artan Nav 1.7 VGSC üzerindeki etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaç için, proliferasyon, migrasyon, koloni ve apoptoz gibi etkilerin vitro olarak araştırılmıştır. Hücre proliferasyonu, MTT yöntemi ile, migrasyon, wound healing/yara oluşturma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her iki hücrenin proliferasyonu üzerinde toksik etki göstermeyen 1 µM ve 2 µM PHT konsantrasyonları esas alınmış ve sodyum kanal blokeri TTX, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 1 µM ve 2 µM PHT konsantrasyonları ile sürdürülen çalışmalarda, koloni oluşumunun konsantrasyon arttıkça azaldığı, hücrenin lateral hareketinin/migrasyonunun anlamlı olarak inhibe olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, PHT, hücrelerin migrasyonu üzerinde oluşturduğu inhibisyon etkisi muhtemelen, Nav 1.7 VGSC aktivitesinin bloke olmasından kaynaklanmaktadır ancak, bunun moleküler yöntemlerle daha ayrıntılı in vitro ve in vivo olarak araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Prostat Kanseri, Fenitoin, AT-2, Mat- Lylu, VGSC, Migrasyon

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECT OF PHENYTOIN ON NAV 1.7 VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNELS IN DUNNING MODEL PROSTATE CANCER CELLS

Prostate cancer (PCa); is the second most frequently diagnosed type of cancer after lung cancer in the world and in our country. The rate is gradually increasing in men over the age of 55. While primary tumors in prostate cancer are treated with today's treatment methods, the mortality rate increases with the formation of metastasis. Therefore, studies to increase the success of PCa treatment and reduce mortality rates are of great importance. Studies have shown that voltage-gated sodium channels (VGSC), whose expression levels increase in cells, increase the movement of the cell and therefore the metastatic potential. Many studies have shown that cell movements can be reduced and metastasis can be prevented as a result of blocking VGSCs in cancer types such as breast, lung, prostate and colon. Phenytoin (PHT), used as an antiepileptic drug, shows its effect as an ion channel blocker. Studies on breast cancer have revealed that it blocks VGSCs in cancer cells and reduces metastasis.

Our study aimed to investigate the effect of PHT on Nav 1.7 VGSC, whose expression is increased in prostate cancer cells, highly metastatic Mat-Lylu and low metastatic AT-2 cells. For this purpose, effects such as cell proliferation, migration, colony and apoptosis were evaluated in vitro. MTT method was used for cell proliferation and wound healing method was used for migration. PHT concentrations of 1 μM and 2 μM , which did not have a toxic effect on both cell proliferation, were taken as basis, and TTX was applied as a sodium channel blocker/positive control. In studies conducted with 1 μM and 2 μM PHT concentrations, it was observed that colony formation decreased as the concentration increased, and lateral movement/migration of the cell was significantly inhibited.

As a result, the inhibition of PHT on cell migration is probably achieved by blocking Nav 1.7 VGSC activity, but it needs to be investigated in more detail in vitro and in vivo with molecular methods.

Key Words: Prostate Cancer, Phenytoin, AT-2, Mat-Lylu, VGSC, Migration

1. GİRİŞ

Kanser, kalp hastalığından sonra tüm dünyada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ikinci ölüm nedenidir. Erkeklerde en sık teşhis edilen kanser türü akciğer kanserinden sonra prostat kanseridir (Bray v.d., 2018). Kanserden kaynaklı ölüm oranının %90'ından fazlası metastaz sebebiyledir (Djamgoz&Onkal 2013; Fairhurst v.d., 2015; Bagan v.d., 2029). Primer tümörler genellikle radyasyon veya lokal cerrahi ile tedavi edilebilirken bunların aksine metastaz, sistemik bir hastalıktır. Metastazın önlenmesi ve tedavisi için tarama, erken teşhis, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immüno terapiyi kapsayan yaklaşımlar gerekir (Ganesh v.d., 2021). Ancak bu yöntemlerde yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bazı yan etkileri bulunmaktadır (Mun v.d., 2018).

İyon kanalları, biyolojik membranların çift katmanlı tabakasında bulunan taşıma ile görevli proteinlerdir. Hormonal sekresyon, sinir hücrelerinin uyarımı ve kas kasılması gibi birçok fizyolojik süreçte rol alırlar (Silva v.d., 2021). Kanser hücrelerinde de bulunan voltaj kapılı iyon kanalları (VGSC) özellikle kanser hücrelerindeki aşırı ekspresyonu ile metastatik potansiyeli arttırmakta ve hücre dışı pH'ın düşmesine neden olmaktadır. Özellikle voltaj kapılı sodyum kanalları, epitel kökenli, meme, prostat, deri, kolon, akciğer, serviks gibi birçok karsinomada kanserin başlaması ve ilerlemesine yol açarak metastazı oluşturmaktadır. Metastatik aktivite VGSC'ler ile hücre proliferasyonu ise, voltaj kapılı potasyum kanalları tarafından kontrol edilmektedir (Fraser v.d., 2014; Djamgöz v.d., 2019; Díaz-García v.d., 2020; Sanchez-Sandavol v.d., 2023).

VGSC'ler pek çok kanser hücresinde, ekspre edilmekte ve kanser hücrelerinin davranışlarını etkilemektedir (Xia v.d., 2016). Bu iyon kanalları por oluşturucu α ve bu alt birime bağlanan β alt birimlerinden meydana gelmiştir, çeşitli kanser hücrelerinde de tanımlanmıştır. (Brackenbury v.d., 2012; Djamgoz&Onkal 2013; Angus v.d., 2019). VGSC'ler memelilerde Nav 1.1-1.9 olmak üzere dokuz farklı α alt birimi ile dört β -alt birimi, β 1-4'den oluşur. Bunlardan meme kanserinde Nav 1.5 VGSC en yüksek oranda eksprese edilirken, prostat kanseri hücrelerinde yoğun olarak Nav 1.7 VGSC eksprese edilmektedir (Brackenbury v.d., 2012).

Kanser hücrelerinde VGSC aktivitesinin bloke edilmesi sonucu hücre hareketliliğinin azaldığı belirtilmiştir. Benzer etki tetradoksin (TTX) etkisi ile de görülmüştür. VGSC'lerin meme, kolon, prostat, akciğer gibi kanser çeşitlerinde istilayı arttırdığı TTX'in kullanımı ile azaldığı görülmüştür. TTX varlığında Nav 1.5 ekspresyonu yapan MDA-MB-231 ve Nav 1.7 ekspresyonu yapan Mat-Lylu hücrelerinde de hareketlilik üzerinde hiçbir etki görülmemiştir (Grimes v.d., 1995; Brackenbury & Djamgöz 2006; Nelson v.d., 2015).

VGSC'ler insan ve sıçan prostat kanseri hücrelerinde de tesbit edilmiş ve metastaz üzerinde etki olduğu saptanmıştır (Laniado v.d., 1997; Bennet v.d., 2004; Yıldırım v.d., 2012). Araştırma amacıyla, dunning modeli sıçan protat kanseri hücreleri Mat-Lylu ve AT-2, insan prostat kanser hücreleri PC-3, Du-145 ve LnCaP kullanılmaktadır. Metastaz oluşumunu engellemek üzere VGSC'leri bloke eden ilaç veya toksinler bulunmaktadır. Mat-Lylu ve AT-2 hücrelerinde, bulunan VGSC'lerin tetradoksin (TTX), (Grimes v.d., 1995; Yıldırım v.d., 2012) Gabapentin (Bugan v.d., 2016), Ranolozine (Karagöz 2015; Bugan v.d., 2019), Lidocain (Altun & Purut 2017; Rızaner v.d., 2020) gibi iyon kanal blokerleri ile baskılanmasıyla metastazın inhibe edilebileceği gösterilmiştir.

Antiepileptik bir ilaç olan fenitoin (PHT), günümüzde epilepsi hastalıklarında monoterapi olarak kullanılmaktadır. İyon kanallarının nörotransmitter reseptörlerine bağlanarak bloke olmasını sağlar. Ayrıca nörotransmitterlerin geri alınımını ya da metabolizmasını inihbe eder (Nevitt v.d., 2019).

PHT ile kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda yüksek metastatik Mat-Lylu, prostat kanseri hücrelerinin hareketlilik indeksini azalttığını görülmüştür (Fraser v.d., 2003). Karbamazepin ve PHT'nin, LNCaP, DU-145 ve PC-3 gibi insan prostat kanseri hücrelerinde büyümeyi inhibe etmiştir. Antiepileptik ilaçlardan levetirasetam, volproik asit, karbamazepin ve lidocaine ile de bazı çalışmalar yürütülmüştür. PHT'in özellikle Nav 1.5 ekspresyonu yüksek olan meme kanseri hücrelerinde araştırılmıştır. Yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 hücreleri ile yapılan çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonunun azaldığı belirlenmiştir (Yang v.d., 2012).

Meme tümör hücrelerinin metastatik potansiyelinin PHT tarafından inhibe edildiğini gösteren bu çalışmadan sonra, bu etkinin hücrede aşırı ekspre edilen Nav 1.5 VGSC'nin baskılanmasından kaynaklandığını ortaya koyan in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır (Nelson v.d., 2015; Yang v.d., 2015; Mohammed v.d., 2016).

Farklı kanser türlerinde VGSC'lerin bloke edilmesi sonucunda hücrelerin hareketliliğinin azalması sonucu, metastatik potansiyelden VGSC'lerin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada da Nav1.5 üzerinde etkili olan PHT'nin, prostat kanserinde ekspresyonu artan Nav 1.7 VGSC üzerindeki etkisinin düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-Lylu hücrelerinin proliferasyonlarını migrasyon, koloni oluşumu ve apoptoz yöntemleriyle in vitro olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece PHT'nin anti metastatik etki profilinin belirlenmesi ve gelecekte prostat kanseri metastazına karşı yeni bir tedavi metodu oluşturulması hedeflenmiştir.

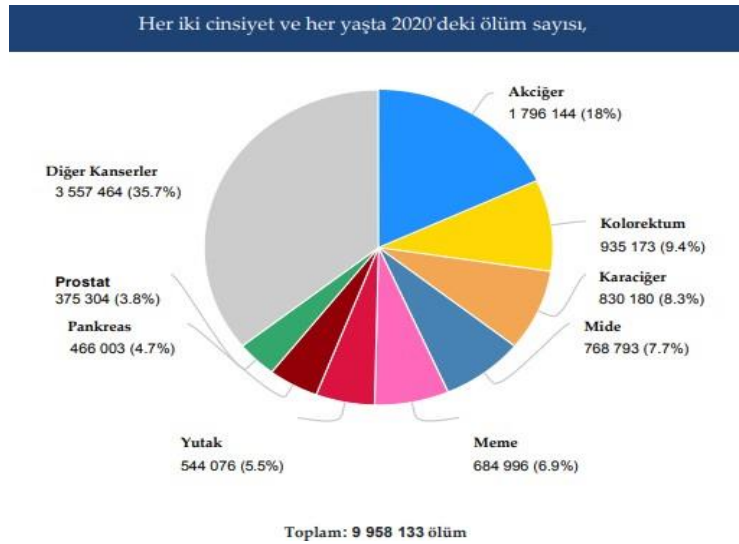
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri ve Epidemiyolojisi

Tüm dünyada prostat kanseri insidansı giderek artmakta ve 2020 yılında prostat kanserinden yılda 1.414.249 vaka ile karşılaşılmaktadır. Aynı zamanda mortalite sayısı da 375.000'e ulaşmıştır (Leslie v.d., 2021; Wasim v.d., 2022). 2014 yılında Birleşik Krallık'ta 47.300 vaka ile en sık görülen ikinci erkek kanseri prostat kanseri olmuştur (Munkley v.d., 2017). 2018'de dünya çapında bu hastalıktan 1.280.000 yeni vaka teşhis edilmiştir. Ayrıca yine dünya çapında bu hastalığa sahip yaklaşık 10 milyon PCa'lı erkeğin 700.000'i metastatik hastalığa sahiptir (Wasim v.d., 2022). Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre, prostat kanseri insidansı yüz binde 41.7'dir (T.C Sağlık Bakanlığı, 2019).

Dünya çapında en sık teşhis edilen erkek malignitesi PCa olarak belirlenmektedir. Erkeklerde kanserden kaynaklanan ölümlerde ise beşinci sırada yer alır (Komura v.d., 2017; Davidson v.d., 2018; Leslie v.d., 2021; Sekhoacka v.d., 2022).

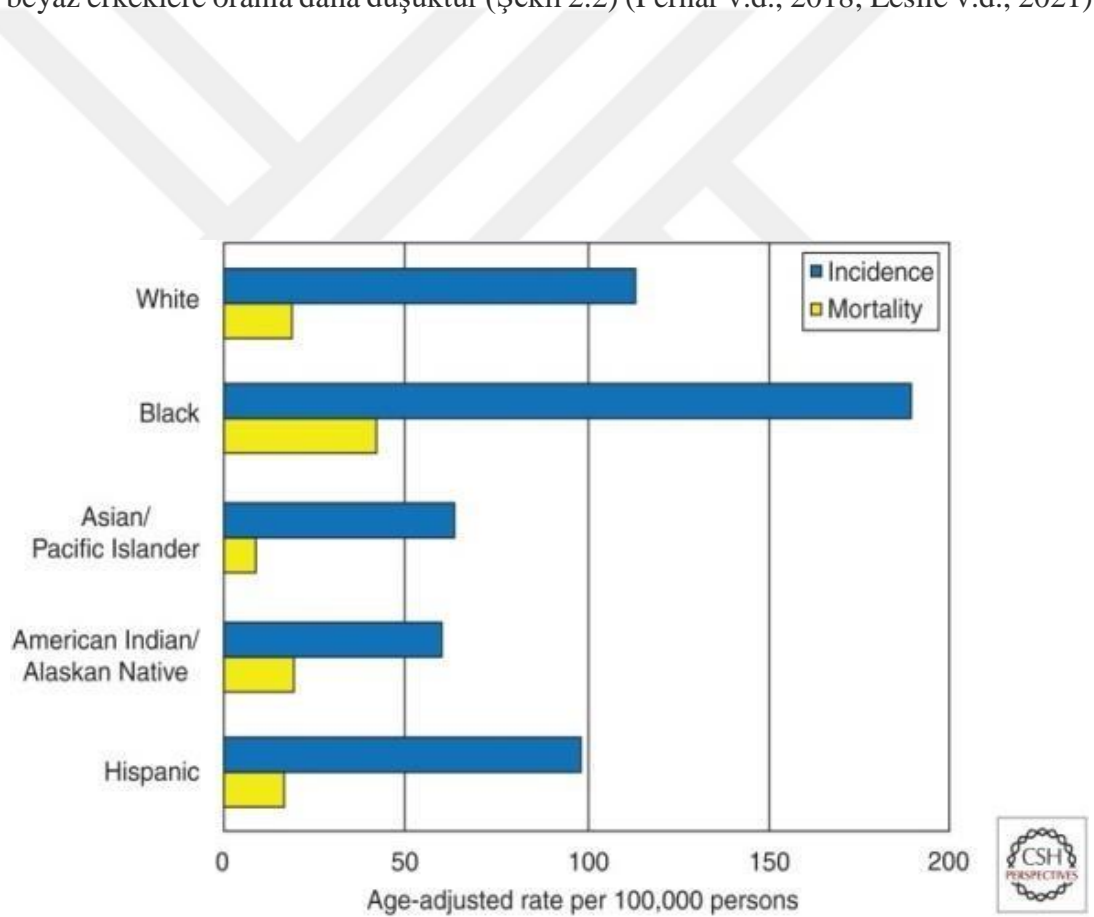
Dünyada her yıl 375 bin erkek hayatını prostat kanserinden kaybetmektedir (Şekil 2.1). Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre Türkiye'de 19 bin 444 erkeğe prostat kanseri tanısı konmuştur (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 2.1. Kanser çeşitlerinin içerisinde yıllık prostat kanseri mortalite (GLOBOCAN, 2020).

PCa'nın görülme olasılığı 40 yaşın altındaki erkeklerde azalır. Buna karşılık 55 yaşın üzerindeki erkeklerde artar (Pernar v.d., 2018; Leslie v.d., 2021). ABD'de 2012 yılında hastalık teşhisi konan erkeklerin %10'u 55 yaşından küçüktür. PCa'nın teşhisinde ilk basamak olarak kullanılan prostata özgü antijen (PSA) taramalarının sonucunda teşhis yaşı ortalama 66 ya çıkarılmıştır.

İnsidans ve mortalitedeki farklılıklar ırk ve etnik köken ile bağlantılı olarak genetik PCa meydana gelme olasılığını artırır. Örneğin; ABD'de de siyahi erkeklerde prostat kanserinden kaynaklanan ölümler beyaz erkeklerle göre 2,4 kat daha fazladır. Yapılan çalışmalara göre, prostat kanseri ölüm oranı ve insidansları Amerika Yerlileri/Alaska Yerlileri, Asyalı/Pasifik Adalılar ve Hispanik erkekler arasında Hispanik olmayan beyaz erkeklerle oranla daha düşüktür (Şekil 2.2) (Pernar v.d., 2018; Leslie v.d., 2021).



Şekil 2.2. Amerika Birleşik Devletleri'nde ırk / etnik kökene göre prostat kanseri insidansı ve ölüm oranları (2010-2014 100.000'de) (Pernar v.d., 2018).

Kanserler içerisinde prostat kanseri en yüksek 5 yıllık prevalansa sahiptir (Pernar v.d., 2018).2020'de Avrupa'da 449.761 vaka Fransa'da 64.955 vaka olmak üzere dünya

genelinde 1.276.106 yeni vaka belirlenmiştir. Ayrıca Fransa'da 9002, Avrupa'da 107.315 erkekte prostat kanseri teşhis edilmiştir (Bijoux v.d., 2022). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2022 yılında 34.500 prostat kanserinden ölüm ve 268.490 yeni vaka saptanmıştır (Leslie v.d., 2022).

Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerde prostat kanseri yaygın olarak görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık görülen ikinci kanser türüdür (Fiandalo v.d., 2013; Silberstein v.d., 2013; Leslie v.d., 2022). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2016 yılında 180.890 vaka teşhis edilmiştir (Suy v.d., 2012; Pernar v.d., 2018). Ancak PSA testinin yaygın olarak kullanılmadığı Japonya, Doğu Avrupa ve diğer bazı Asya ülkelerinde de PCa'lı birey sayısı artmıştır. Bu ülkelerde özellikle göç, yaşam tarzı ve yaş PCa'nın artmasında etkili olmaktadır.

Güney-Orta Afrika ve Karayipler gibi az gelişmiş ülkelerde ise mortalite yüksektir. Örneğin; Afrika gibi az gelişmiş ülkelerde kanser taramasının düşük olması ve tedavi tekniklerinin gelişmiş ve yaygın olmamasına bağlı olarak ölüm oranları da yüksektir. Gelişmiş ülkeler arasında olan Asya'nın doğu, orta ve güney kesiminde ise, insidanstan farklı olarak mortalite düşüktür. Buna etken olarak erken teşhis ve PSA taramasının ölüm oranlarında azalmaya neden olduğu belirtilmektedir. (Pernar v.d., 2018).

2.1.1. Risk Faktörleri

Yaş, obezite ve kilo değişimi, fiziksel aktivite, aile öyküsü, hipertansiyon, egzersiz yetersizliği, yüksek testosteron seviyeleri, sigara kullanımı bazı besin içerikleri, enfeksiyonlar ileri ve ölümcül prostat kanseri için risk faktörleri arasındadır (Pernar v.d., 2018; Leslie v.d., 2021).

Dünya genelinde 50 yaşın altındaki 350 erkekten bir tanesinde prostat kanseri teşhisi kalsa da, yaş ile bu oran hızla artar ve 50-59 yaşlarındaki her 52 erkekte bire yükselmektedir (Perdana v.d., 2016).

Günümüzde ülkemizde giderek artan oranlarda görülen ve bir halk sağlığı sorunu olan obezite, tüm ülkelerde de giderek artmaktadır. Dünyada erkekler arasında obezite ve aşırı kiloluk prevalansı sırasıyla %11 ve %39'dur. 150.000 Avrupalı erkek üzerinde

yapılan çalışmada obeziteyi gösteren faktörlerden bel çevresi ile prostat kanseri riski arasında pozitif ilişki bulunmuştur.

İleri-ölümcül prostat kanseri riski ile yüksek fiziksel ve mesleki aktivite arasında ise, negatif bir ilişki vardır. Prostat kanseri üzerine yapılan bir çalışmada fazla egzersiz yapanların az egzersiz yapanlara göre ölüm riskinin%61 daha düşük olduğu görülmüştür (Pernard v.d., 2018).

Prostat kanseri insidansı sigara içen bireylerde içmeyenlere göre %60 daha yüksektir. Hasta bireylerde sigara içenlerin içmeyenlere oranla tedavi sürecininde daha kötü olduğu görülmüştür (Pernard v.d., 2018).

Prostat dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunan likopen, karatoneid çeşidi olup güçlü bir antioksidandır. Likopen, karpuz, pembe greyfurt ve domateste bulunur. 2004'te yapılan bir çalışmada domatesin çiğ olarak tüketiminde prostat kanseri riski düşük olsa da, özellikle domatesin yağ içerisinde pişmiş olarak tüketenlerde PCa riski daha da düşüktür. Bu antioksidanın prostat kanseri için koruyucu bir faktör olduğu belirlenmiştir. Ayrıca prostat kanserinde en güçlü antioksidanlardan biri de kahvedir. Kahvenin glikoz metabolizması ve insülin salgılanması ile bağlantısı olduğu görülmüştür (Pernard v.d., 2018).

Likopen türü favonoidler, selenyum, vitamin E, soya, yeşil çay gibi diyetlerin prostat kanseri riskini azaltabileceği saptanmıştır (Haddad v.d., 2006; Cheung v.d., 2008).

İleri-ölümcül prostat kanseri ile fazla kalsiyum alımında pozitif ilişkilendirilmiştir. Böylece süt tüketiminin fazla olması ile prostat kanseri olma olasılığı artar (Pernar v.d., 2018; Leslie v.d., 2021).

Diyetleri balık yönünden zengin olan popülasyonların, prostat kanseri insidansı daha düşüktür. En iyi örnek Alaska eskimolarıdır. Yapılan başka bir çalışmada kanda uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinin seviyeleri düşük olan erkeklerde prostat kanseri riskinin arttığı bulunmuştur. Ancak teşhis konulduktan sonra diyetini haftada iki porsiyon balık ile beslenme şeklinde değiştiren hastalarda prostat kanseri riskinde %17'lik bir azalma görülmüştür. Balıklar, uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinde anti-inflamatuar yol ile prostat kanseri riskini azaltır (Leslie v.d., 2021).

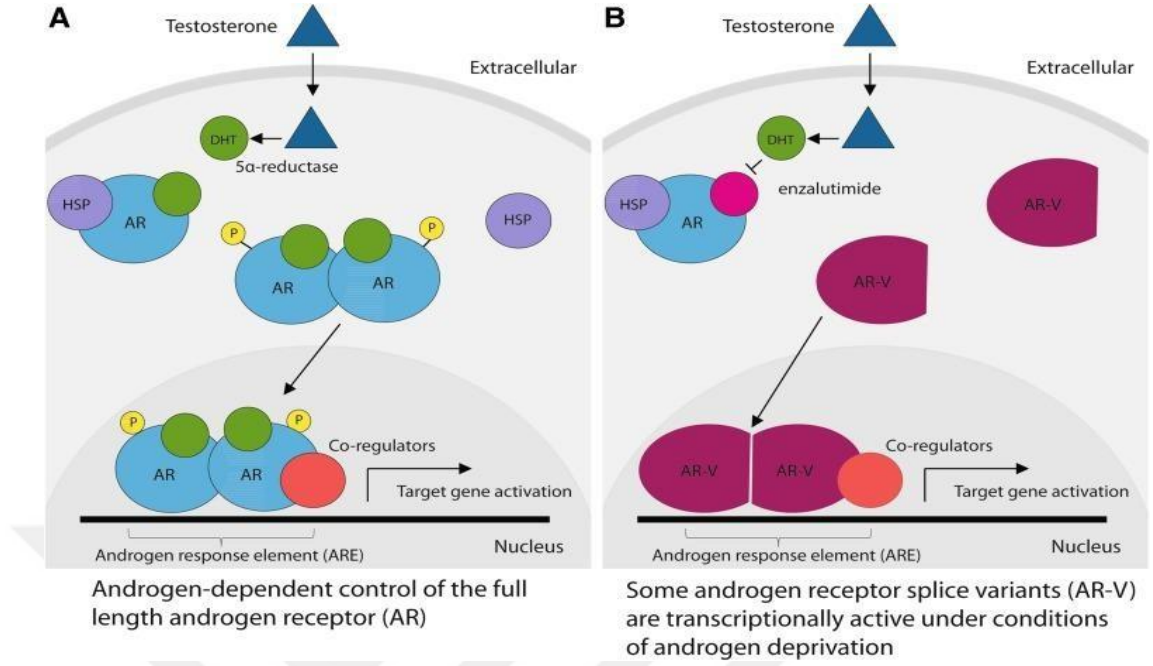
Dutasterid ve finasterid gibi 5 alfa-redüktaz inhibitörler yüksek dereceli kanser riskinde etkili olmasa da düşük dereceli kanserde etkilidir. Yapılan çalışmalarda 38.000 erkekte 5 alfa-redüktaz ve prostat kanseri kullanımı incelenmiştir. İlacı alan erkeklere PSA testi, prostat muayenesi ve biyopsi yapılmıştır. Ancak hastalığın gelişimi ve genel sağkalım arasında bir ilişki bulunamamıştır. Fakat 5-alfa redüktaz ilaçları alan erkeklerde genel ve lokal hastalık oranları azalmıştır.

Statinler ileri derecedeki prostat kanseri için negatif bir ilişki içerisinde olduğunu görülmüştür. Birleşik Krallık'ta tanı sonrasında statin kullanan 11.000 prostat kanserli erkeklerin ölüm riski % 34 daha düşüktü (Pernar v.d., 2018). Ayrıca statinler gibi metformin ve aspirin kullanımı prostat kanseri riskini azaltır. Sık boşalma prostat kanseri riskini azaltırken; cinsel aktiviteye erken başlamak, çoklu cinsel partnere sahip olmak prostat kanseri riskini artırır. Aynı zamanda frengi, bel soğukluğu ve klamidya gibi enfeksiyonların prostat kanseri riskini artırdığı görülmüştür (Leslie v.d., 2021).

2.1.2. Prostat Kanserine Androjen Etkisi

Prostat kanserinin ilerlemesinde androjen, östrojen, büyüme hormonu ve prolaktin etkilidir (Munkley v.d., 2017).

Androjensteorit yapılı bir hormon olup, PCa'yı artırır. Androjenin yapısında testosteron hormonu, hidrofobik yapılı olup PCa hücre zarını geçer. Ayrıca dihidroksi testosteron ile 5 α -redüktaza modifiye olur. Androjenler hücre içerisinde androjen reseptörü (AR) ne bağlanır. AR, olmadığında sitoplazmada bulunur, androjenlere bağlandıktan sonra nükleusa girer (Şekil 2.3). Nükleus içerisinde DNA hedef dizilerine N-terminal TF alanı ile bağlanır. Böylece aşağı akış gen transkripsiyonel modellerini kontrol eder (Munkley v.d., 2017).



Şekil 2.3. a. Androjen reseptörü ve b. aktif AR izoformları tarafından yapılan transkripsiyonel kontrol (Munkley v.d., 2017).

Androjen yoksunluğu (ADT) hormonal bir tedavidir. 1941 yılında Hodges ve Huggins androjen yoksunluğunun prostat kanserini geriletliğini bulmuşlardır (Fiandalo v.d., 2013; Komura v.d., 2017). Testosteron üretiminin ve diğer hormonların bloke edilmesini sağlar. Aynı zamanda bu hormon prostat kanser hücrelerinin beslenmesini engeller. Androjen yoksunluğu tedavisi prostat kanserinin tedavisinde kullanılmasına rağmen, anemi, cinsel işlev bozukluğu, yorgunluk, hiperlipidemi, sıcak basması gibi akut ve uzun yan etkiler de görülmektedir (Sechoakha v.d., 2022).

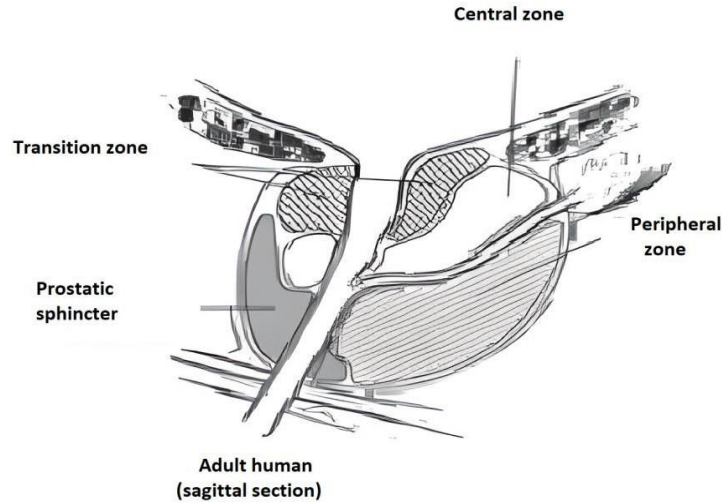
Prostat bezinin normal faaliyeti için androjen (testosteron) hormonu gereklidir (Leslie v.d., 2021). ADT prostat kanseri için bir tedavi yoludur ve bu tedavi yöntemine karşı direnç gelişir ise, metastatik dirençli prostat ya da dirençli prostat kanseri ile sonuçlanabilir (Wang v.d., 2018).

2.2. Prostat Anatomisi

Prostat, yaklaşık 20 gram ağırlığındamemelilerde bulunan bir bezdir (Francis v.d., 2018). Prostat bezi mesanenin altında pelvis bölgesindedir (Munkley v.d., 2017; Leslie v.d., 2021). Genç erkeklerde ceviz büyüklüğünde olup, ilerleyen yaşlarda büyüklüğü artar (Strand v.d., 2017; Ng v.d., 2021). Koruyucu alkali sıvı olan seminal sıvı bileşenlerini üretir. Bu sıvı spermi hem taşır hem de besler (Wasim v.d., 2022).

Embriyogenezde geç gelişmeye başlayan prostat, olgunlaşmasını ergenlik döneminde tamamlar. Prostat yoğun bir fibromüsküler bezdir. Üretra ile mesane arasındaki ventral kısımdan oluşan ürogenital sinüsten gelişir. Ters çevrilmiş koni şeklindeki prostatta; geçiş, periferik ve merkezi olmak üzere üç bölge ayırt edilir. Bunlar içerisinde en büyük olanı periferik bölgedir. Prostat kanserinin büyük bir kısmında bu bölgede gelişir. Benign prostat hiperplazisi (BPH) ise geçiş bölgesinde bulunur. İnsan prostat hücreleri arasında benzerlik ve farklılıklar bulunmaktadır (Aaronv.d., 2017). Hücresel olarak luminal, bazal ve nöroendokrin olarak üç kısımda incelenir (Wangv.d., 2021; Francis v.d., 2018; Whitakerv.d., 2020).

İnsan prostatının ürogenital sinüs yapıları anterior, lateral, dorsal ve ventral olmak üzere dört loptan oluşur (Şekil 2.4) (Francis v.d., 2018).



Şekil 2.4. İnsan prostatının ürogenital sinüs yapıları (Francis v.d., 2018).

2.3. Prostat Patolojisi

Prostat bezinin benign prostat hiperplazisi, prostatik intraepitelyal neoplazi ve prostatit olmak üzere üç tip hastalığı vardır.

2.3.1. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)

BPH, prostat dokusunun hiperplazisi ya da malign olmayan büyüme anlamını taşır. Yaşlı erkeklerde daha fazla görülür (Minutoli v.d., 2016). 40-45 yaşlarında başlayabilir (Strand v.d., 2017). Histolojik prevalans 60'lı yaştaki erkeklerde %50 ila %60; 70 yaşın üzerindekielerde %80 ila %90 arasındadır (Speakman v.d., 2014). BPH'nin üç çeşidi bulunmaktadır. Bunlar; iyi huylu prostat büyümesi, alt üriner sistem semptomları (AÜSS) ve mesane çıkım obstrüksiyonudur. Mesane çıkım ile başvuran BPH'li kişiler benign prostat obstrüksiyonu olarak adlandırılır (Ng v.d., 2020; Mitsunari v.d., 2021).

AÜSS, prostat büyümesine bağlı olarak mesane çıkışı obstrüksiyonu, mesane ve prostat düz kasından kaynaklanmaktadır. AÜSS'nün obstrüktif nedeni olarak potansiyel prostat büyümesinin ilk göstergesi dijital rektal muayene ile belirlenir. AÜSS için semptom sonuçları, ultrasonla prostat hacmi ölçümü ve üroflowmetri ile bilgi toplanır.

AÜSS için alfa adrenerjik reseptör blokerleri ve 5 alfa redüktaz inhibitörleri olmak üzere iki çeşit tedavi vardır. Düz kas dokusunu azaltarak idrar akım hızını artıran α -blokerleri kullanılır. Testosteronun dihidrotestosterona dönüşümünü engelleyen ise 5 alfa redüktazdır. Böylece lokal dihidrotestosteron seviyeleri azalır. 5 alfa redüktaz tedavisi, prostat hacmini %19 oranında azaltarak üriner sistem semptomlarının kötüleşmesini engeller. 2030 yılına kadar ABD'de AÜSS görülen erkek sayısının 11 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Strand v.d., 2017). AÜSS'nin nedenleri arasında prostata ek olarak böbrek, merkezi sinir, kalp, mesane ve endokrin hastalıkları da bulunur.

Benign prostat hiperplazisi, üretrayı çevreleyen bölgede epitelyal hücre proliferasyonu ve stromal ile gelişir. Bu durum mesane çıkış obstrüksiyonuna ve üretranın sıkışmasına

neden olur. Tedavi edilmezse mesanenin kasılmasında düzensizlik görülebilir. Kronik yüksek basınçretansiyonuna neden olur (Speakman v.d., 2014).

Prostatik epitel, stroma ve testiküler androjenler BPH'ye doğrudan neden olmazlar. Ancak dihidrotestosteron, BPH gelişiminde doğrudan etkilidir. Dihidrotestosteron'un prostat üzerine olan doğrudan etkisi stromal hücreler üzerindedir. Kan dolaşımında hem apoptozu hem de hücresele proliferasyonu etkiler. Aynı zamanda komşu prostat hücrelerinde parakrin gibi hormonal etkileri vardır. Androjenlerin %90'ını prostat stromal hücrelerinde 5- α -redüktaz 2 tarafından dihidrotestosterona dönüşen testosteron oluşturur (Strand v.d., 2017; Francis v.d., 2018; Ng v.d., 2020).

BPH'nin etiyojisi karmaşık olduğundan tedavisinde de farklı yöntemler uygulanır. Bunun için antioksidan, anti-çoğalma, anti-androjenler ve anti-inflamatuar özellikler gibi fitoterapi uygulanabilir. Lignan ve izoflavonoidler tahıl, soya fasulyesi ve sebzelerde bol miktarda bulunur. Östrojenik etki gösteren izoflavonoidler ve lignanlar BPH baskılayıcı olarak görev alır. Farmakolojik olan bu ürünler ayrıca anjiyogenez ve 5 α -redüktaz inhibitör aktivite gösterir (Mitsunari v.d., 2021).

2.3.2. Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PIN)

Prostat intraepitelyal neoplazi (PIN) ile yüksek dereceli PIN (HGPN) aynı anlamda kullanılmaktadır (Bostwick vd. 2004).

Yüksek dereceli prostat intraepitelyal neoplazisi (HGPN), prostat adenokarsinomuna histopatolojik özellikler bakımından benzer. PCa'nin prekanseröz lezyonu olarak bilinir. Klinik olarak farklılıkları bulunmamakla beraber tanınması teşhis amaçlı olan dört farklı HGPN modeli vardır. Bunlar tafting, düz, mikropapiller ve cribriformdur. Ayrıca bu modellerin dışında PIN'in küçük hücreli nöroendokrin, müsinöz, mikrovakuollü (köpük bez), taşlı yüzük hücre ve ters çevrilmiş (hobnail) dışı modelleri de bulunur. HGPN kanser gibi çok merkezlidir. Yaygın olarak prostatın periferik bölgesinde bulunur. Artan patolojik evre, pozitif cerrahi sınırlar ve perinöral invazyon ile kanserli prostatlarda HGPN hacmi artar.

PIN insidansı hasta yaşıyla pozitif ilişki içerisindedir. 20'li yaşlarda %9, 30'lu yaşlarda %22 olduğu görülmüştür. Bu durum PIN'in genç erkeklerde düşük olmakla beraber,

ilerleyen yaşlarda arttığını gösterir. Aynı zamanda HGPIIN hasta yaşıyla birlikte hacmi de artar (Lee v.d., 2015).

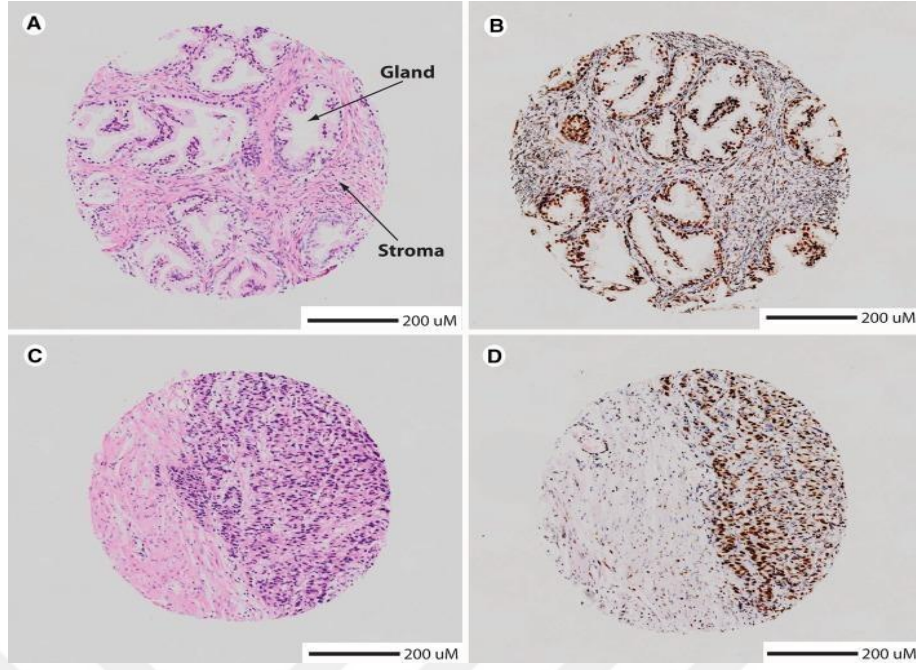
2.3.3. Prostatit

Prostatit prostat bezinin iltihabıdır. Prostat epitel kanallarını çevreleyen lokalize bölge ya da stromal bölmede lenfosit, nötrofil gibi immün hücrelerin infiltrasyonu görülür (Bleeker v.d., 2022). Cinsel işlev bozukluğu ve alt idrar yolu semptomları ile ortaya çıkar (Wang v.d., 2021). %4,5-9 oranında 50 yaşın altındaki erkeklerde en sık görülen tanıdır. Çalışmalarda görüldüğü üzere nörolojik, immünolojik, psikolojik etiyojiler ve endokrinolojik gibi birçok etkiler neden olur (Khattak v.d., 2021).

2.4. Gleason Skorlama Sistemi

Prostat kanserinin tedavisi hastalığın seviyesine göre değişiklik gösterir. Başlangıç seviyesindeki hastalıkta, aktif izleme tercih edilmektedir. Daha ileri aşamalarda ise, radikal prostatektomi, radyoterapi, brakiterapi gibi invaziv tedavi yöntemlerinden biri kullanılabilir. Prostat kanserinin morfolojik özelliklerine göre sınıflandırıldığı sisteme Gleason skorlama sistemi denir (Şekil 2.5) (Munkley v.d., 2017; Wang v.d., 2018).

Gleason skorlama sistemi ilk olarak 1960'larda patolog Dr. Donald Gleason tarafından geliştirilmiştir. Bu skorlama sistemi prostat yapısının mikroskopik düzeni ve mimari modeline dayanır. Modele 1'den 5'e kadar derece verilir. Mikroskopik glandüler patern görünümüne 1, glandüler mimarinin olmadığı sadece anormal kanser hücrelerinin bulunduğu 5'e kadar bir derece verilir. Lokalize prostat kanseri düşük, orta ve yüksek olarak sınıflandırılmaktadır. Gleason puanı sayıların olduğu iki derece ve bu sayıların toplamından oluşur. Örneğin; en iyi ve en düşük riskli skor Gleason 1+1=2, en kötü yüksek dereceli patoloji Gleason 5+5=10'dur. Düşük dereceli tümörler, 3 + 3 = 6 veya daha düşük, orta dereceli kanserler, 3 + 4 = 7'lik, yüksek dereceli kanserler 4 + 3 = 7 veya daha yüksek bir Gleason skoruna sahip olacaktır. Bu sınıflandırma Amerika Üroloji Derneği ve Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı tarafından onaylanmıştır (Silberstein v.d., 2013).



Şekil 2.3. Prostat kanseri biyopsisi. a,b. İyi huylu prostat hiperplazisinden yapılan histolojik kesitler.c, d. Prostat kanserinden alınan kesitler (Munkley v.d. 2017).

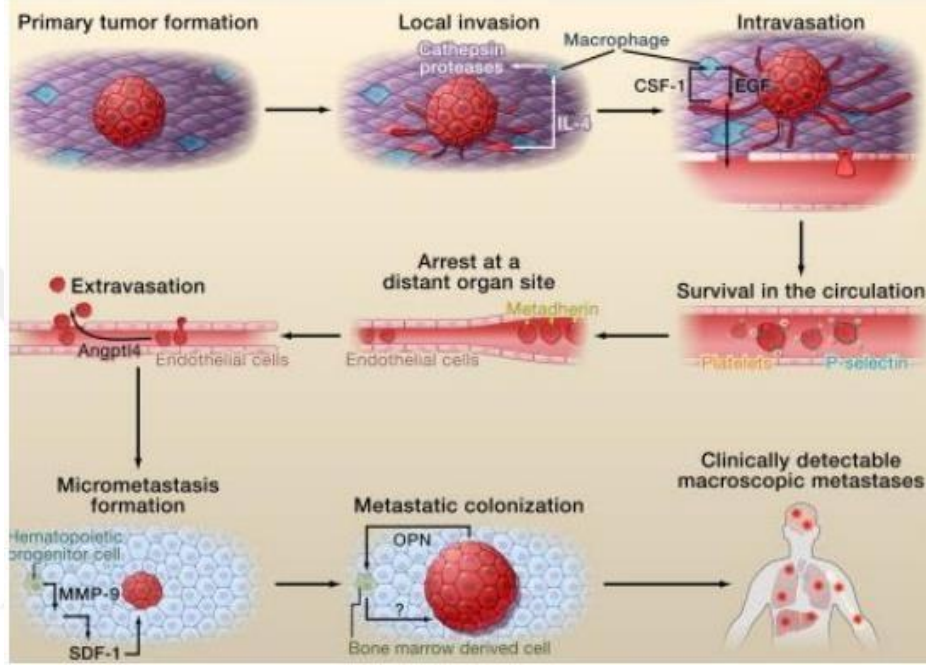
2.5. Prostat Kanseri ve Metastaz

Primer prostat kanseri, prostat bezinin normal glandüler yapısını bozar. Ancak henüz semptomları görülmemektedir. İlerleyen safhalarda lenfe, akciğere kemiğe uzak metastaz yapabilir. Mesaneden idrar akışını engelleyebilir (Munkley v.d., 2017). Bu durumda ağrı kesici ilaçlar, radyofarmasötikler, odaklanmış radyasyon, hormonal tedavi, bifosfonatlar, immünoterapi ve rankligand inhibitörleri gibi tedavi yöntemleri kullanılabilir (Leslie v.d., 2021).

Metastaz, kanser hücrelerinin primere tümörden ayrılarak, aktif hareket yeteneği kazanan hücreler kan veya lenf sistemine girmekte ve dolaşım sistemi aracılığıyla vücudu dolaşırken, uygun buldukları bir doku veya organda damar dışına çıkarak çevre dokulara penetre olmaları ve çoğalmalarını kapsayan çok basamaklı süreçtir (Şekil

2.6). Bir kanser hücresinin metastaz yapabilmesi için bazı özellikleri kapsamalı gerekir. Bunlar;

- Normal hücrelerde görülen hücre-hücre bağlantılarından ayrılması,
- Proteolitik enzimleri üretmeleri,
- Göç edici özellik kazanmaları yani hareket etmeleridir.



Şekil 2.6. Metastatik Kaskad (Valastyan ve Weinberg, 2011).

Dokularda özellikle epitel hücrelerinin sağlam bir şekilde bir arada bulunmasını sağlayan E-kaderin molekülüdür ve hücrelerin birbirine sıkıca yapışmasını sağlar. Kanser hücrelerinde E-kaderinin azalan ekspresyonu ile hücreler hareket kazanırlar. E-kaderinin down regülasyonu veya mutasyonel inaktivasyonu metastaz oluşumuna yol açmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kanser hücrelerinin istilacı davranması hem substrattan hem de birbirlerinden ayrılmaya, hareketliliğin artmasına ve proteolitik enzimlerin salınmasına neden olur. Göç eden kanser hücreleri elektriksel değişim ve kemotaktik yol ile vücuda yayılırlar. Göç sırasındaki tümör hücresi strese girerek apoptoza uğrayabilir. Apoptoza uğramayan hücreler ise uzak bölgelere yerleşebilir ya da ikincil tümör oluşturmak

üzere buralarda yeniden çoğalabilir. İkincil tümör olarak da adlandırılan metastaz kanser hastalarında ölümün temel nedenlerindedir. Kanserden kaybedilen kişilerin %90-95'inin mortalite sebebinin metastaz olduğu belirtilmektedir (Djamgöz&Onkal 2013; Fairhust v.d., 2015; Kottai v.d., 2015).

Kanser hücrelerinin diğer organlara gidebilmesi için birçok çevresel engel bulunmaktadır. İlk olarak kanser hücrelerinin hareketli ve invazif hale gelmesi gerekir. Sonraki adımda doğrudan ya da lenfatik sistem yoluyla kan dolaşımına girebilmesi gerekir. Dolaşım sistemine giren kanser hücrelerinin çok az bir kısmı damar dışına çıkarak sekonder tümörü meydana getirir.

Prostat kanserine bağlı ölümlerin ana nedenlerinden biri de metastatik bir hastalıktır. Genellikle ilk metastaz bölgesi primer tümörlere bitişik yakın lenf düğümleridir. Bunu akciğer, karaciğer ve kemik metastazları izler. İnsanda görülen prostat kanserinde kemik metastazları çoğunlukla hiperkalsemi, osteoblastik lezyonlar ve şiddetli ağrı olarak kendini gösterir.

Prostatın malign transformasyonu; prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN), lokalize prostat kanseri, ilerlemiş prostat adenokarsinomu (lokal invazyon) olarak başlar. Devamında metastatik prostat kanseri olarak sonuçlanan bir süreçtir (Leslie v.d., 2021).

Lokal prostat kanserinde sağ kalım oranları yüksek olmasına rağmen, metastatik prostat kanserini çoklu tedavi ile ortadan kaldırmak zordur. Lokal prostat kanseri insidansının artması ile uzak metastazların oranı düşüş gösterir(Wangv.d., 2018).

Tanı için prostata özgü antijen (PSA) testi ve transrektal ultrason biyopsileri kullanılır.Yeni tanı yöntemleri arasında serbest ve toplam PSA seviyeleri, PCA3 idrar testi, "4K" testi, genomik analiz, PIRADS puanlaması, MRI görüntüleme, eksozom testi, Prostat Sağlık İndeksi puanlaması ve MRI-TRUS füzyon rehberli biyopsiler yer almaktadır (Leslie v.d., 2021).

2.6. Dunning Model Prostat Kanseri

İnsanlardaki kanser hastalığının önlenmesi ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek üzere hücre soylarını içeren in vitro ve deney hayvanlarını içeren in vivo araştırma modelleri kullanılmaktadır.

1961'de Florida Üniversitesinden Dr. WF Dunning 22 aylık Kopenhag erkek sıçanın prostat otopsisinde primer, büyük ve adenokarsinom özellikte bir tümör gözlemlenmiştir. Bu tümörden alınan parçalar Kopenhag ve Fisher sıçanlarının çaprazlanmasıyla oluşan F1 dölünde melez sıçanların deri altına nakledilerek in vivo pasajlar ile yaşatılmıştır. Elde edilen R-3327 adı verilen son gelişmiş ve tümörün hızlı ve yavaş büyüyen olmak üzere iki farklı özellikteki tümör soyları meydana gelmiştir. Yavaş büyüyen tümörler hormona duyarlıdır. Hızlı büyüyen anaplastik tümörler ise AT-1 olarak isimlendirilir. AT-1 seri pasajlanmaları sonucu lenf ve akciğere metastaz yapan MAT-LyLu ile sadece akciğere metastaz yapan MAT-Luolmak üzere iki hücre soyu oluşmuştur. Metastatik özelliği düşük olan ikinci hızlı büyüyen anaplastik tümör ise, AT-2 olarak adlandırılmıştır (Tennant v.d., 2000; Chisamore v.d., 2016).

Yüksek metastatik Mat-Lylu hücreleri %90'ın üzerinde metastaz kapasitesine sahip olmasına karşın, AT-2 hücreleri % 10'nun altında metastaz kapasitesi gösterir ve düşük metastatik hücre soyu olarak tanınır. İn vitro olarak yetiştirilen bu hücreler Kopenhag sıçanların deri altına inoküle edilerek in vivo PCa modeli oluşturulmaktadır. Androjenden bağımsız prostat kanseri ve metastaz biyolojisine ilişkin in vivo ve in vitro deneysel çalışmalar için bu Dunning model kullanılmaktadır (Özel v.d., 2021).

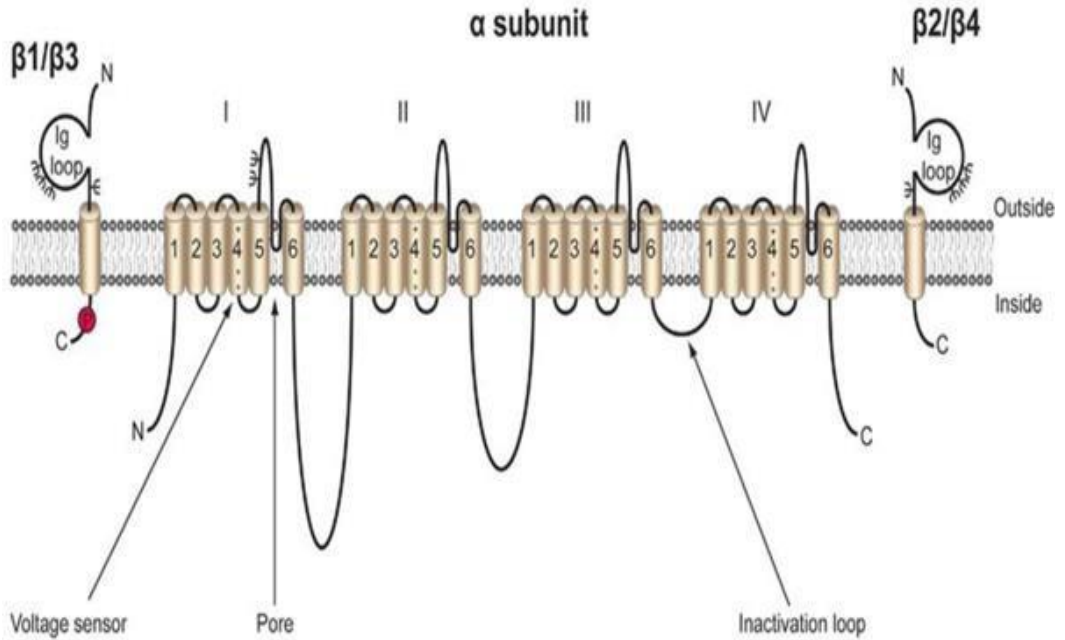
2.7. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları (VGSC)

Hücrelerdeki uyarıyı kontrol eden, zar depolarizasyonu ile aksiyon potansiyelini başlatan, uyarılabilirliği düzenleyen kanallara voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC) denir. Periferik ve merkezi sinir sistemi, kasılabilir hücreleri içeren ya da elektriksel iletinin yüksek olduğu iskelet ve kalp kaslarında bol miktarda bulunur. Sinir ve kas liflerinde aksiyon potansiyellerinin başlatılmasından ve yayılmasından sorumludur. Aynı zamanda sodyum akımlarının üretilmesini sağlar. 1952 yılında Hodgkin ve Huxley voltaj ile kalamar dev aksonundan sodyum akımlarını (I_{Na}) kaydetmiştir.

1980'lerin başında, sodyum kanallarının moleküler yapısı saflaştırma ve protein gibi çeşitli yöntemler ile aydınlatılmıştır. VGSC'ler astrositler, bağışıklık ve kanser hücreleri, mikroglia ve astrositler gibi olmak üzere uyarılmayan hücrelerde eksprese edildiği belirlenmiştir(Lopez-Charcas v.d., 2021).

Farklı kanserlerde hücrelerin voltaj kapılı iyon kanallarına sahip olduğu ve bu iyon kanallarının hücrelerin proliferasyon ve metastatik süreçlerinde rol aldığı belirlenmiştir. Bunlardan voltaj kapılı potasyum kanalları hücre proliferasyonunu kontrol ederken VGSC'lerin meme, kolon, serviks, akciğer, protast gibi epitel kökenli karsinomalarda ekspresyonları yüksektir. Dolayısıyla hücrelerin istila ve göçünü artırarak metastaza yol açarlar (Laniado v.d., 1997; Fraser v.d., 2005; House v.d., 2010; Campbell v.d., 2013; Fraser v.d., 2014).

VGSC'ler, por oluşturan α (220-260 kD) ve por oluşturmeyen β (33- 36 kD) olmak üzere iki farklı alt birimden oluşur. α alt birimi dört alan olmak üzere her biri altı trans membran segmentten oluşur (Şekil 2.7) (Beneski ve Catteral 1980; Nelson v.d., 2015; Bouza v.d., 2018).



Şekil 2. 7.Voltaj kapılı sodyum kanalı (Bouza v.d.; 2018).

Her alanın dördünde transmembran segmentinde voltaj sensörü bulunur. Bir veya iki gözenek oluşturuçu olmayan $\beta 1$ - $\beta 3$ ve $\beta 2$ - $\beta 4$ alt birim içerirler. Bu alt birimler $\beta 1$ veya $\beta 3$ ve $\beta 2$ veya $\beta 4$ sahip olan heteromerik protein kompleksidir (Tablo 2.1) (Nelson v.d., 2015; Yang v.d., 2016; Bouza v.d., 2018).

$\beta 1$ - $\beta 4$ 'ün tümü, hücre dışı immünoglobulin (Ig) halkası ve tek bir transmembran alanı içerir. Hücre yapışma molekülleri olarak işlev görürler. Kanal geçişini modüle ederler (Bouza v.d., 2018). VGSC'lerden gerçekleşen sodyum akışı nöronlarda ve kas hücrelerinde depolarizasyondan sorumludur. VGSC'lerin alt birimleri merkezi sinir sistemindeki hücre çoğalması, nöronal yol bulma, organogenez, nörit büyüme ve göç gibi merkezi sinir sistemindeki olayları düzenler (House v.d., 2010; Martin v.d., 2015).



Tablo 2.1.VGSC'ler, α ve β alt birimleri (Bouza v.d., 2018).

| VGSC α | | VGSC β | |
|---------------|---------|---------------|------------|
| alt birimleri | | alt birimleri | |
| Gen | Protein | Gen | Protein |
| <i>SCN1A</i> | Nav1.1 | <i>SCN1B</i> | $\beta 1$ |
| <i>SCN2A</i> | Nav1.2 | <i>SCN1B</i> | $\beta 1B$ |
| <i>SCN3A</i> | Nav1.3 | <i>SCN2B</i> | $\beta 2$ |
| <i>SCN4A</i> | Nav1.4 | <i>SCN3B</i> | $\beta 3$ |
| <i>SCN5A</i> | Nav1.5 | <i>SCN4B</i> | $\beta 4$ |
| <i>SCN8A</i> | Nav1.6 | | |
| <i>SCN9A</i> | Nav1.7 | | |
| <i>SCN10A</i> | Nav1.8 | | |
| <i>SCN11A</i> | Nav1.9 | | |

Memelilerde işlevsel VGSC α alt birimlerinin aminoasit düzenlenmesinde dokuz farklı gen tarafından kodlanan (SCN1A- SCN11A) dokuz VGSC alt tipi (Nav 1.1- Nav 1.9) bulunmaktadır (Tablo 2.1). Ayrıca bir tane de işlevsel olmayan alt tipi (Nax) kodlanmaktadır. Bunlar; izoform olarak (Nav 1.1 ve Nav 1.2, merkezi sinir sisteminde (Nav 1.3 ve Nav 1.6), iskelet ve kalp kasında (Nav 1.4 ve Nav 1.5) ve periferik sinir sisteminde (Nav 1.7 , Nav 1.8 ve Nav 1. 9) bulunur (Suy v.d., 2012; Brackenbury v.d., 2014; Fraser v.d, 2014; Martin v.d., 2014; Martin v.d., 2015; Ohta v.d., 2017; Lopez-Charcas v.d., 2021).

VGSC ekspresyonu ile metastatik potansiyel arasında ilişki saptanmış ve meme kanseri hücrelerinde Nav 1.5 ekspresyonu ile artan nüks ve metastaz arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (Fraser v.d., 2005; Yang v.d., 2012). Dolayısıyla VGSC α alt birimlerinin ekspresyonunun migrasyon, invazyon ve metastazı ilerlettiği belirlenmiştir (Brackenbury v.d., 2012). Aslında pek çok kanser hücresi birden fazla α alt birimi ekprese eder. Çoklu α alt birimlerini ifade eden kanserlerde baskın bir α alt birim tanımlanmıştır. Meme kanseri hücrelerinde en yüksek oranda ekprese edilen α

alt birimi Nav 1.5'tir (Gen: SCN5A) (Fraser v.d., 2005). Prostat kanseri hücrelerinde ise, baskın α alt birimi Nav 1.7 (Gen: SCN9A) dir (Diss v.d., 2001).

Bazı kanserlerde ise α alt birim mRNA ve protein ekspresyon, doğrudan metastaz ile ilişkilidir. Örneğin; meme kanserinde neonatal SCN5A varyantı, MDA-MB-231 hücrelerinde, zayıf metastatik MCF-7 hücrelerine kıyasla yaklaşık 1800 kat daha yüksek eksprese edilmektedir. Hatta Na⁺ akımları yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde saptanırken MCF-7 hücrelerinde ise izlenmez (Roger v.d., 2003; Fraser v.d., 2005).

Prostatta baskın olan α alt birimi SCN9A'nın özellikle prostat kanseri biyopsilerinde yükseldiği ve yüksek metastatik PC-3 (insan) ve Mat-Lylu (sıçan) hücrelerinde, zayıf metastatik LNCaP ve AT-2 hücrelerine oranla daha fazla eksprese edildiği saptanmıştır (Diss v.d., 2005).

2.7.1. Prostat Kanserinde Sodyum Kanalları

VGSC kanalının kanserdeki etkisi ile ilgili ilk rapor prostat kanserinde zayıf ve yüksek metastatik sıçan prostat hücre hattında gerçekleştirilmiştir. Na⁺ akımları yüksek metastatik Mat-Lylu hücrelerinde tanımlanırken, AT-2 hücrelerinde tanımlanmamıştır. İlk kez %30 oranındaki istila yüksek derecedeki metastatik Mat-Lylu hücrelerinde azaltılmıştır. Ayrıca insan ve sıçanda yüksek oranda bulunan metastatik hücre hattı eksprese edilmiştir. Bu eksprese durumu SCN9A geninden kodlanan por oluşturucu Nav 1.7 alt birimi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kanserli olmayan Nav 1.7 ve PCa örnekleri ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır (Grimes v.d., 1995).

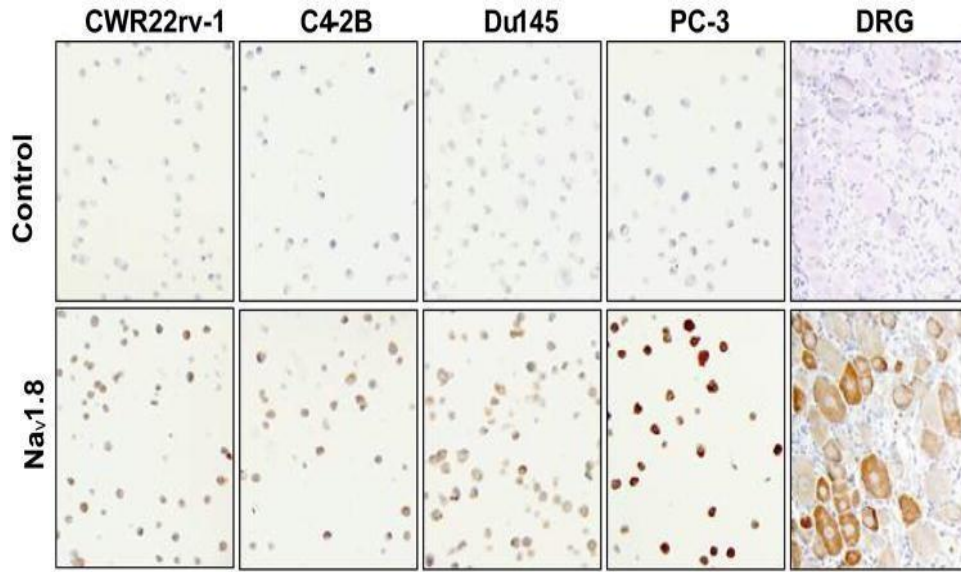
Sodyum kanal blokleri olan tetradoksin (TTX) ile prostat kanseri üzerinde yürütülen çalışmalarda 600 nM-1 μ M TTX'in hücrelerin proliferasyonu üzerinde etki göstermezken VGSC'leri bloke ederek, hücrenin metastaza gidişinden sorumlu olan lateral motilite ve invazyonu baskıladığı tespit edilmiştir. Ancak düşük metastatik AT-2 hücreleri üzerinde böyle bir etki oluşturmamıştır (Grimes v.d., 1995; Fraser v.d., 2003). Benzer bir sonuç insan prostat hücreleri PC-3 ve LNCaP hücrelerinde de elde edilmiştir (Laniada v.d., 1997). Hücrelerin motilitesini yara kapanması (wound-heal)

yöntemi ile inceleyen Fraser v.d. (2003) 1 µM TTX'in Mat-Lyly hücrelerinin lateral motilitesini % 47 oranında inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Mat-Lyly ve AT-2 hücreleri ile yapılan ve in vivo bir çalışmada hücrelerin Kopenhag sıçanlara inoküle edilmesi ile Dunning model prostat kanseri oluşturulmuş ve metastazı engellemek üzere yapılan TTX tedavisi sonrası sıçanların akciğer metastazlarının % 44 oranında azaldığı ve TTX ile tedavi edilen hayvanların yaşam sürelerinin % 22 oranında arttığı gözlemlenmiştir (Yıldırım v.d., 2012).

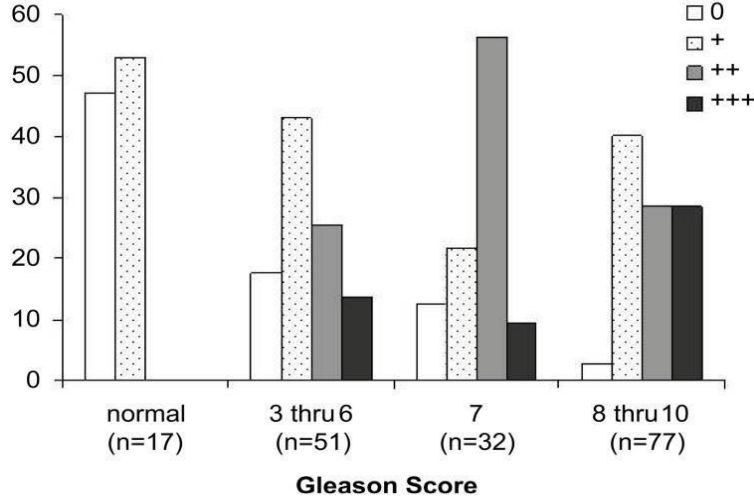
İnsan prostat kanseri hücre soylarında yüksek orandaki Nav 1.8 ekspresyonunun, ilerleyen Gleason skoru ile prostat kanseri dokularında artış artmadığı araştırılmıştır. Hormona bağımlı ve bağımsız hücreler kullanılarak immüno sitokimyasal analizi, Nav

1.8 antikorunun özgüllüğü ve peptit inhibisyonu ile doğrulanmıştır. (Şekil 2.8)



Şekil 2.8. İnsan prostat kanseri hücre dizilerinin Nav 1.8 immüno histokimyasal analizi (Suy v.d., 2012).

Nav 1.8 boyama yoğunluğu(0-3) ile Gleason skorunun dağılımı arasındaki ilişki Şekil 2.9'de verilmiş ve yüksek Nav 1.8 immüno reaktivitesine (2+ ve 3+) sahip prostat kanseri örneklerinin yüzdesi, Gleason skoru arttıkça artmıştır. Düşük Nav 1.8 immüno reaktivitesine sahip prostat kanseri örneklerinin yüzdesi ise, Gleason skoru arttıkça azalmıştır (Suy v.d., 2012).



Şekil 2.9.Nav 1.8 boyama yoğunluğu ile Gleason skoru arasındaki ilişki (Suy v.d., 2012).

VGSC'ler farklı hücrelerde farklı fizyolojik rollere sahiptir ve bu fonksiyonlarında oluşan bazı düzensizlikler hastalıklara sebep olmaktadır. Bu hastalıkların hepsi kanolopatik hastalıklar olarak adlandırılırlar. Sinir, kas hücreleri gibi uyarılabilir hücrelerin yanı sıra lenfosit, glia, fibroblast, epitel kökenli kanser hücrelerinde de VGSC ekspresyonunun bulunduğu bilinmektedir (Diss v.d., 2004).

Prostat kanserinin allogreft modelinde tetradoksin akciğer metastazını inihibe etmiştir. PCa hücrelerinde, PHT ve karbamazepin hem interlökin hem de PSA salgılanmasını azalttığı görülmüştür. Yine antiepileptiklerden valproatın PSA ve interlökin salgılanmasını daha az inihibe ettiği bulunmuştur. Böylece prostat kanseri hücre proliferasyonunu üç ilacında inihibe ettiği görülmüştür (Martin v.d, 2015).

14,6 µg/kg gabapentinin etkisi AT-2 hücre hattında denenmiştir. Ancak primer tümörünün gelişimi ve ağırlığı üzerinde hiçbir etkisi görülmemiştir. İn vitro deneylerde 20 µM gabapentinin Mat-LyLu hücrelerinin çoğalması üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür. Buna karşın istilacılığı %31 oranında arttırdığı bulunmuştur (Bugan v.d., 2015).

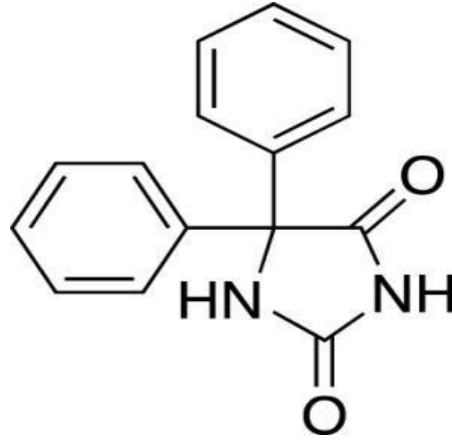
Volproik asitin prostat kanseri hücrelerinde hücre göçünü inihibe ettiği bulunmuştur. Aynı zamanda E-cadherin proteinin yukarı regülasyonu ve hücre göçü inhibisyonu görülmüştür (Zhang v.d., 2011). Volproik asit hem PC3 hem de DU145 prostat kanseri hücre hatlarında doza bağlı olarak istilacılığı önemli ölçüde bastırmıştır ($P < 0.05$) (Jiang v.d., 2013).

Resveratrol, Mat-Lyly hücrelerinde VGSC aktivitesini bloke ederek in vitrometastatik etkiyi inhibe etmiştir. Böylece doğal bir fenolik bileşik olan anti metastatik ajan olarak önerilmiştir (Fraser v.d., 2014).

2.8. Fenitoin (PHT)

Fenitoin, epilepsi hastalarında monoterapi olarak kullanılan anti epileptik bir ilaçtır. Nörotransmitter reseptörlerine bağlanarak iyon kanallarını bloke eder. Ayrıca nörotransmitterlerin geri alınımı ya da metabolizmasını da inhibe eder (Nevitt S.J. v.d., 2019).

Fenitoin ($C_{15}H_{12}N_2O_2$) epileptik nöbet önleyici aromatik bir hidantondur (Kumar v.d., 2013; Patocka v.d., 2020) (Şekil 2.9). İlk kez 1908'de alman kimyager Heinrich Biltz tarafından sentezlenmiş ve 1938'de ve H. H.Merritt tarafından, antikolüvazan olarak kullanılmıştır. Hidanton türevidir olan fenitoin, (5,5-difenil hidantoin, 5,5'-difenil imidazolidin-2,4-dion); alkali hidroksitlerde, alkolde, asetonda ve asetik asitte çözünür. Suda az çözünür (32 mg/L), ışığa duyarlı olup, kokusuz ve tatsızdır.



Şekil 2.10. Fenitoinin kimyasal yapısı (Patocka v.d., 2020).

Fenitoin, oral veya parenteral yolla uygulanmaktadır. Oral uygulama ile daha iyi emildiği görülmektedir. Emilimi duodenumda gerçekleşir. Kan-beyin bariyerini ve plasentayı kolayca geçer. Plazma konsantrasyonlarının maksimum etkisine 4 ile 8 saatte ulaşır. Plazma albüminine yüksek oranda (~%90) bağlanır.

Serebral korteksin motor alanı üzerinde seçici inhibitördür. Nöronalrefrakter periyodu uzatmak için Na⁺ kanalının inaktive durumuna bağlanır. Fenitoinin anti epileptik etkisi, beyin hücre zarlarının işlevini stabilize eder. Beyindeki inhibitör nörotransmitter serotonin ve γ -amino bütirik asit düzeylerini artırarak gösterebilir. Kardiyak dokuda fenitoin, atrium ve ventrikülü nektopik ritmini inhibe eder. Atrioventriküler düğümün iletimini hızlandırarak miyokardiyal otonomiye azaltır. Böylece antiaritmik bir etki üretir (Patocka v.d., 2020).

2.8.1. Etki Mekanizması

Fenitoin, voltaj kapılı bir sodyum kanal blokeridir. Sodyum kanalının inaktif durumunu stabilize eder. Aynı zamanda nöronal periyodu uzatarak etkisini gösterir. Bu etki aracılığıyla fenitoin, insanlarda çeşitli sistemlerin biyoelektrik aktivitelerini düzenler. Kas ve sinir hücrelerindeki anormal elektriksel aktiviteyi ya ortadan kaldırır ya da inhibe eder (Ohta v.d., 2017; Patocka v.d., 2020). Bu etki elektrofizyolojik temeli, sodyum, potasyum ve kalsiyumun trans membran hareketinin ve hücre içi dağılımının düzenlenmesini içerir. Fenitoin nöronların hızla inaktive olan kalsiyum kanallarını hem inhibe eder hem de akışını engeller. Bu mekanizma ile fenitoin, sinapsta kalsiyum bağımlı çoklu nörotransmitterlerin iletimini ve sinaptik sonrası tepkileri etkiler.

Karaciğer ilaç enzim sisteminde metabolizmayı uyarır. Endokrin bez hücrelerinin hormon salgılanmasını düzenler. Yüksek yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu arttırır. Yüksek potasyum depolarizasyon durumunda dinlenme potansiyelini artırabilir. Asetilkolin, dopamin, serotonin, γ -amino bütirik asit norepinefrin ve endorfinler gibi nörotransmitterleri düzenler. Fenitoin, yüksek konsantrasyonda γ -aminobütirik asit reseptör proliferasyonunu indükler. Fenitoinin terapötik aralığı darve orta derecede toksiktir. Karaciğer enzimleri tarafından metabolize edildikten sonra böbrekler tarafından atılır (Patocka v.d., 2020).

MDA-MB-231 meme tümörü hücrelerinde metastazı inhibe etmiştir. Nav 1.5 VGSC'de baskın olmasına karşın Nav 1.7'ye de katkı sağladığı görülmüştür. Böylece prostat kanseri hücrelerinde de migrasyon ve sekresyonu inhibe etmiştir. Aynı zamanda fenitoin tedavisi dalak ve akciğerdeki metastaz hücrelerinde azalmaya neden olmuştur (Nelson v.d., 2015).

Agresif bir kanser türü olan küçük hücreli akciğer kanseri antidiüretik hormon üreten nöroendokrin tümörlerinden birisidir. Fenitoin, antidiüretik hormon sendromunun tedavisinde etkili olmuştur. Ancak fenitoinin küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde etkili olup olmadığı bilinmemektedir (Ohta v.d., 2017).

Fenitoinin ulaşılabilir konsantrasyonlarda fonksiyonel VGSC'ye (özellikle Nav 1.5) bağımlı göçü ve istilayı engeller. Ancak fenitoinin meme kanseri hücre soyu olan metastatik olmayan MCF-7 üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Ayrıca Nav 1.5'i kodlayan SCN5A'nın verilerinde meme kanseri örneklerinde invaziv/metastatik fenotipi desteklemiştir (Yang v.d., 2012). PHT'nin MCF-7 hücrelerinin büyümesini %47 oranında azalttığı görülmüştür (Olsen v.d., 2004). Böylece Nav 1.5 ekspresyonunun metastatik insan meme kanseri hücreleri ve dokularında yukarı regüle edildiği ve aktivitesinin *in vitro* olarak hücre hareketliliği ve istilayı güçlendirdiği görülmüştür. Lenf nodu metastazı da dahil meme kanseri ile korele olduğu verilerle gösterilmiştir (Fraser v.d., 2015).

Lu-165 akciğer hücreesindeki antidiüretik hormon mRNA seviyeleri 25 µg/mL dozlarında fenitoinin 48 saatlik tedavisinden sonra azalmıştır. Fenitoin içermeyen grup (1,00 ± 0,36) ile 25 µg/mL (0,13 ± 0,04) dozlarında fenitoin uygulanan grup arasında antidiüretik hormon mRNA seviyeleri açısından anlamlı bir fark görülmüştür. 5 µg/mL dozunda fenitoinin 48 saatlik tedavisi, 10 ve 20 mEq/L'de ilave sodyum ile sodyum yüklemesinde Nav 1.3 mRNA seviyelerini azaltmıştır (p<0.05) (Ohta v.d., 2017).

Literatürde PHT ve TTX'in yüksek metastatik olan Mat-Lyly hücre soyunda hareketlilik indeksini azalttığı görülmüştür. 1 µM TTX ve 50 µM PHT'nin bu hücre hattındaki hareketlilik indeksini % 47 ve %11 oranında azaltmıştır (Fraser v.d., 2003).

PHT'nin prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma bulunmakta ve Fraser ve arkadaşları (2003) bu çalışmalarında 200 µM a kadar

PHT'nin 48 saat süreyle uygulanması sonucu toksik etki göstermediğini belirtmişlerdir. 200 μM PHT hem yüksek metastatik Mat-LyLu hem de düşük metastatik AT-2 hücrelerinin proliferasyonunu azaltırken, 100 μM PHT sadece ayrıca MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonu inhibe etmiştir (Fraser v.d., 2003).

Prostat kanserinin allogreft modelinde tetradoksin akciğer metastazını inhibe etmiştir. PCa hücrelerinde, PHT ve karbamazepin hem interlökin hem de PSA salgılanmasını azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda valproatın PSA ve interlökin salgılanmasını daha az inhibe ettiği bulunmuştur. Böylece prostat kanseri hücre proliferasyonunu üç ilacında inhibe ettiği görülmüştür (Martin v.d, 2015).

pII hücre hattının hücre hareketliliği üzerinde TTX'in hiçbir etkisi görülmemişken; 50 μM ve 100 μM PHT'de %8-10 inhibitör etki göstermiştir (Muhammed v.d., 2016).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada Dunning sıçan prostat adeno karsinomasından türevlenmiş olan yüksek metastatik Mat-LyLu ve düşük metastatik AT-2 hücre hattı kullanılmıştır. Bu iki hücre hattı laboratuvarımızda in vitro olarak pasajları alınıp dondurulmuştur. Hücreler % 10 fetalbovin serum, % 1 L-glutamin, 250 nM deksametazon ilave edilerek hazırlanan Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Gibco) kültür medyumunu içerisinde, %5 CO₂'li ve 37°C'de inkübatörde yetiştirilmiştir (Bugan v.d., 2016).

3.2. Farmakolojik Ajanların Hazırlanması

Steril sodyum hidroksitte çözülen PHT (Sigma), 100 mM'lık stok solüsyon elde edildikten sonra -21°C de saklanmıştır. Deney esnasında stok solüsyondan kullanılacak olan 1 µM ve 2 µM PHT konsantrasyonlar medyum ile seyreltilerek hazırlanmış ve taze olarak kullanılmıştır.

TTX, spesifik VGSC blokeridir. Pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Yıldırım v.d., 2012). 1 mg toz haldeki TTX, 1 ml distile su ile çözülerek 3 mM'lık stok solüsyon elde edilmiştir. Hazırlanan stok solüsyon stabilitesini korumak için ependorflara bölünerek -21°C de saklanmıştır.

3.3. Hücrede Büyüme

AT-2 ve Mat-LyLu hücrelerinin büyüme eğrilerini belirleyebilmek için büyüme deneyi yapılmıştır. Hücrelerin 24. ve 48. saatteki büyüme eğrisini saptamak üzere MTT yöntemi kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu hücre pleytinin her bir kuyucuğuna 2×10^3 , 4×10^3 , 6×10^3 , 8×10^3 , 10×10^3 , 12×10^3 ve 14×10^3 hücre olmak üzere farklı sayıda hücre ekimi yapılmıştır. Kültür medyumları her 24 saatte değiştirilmiştir. 24. ve 48. saat sonunda kuyucuklardaki medyumlar çıkarılarak, 100 µl'lik 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) eklenmiş ve pleytler dört saat karanlıkta tutulmuştur. Bu süreç içerisinde sarı renkli olan tetrazolyum tuzu mitokondri aktivitesine bağlı olarak mor renkli formazan kristallerini oluşturur. 37°C de dört saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklardaki MTT solüsyonu atılarak

89 µl dimetil sülfoktit (DMSO) (Sigma) ve 11 µl glisin tamponu ilave edilmiştir. Mevcut hücrelerin canlılığına göre oluşan mor formazan kristalleri DMSO ve glisin eklenmesi ile pembemsi bir rengi oluşturur. Tüm kuyucuklar, 570 nm dalga boyunda mikro plaka absorbans okuyucusunda (iMark TM Bio Rad) okunmuştur. Her hücre hattı için deney, minimum üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen absorbans değerlerine göre hücre sayısı ile zamana bağlı olarak büyüme grafiği çizilmiş, korelasyon belirlenmiştir.

3.4. Toksikite

PHTnin AT-2 ve Mat-LyLu hücreleri üzerinde toksik etkisinin bulunup bulunmadığı saptanmıştır. Altı kuyucuklu hücre kültürü pleytlerin her bir kuyucuğuna 3×10^4 hücre ekilmiştir. Tripan mavisi metodunda pleytler 37°C sıcaklıktaki % 5 CO_2 'li inkübatörde tutulmuştur. Hücrelerin ekimini takiben 24. saatte mikroskop altında hücreler kontrol edildikten sonra, deney grubundaki hücrelere 1 µM, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonlarda PHT içeren deney medyumları, kontrol grubundaki hücrelere ise normal kültür medyumları uygulanmıştır. 24 saat sonra medyumlar tazeleri ile değiştirildikten sonra, toplam 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda deney medyumları çıkartılmış, 0,8 ml kültür medyumları ve 0,2 ml tripan mavisi ile 10 dakika bekletilmiştir. Petrillerdeki tripan mavisi içeren medyum inkübasyon süresi sonunda atılarak FBS içermeyen taze medyum eklenmiştir. İvert mikroskopta 40x büyütme objektif ile her kuyucuktaki 40 farklı alandaki canlı ve ölü hücrelerin sayımı yapılmış, ölü hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. Deneyler her hücre soyu için en az üç tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir.

3.5. Hücre Proliferasyonu

Farklı konsantrasyonlardaki PHT'nin düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik MAT-LyLu hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkisi, kolorimetrik 3-(4,5-Dimetil tiazol-2yl) – 2,5 – Difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 96 kuyucuklu kültür pleytlerinin her bir kuyucuğuna 3×10^4 hücre ekilmiştir. 24 saat boyunca kültür medyumları ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kontrol grubuna kültür medyumları, diğer gruplara ise 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100µM konsantrasyonlarında PHT içeren deney medyumları eklenmiştir. PHT uygulanmış örneklerin ve kontrol gruplarının, 24 ve 48

saat sonunda ölçümleri yapılmak üzere, her bir kuyucuktaki medyum çıkarılarak yerine MTT solüsyonu konulmuştur. 37°C’de 4 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklardaki MTT solüsyonu atılarak 89 µl dimetil sülfoktit (DMSO) (Sigma) ve 11 µl glisin tamponu eklenmiştir. DMSO ve glisin eklendikten sonra boya absorbansı mikropılaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Proliferasyon deneyinde her grup için 3 kuyucuk kullanmıştır. Deneyler, minimum üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. Kontrol grubundan elde edilen değerler (1) kabul edilerek, deney grupları normalize edilmiştir ve istatistik analizleri yapılmıştır. Düşük ve yüksek metastatik özellikteki prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine PHT'nin etkisi 24. ve 48. saatlerde değerlendirilmiştir

3.6. Lateral Hücre Hareketi (Motilite=Migrasyon)

Düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-LyLu prostat kanseri hücre hatlarının lateral hareketini (migrasyon) in vitro olarak incelemek üzere 'woundhealing' yara iyileşme deneyi uygulanmıştır (Fraser vd., 2003). Kontrol, TTX ve deney grupları oluşturulmuştur. Deney öncesinde 35 mm'lik petrielerin alt kısmına birbirine paralel 15 paralel çizgi, bu çizgilere dik 3 paralel çizgi çizilmiştir. Her bir petriye 30×10^4 hücre ekilmiştir. Her bir hücre hattı için kontrol, TTX ve hücrelerin proliferasyonunu etkilemeyen konsantrasyonlardan 1 µM ve 2 µM PHT içeren deney grubu olmak üzere dört grup petri oluşturulmuştur. Tüm gruptaki hücrelere normal kültür medyumunu ilave edilmiştir. Ekimden 24 saat sonra steril pipet ucu ile 'yara' açılmıştır. Yaranın açıldığı gün 0. saat olarak kabul edilip çizgilerin kesiştiği noktalardaki yara genişlikleri, mikrometrik oküler ile invert mikroskopta ölçülmüştür. 0. saatteki yara genişliği (W0) kaydedilmiştir. Ölçüm sonrasında gruptan kontrol grubuna normal kültür medyumunu, pozitif kontrol olarak TTX ile 1 µM ve 2 µM PHT medyumları taze şekilde ilave edilmiş, 24. ve 48. saatlerde yara genişlikleri (Wt) yeniden ölçülmüştür. Elde edilen değerler $MI = 1 - (Wt - W0)$ formülünde yerine konularak migrasyon indeksi (motilite indeksi=MI) hesaplanmıştır. (W0, 0. Saatteki yara genişliği; Wt ise, 24. veya 48. saatlerdeki yara genişliği) (Fraser v.d, 2003). Her grup için üç petri kullanılmıştır ve deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.7. Apoptotik Hücre Ölümü

PHT'nin düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerin apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde, floresan yöntemi uygulanmıştır. Hücre ölümü

üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile propidyum iyodür ile boyama gerçekleştirilmiştir. 5×10^4 hücre on iki kuyucuklu pleytlere ekilmiş ve 24 saat boyunca kültür medyumunu ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kontrol grubuna normal kültür medyumunu, diğer gruplara ise, TTX ile 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarında PHT içeren deney medyumları eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Hücrelerin her biri için ışık ve floresan mikroskobunda çekimi yapılmıştır. Görüntüler 20x büyütme ile alınmıştır. Floresan çekim öncesi hücrelere 2 μ L propidyum iyodür eklenip, oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnvirt, floresan mikroskobunda ölü hücreler sayılarak grafik çizilmiştir.

3.8. Koloni oluşumu

Her iki hücre hattının koloni oluşumları üzerine PHT'nin etkisi, koloni oluşum testi ile değerlendirilmiştir. Koloni oluşum testinde altılı hücre kültür pleyti kullanılmıştır. Her kuyucuğa 500 hücre ekilmiş ve bir gece kültür medyumunu ile inkübe edilmiştir. 24. ve 48. saatlerde kontrol grubu kültür medyumunu ile deney grupları ise, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M'lik PHT ile, pozitif kontrol olarak 600 nM TTX içeren medyum ile değiştirilmiştir. 48 saat sonunda tüm gruplardaki medyumlar çıkarılarak hepsine normal kültür medyumunu eklenmiştir. Hücreler büyümeye bırakılmıştır. 7. gün sonunda tüm medyumlar çıkarılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır. Koloni oluşturan hücreler metanol/asetikasit (3/1) ile 5 dakika boyunca tesbit edilmiştir. Metanol/asetik asit çıkarıldıktan sonra % 0.5 kristal viyole ile 15 dakika boyanmıştır. Distile su ile yıkanıp, oda sıcaklığında karanlıkta kuruyuncaya kadar beklenmiştir. İnvirt mikroskopta 4x objektifte rastgele 40 farklı alandaki koloni sayıları saptanarak grafikleri çizilmiştir. Deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.9. İstatistiksel Analiz

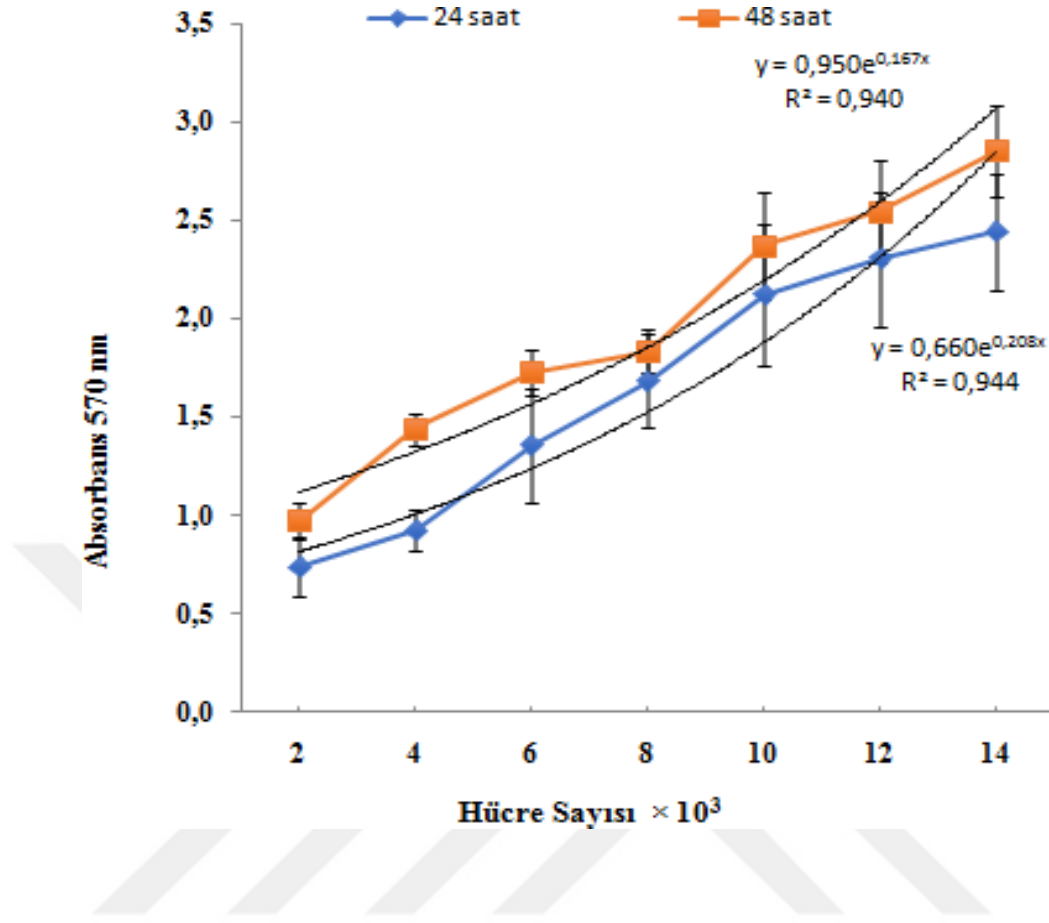
Tüm deneylerden elde edilen veriler, grupların aritmetik ortalamaları ve standarthata (\pm SE) şeklinde verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için t-testi ve paired t-testi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda $P < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Yapılan bu çalışmada, antiepileptik bir ilaç olan PHT'nin, Dunning model prostat kanseri yüksek metastatik Mat-Lylu ve düşük metastatik AT-2 hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu apoptotik hücre ölümü ile koloni oluşumu üzerine etkisi in vitro olarak araştırılmıştır. Mat-Lylu hücrelerinde artan Nav 1.7 ekspresyonu PHT'nin etkisi lateral hücre hareketi/migrasyon ile değerlendirilmiştir.

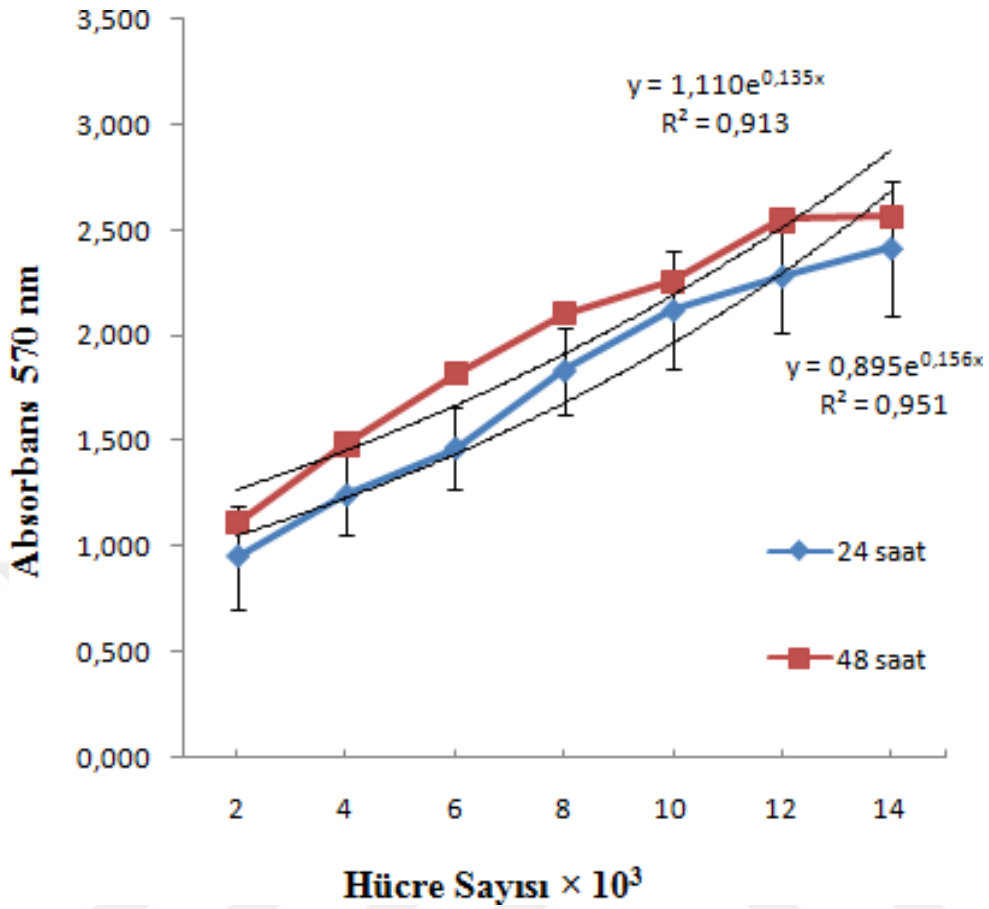
4.1. Hücrede Büyüme

PHT'nin etkisi gözlemlenmeden önce hem düşük metastatik AT-2 hem de yüksek metastatik Mat-Lylu hücrelerinin in vitro ortamda büyüme özellikleri belirlenmiştir. Farklı sayıda ekilen hücreler ile absorbans arasındaki ilişki, 24. ve 48. saatlerde saptanarak, büyüme eğrisi çizilmiş ve doğru denklemi elde edilmiştir (Şekil 4.1) Şekilde verilen büyüme eğrileri incelendiğinde araştırılan her iki saatte de Mat-Lylu hücre sayısının artışına bağlı olarak absorbansında arttığı görülmektedir. Mat-Lylu hücrelerinin büyüme eğrisindeki 24. ve 48. saatteki korelasyon katsayısı sırasıyla 0,944 ve 0,940 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.1.Mat- LyLu hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki ve doğru denklemi.

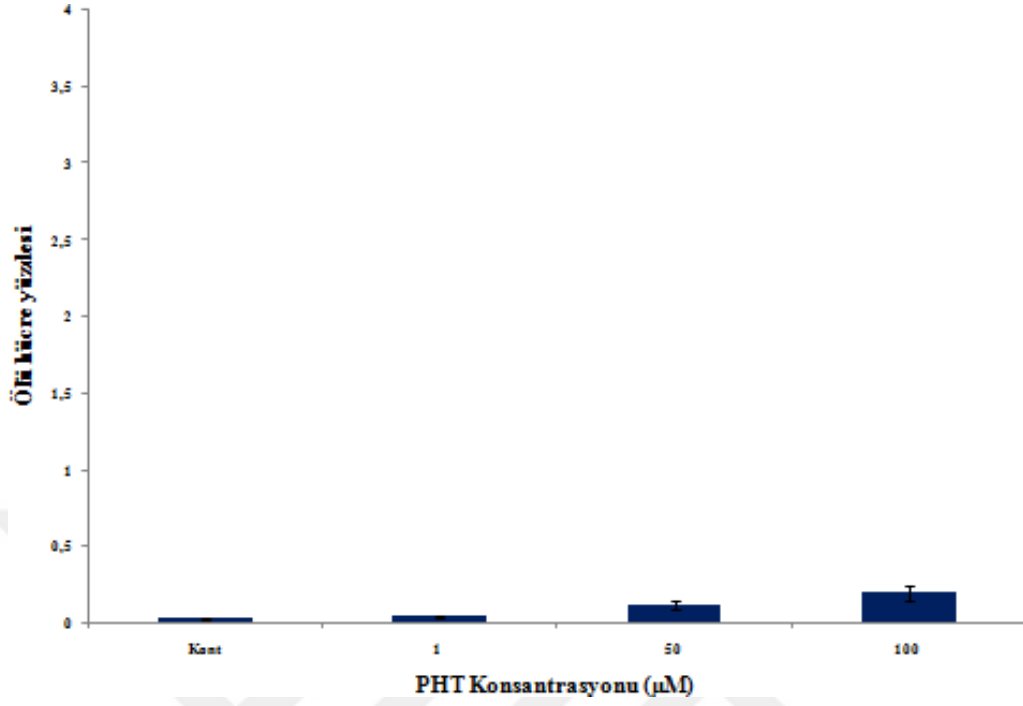
Düşük metastatik AT-2 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki hücre sayısı ile absorbansı arasındaki ilişki Şekil 4.2'de verilmiştir. Büyüme eğrileri incelendiğinde, her iki saatte de absorbansın hücre sayısı ile doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. AT-2 hücrelerinin büyüme eğrisindeki 24. ve 48. saatteki korelasyon katsayısı sırasıyla 0,951 ve 0,913 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.2. AT-2 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbansı arasındaki ilişki ve doğru denklemi.

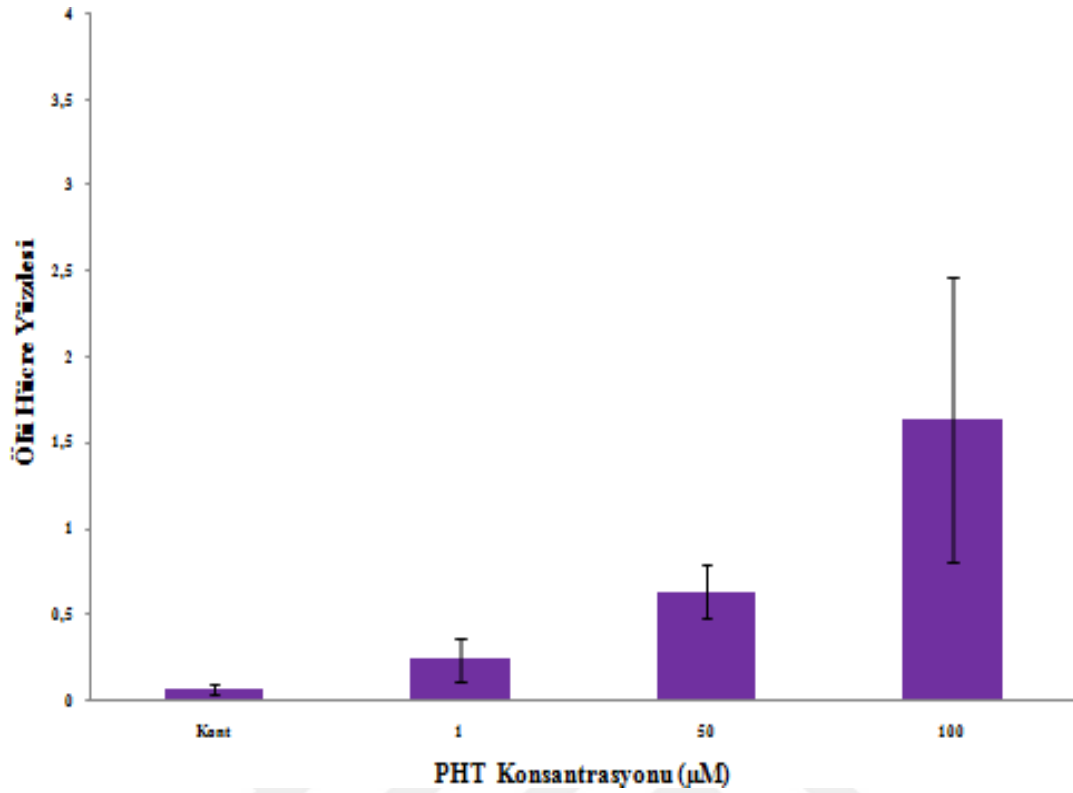
4.2. Hücrede Toksikite

PHT'nin düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-Lylu prostat kanseri hücre soyları üzerinde toksik etkisinin bulunup bulunmadığı tripan mavisi yöntemi ile belirlenmiştir. Mat-Lylu hücre soyu ile yapılan deneylerde saptanan ölü hücre yüzdesine göre, 1 µM PHT'nin kontrol grubuna oranla toksik bir etki göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.3). 100 µM PHT grubunda ölü hücre yüzdesi biraz artış gösterse de, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir etki göstermediği toksik olmadığı izlenmektedir.



Şekil 4.3.PHT'nin Mat-Lyly hücreleri üzerine uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdeleri.

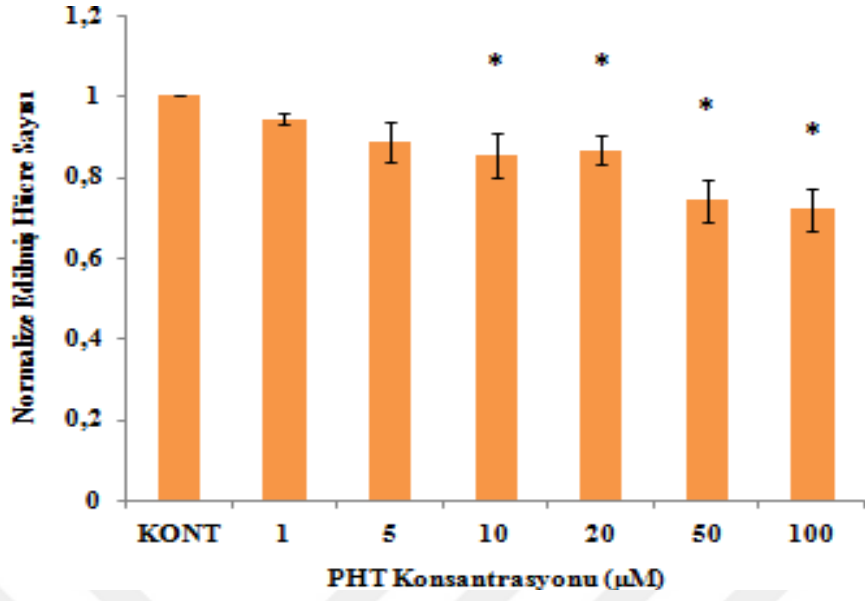
AT-2 hücreleri ile yapılan deneylerde de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ölü hücre yüzdesi konsantrasyon artışı ile artmakla birlikte toksik bir etki gözlemlenmemektedir (Şekil 4.3).



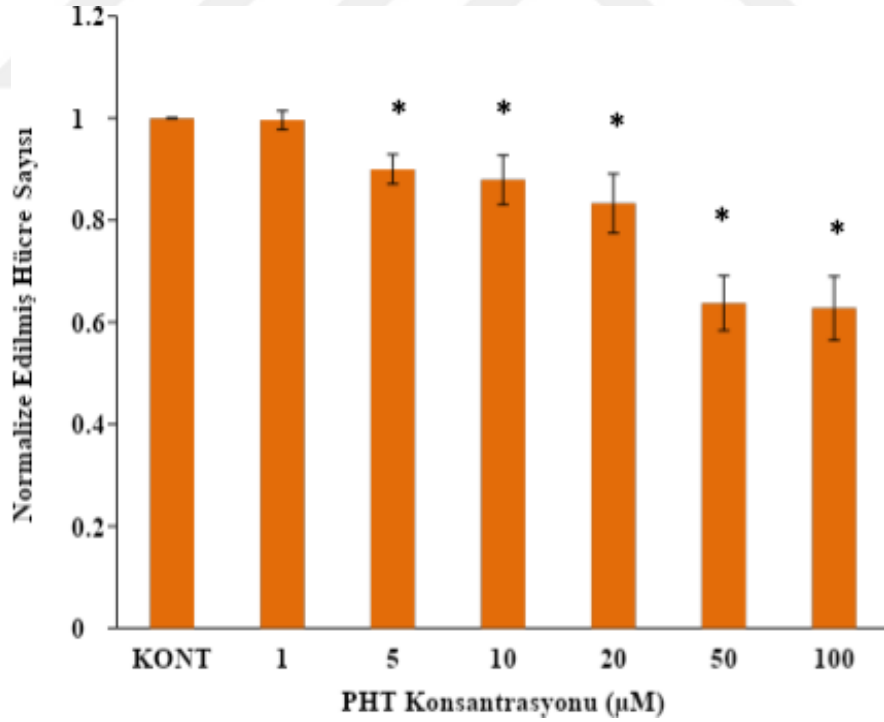
Şekil 4.4. PHT'nin AT-2 hücreleri üzerine uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdesi.

4.3. Hücre Proliferasyonu

PHT'nin belirlenen konsantrasyonları yüksek metastatik Mat-Lylü hücrelerine uygulanması ile elde edilen veriler normalize edilmiş hücre sayıları Şekil 4.5'te verilmiştir. Elde edilen Mat-Lylü hücre sayılarının 24. saatte kontrol grubu ile 1 µM ve 5 µM PHT uygulanan deney grupları arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir etki görülmediği ($P>0,05$) belirlenmiştir. Ancak daha yüksek konsantrasyonolan 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM PHT uygulanan grupların hücre proliferasyonunun ise kontrol grubuna oranla azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel bakımdan anlamlı ($P<0,05$) olduğu saptanmıştır. PHT'nin Mat-Lylü hücrelerine 48. saat uygulanması sonucunda ise kontrol grubuna oranla 5 µM ve üzerindeki tüm PHT konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu anlamlı olarak ($P<0,05$) azalmakta ve bu azalma PHT konsantrasyonunun artışı ile paralellik göstermektedir (Şekil 4.6).

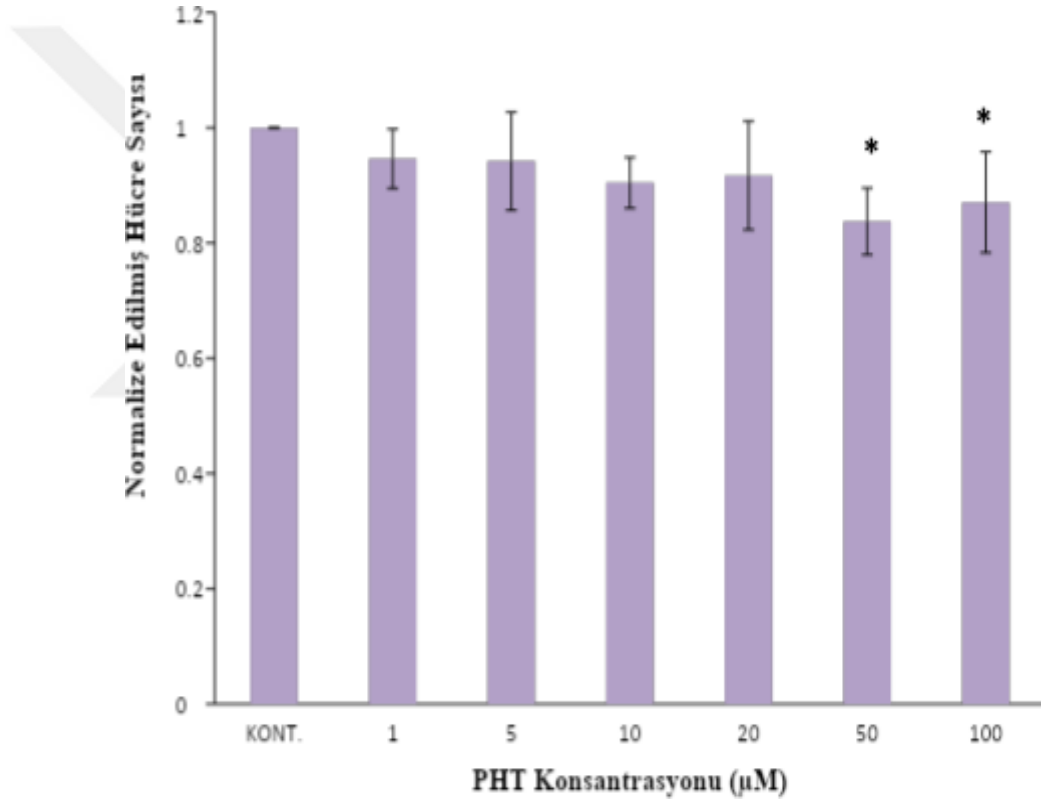


Şekil 4.5. Mat-Lyly hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda PHT'nin 24 saatsüreyle uygulanması sonucu (\pm SE) normalize edilmiş hücre sayıları (* P<0.05).

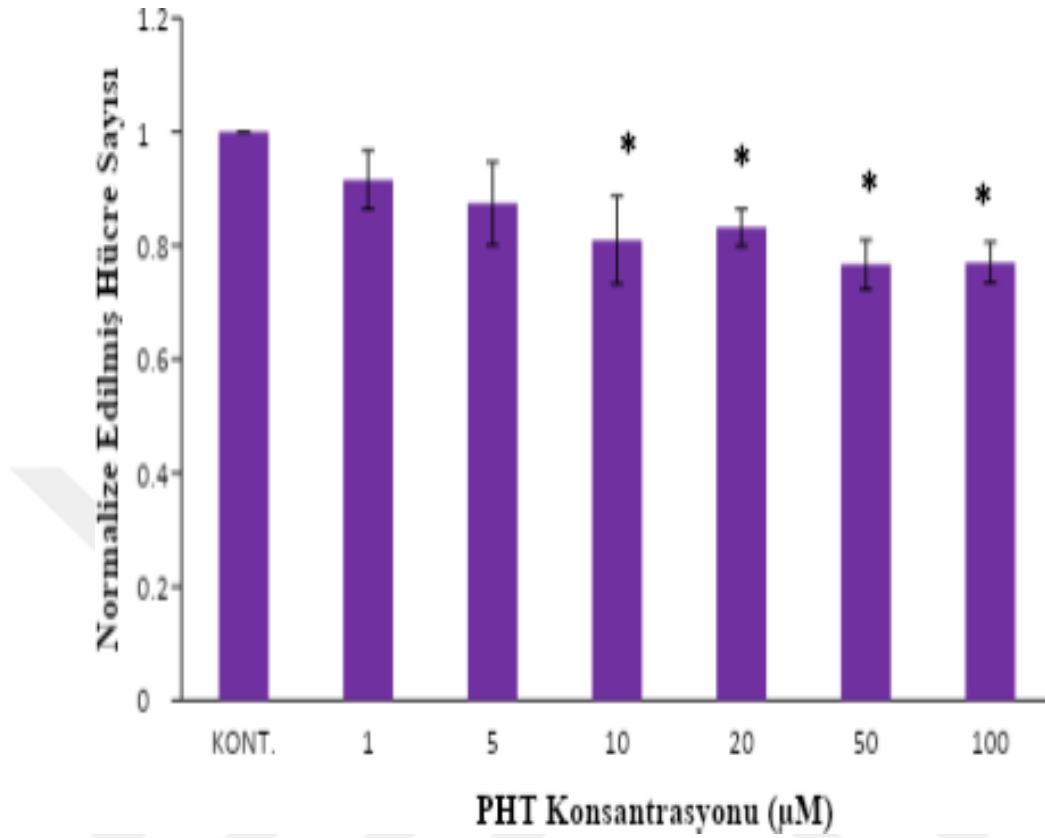


Şekil 4.6. Mat-Lyly hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda PHT'nin 48 saatsüreyle uygulanması sonucu (\pm SE) normalize edilmiş hücre sayıları (* P<0.05).

PHT'nin belirlenen konsantrasyonlarının düşük metastatik AT-2 hücrelerine 24 saat süre ile uygulanması sonucu elde edilen veriler ile ilişkisi Şekil 4.7'de verilmiştir. Elde edilen hücre sayılarına göre, 24. saatte kontrol grubu ile 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM PHT uygulanan deney grupları arasında istatistik bakımdan anlamlı bir fark görülmediği ($P > 0.05$) belirlenmiştir. Ancak PHT konsantrasyonu arttıkça hücre sayıları azalmakta ve 50 µM ile 100 µM PHT uygulanan grupta dabu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı ($P < 0.05$) olduğu saptanmıştır. PHT'nin AT-2 hücrelerine 48. saat süre ile uygulanması sonucunda 10 µM, 20 µM, 50 µM ve 100 µM PHT konsantrasyonlarında bu azalma ($P < 0,05$) olmaktadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7.AT-2 hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda 24. saat süre ile PHT uygulanması sonucu normalize edilmiş hücre sayısı (\pm SE)(* $P < 0.05$).



Şekil 4.8. AT-2 hücre soyu üzerine farklı konsantrasyonlarda 48. saat süre ile PHT uygulanması sonucu normalize edilmiş hücre sayısı (\pm SE) (* $P < 0.05$).

4.4. Lateral Motilite (Migrasyon)

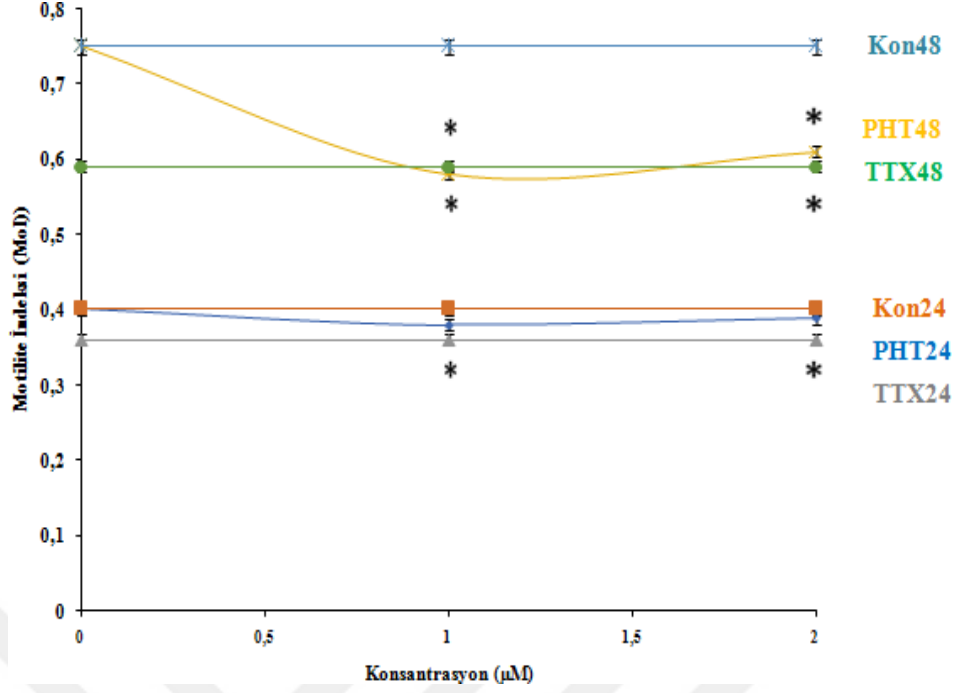
Düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-Lylu hücrelerinin migrasyonu üzerinde PHT'nin etkisini değerlendirmek üzere yara iyileşme testi uygulanmış, motilite indeksi ve motilite yüzdesi hesaplanmıştır.

Yüksek metastatik ve yüksek oranda VGSC ekspresyonu yapan Mat-Lylu hücrelerinin lateral hareketi/motilite indeksi üzerine PHT'nin etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Kontrol grubunda 24. saatte 0.40 ± 0.01 olarak belirlenen motilite indeksi, 48. saatte 0.75 ± 0.10 olarak saptanmıştır. VGSC blokeri olan ve deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan TTX ise, 24. saatte 0.36 ± 0.01 ve 48. saatte 0.59 ± 0.01 motilite indeksi ile kontrol grubuna oranla

hücrelerin lateral hareketini 24. ve 48. saatte sırasıyla % 10 ve % 21,33 oranında anlamlı ($P<0.05$) olarak azaltmıştır. Deney grubu motilite indeksi, 1 μM ve 2 μM PHT'de sırasıyla, 24. saatte $0,38 \pm 0,01$ ve $0,39 \pm 0,01$, 48. saatte ise, $0,58 \pm 0,01$ ve $0,61 \pm 0,01$ olarak saptanmıştır (Tablo 4.1). Yapılan istatistik değerlendirmelere göre, 1 μM ve 2 μM PHT uygulanması sonucu hücrelerin lateral hareketlerinin kontrol grubuna oranla 24.saatte % 5 ve % 2,5 oranında, 48. saatte ise % 22,67 ve % 18,67 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Ancak bunlardan TTX (24. ve 48. saat) ile 1 μM ve 2 μM PHT uygulamasının 48. saatinde hücrelerin lateral hareketi üzerinde anlamlı ($P<0.05$) bir etki meydana getirdiği belirlenmiştir. Yüzde inhibisyon değerleri dikkate alındığında, artan doz ile birlikte inhibisyon oranının azaldığı görülmüştür. 48. saatteki 1 μM ve 2 μM PHT'nin 48. saatte VGSC blokeri TTX ile benzer oranda hücrelerin lateral hareketini inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 4.9).

Tablo 4.1. Mat- LyLu hücrelerine TTX ve PHT uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri ($\pm\text{SE}$).

| | Motilite İndeksi (Mol) | | Motilite İndeksindeki Değişim (%) | | İstatistik Değerlendirme |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------|-----------------------------------|------------|--------------------------|
| | 24. Saat | 48. Saat | 24. Saat | 48. Saat | |
| Kontrol | 0.40 ± 0.01 | 0.75 ± 0.10 | - | - | - |
| TTX (600 nM) | 0.36 ± 0.01 | 0.59 ± 0.01 | 10 (↓)* | 21.33 (↓)* | * $P<0.05$ |
| 1 μM | 0.38 ± 0.01 | 0.58 ± 0.01 | 5 (↓) | 22.67 (↓)* | * $P<0.05$ |
| 2 μM | 0.39 ± 0.01 | 0.61 ± 0.01 | 2.5 (↓) | 18.67 (↓)* | * $P<0.05$ |

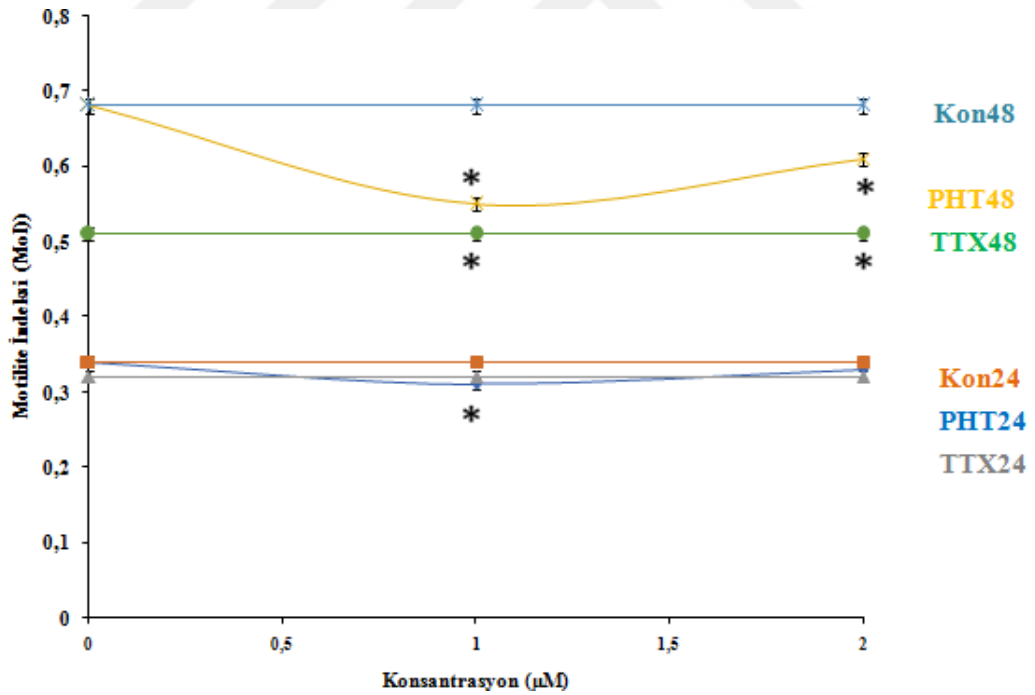


Şekil 4.9. PHT'nin, Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareket üzerine etkisi (* p<0,05).

Dunning model zayıf VGSC ekspresyonuna sahip düşük metastatik AT-2 hücrelerinin lateral hareketi üzerine PHT'nin etkisi ise, Tablo 4.2'de ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir. 24.ve 48. saatteki kontrol grubu motilite indeksi (Mol) sırasıyla $0,34 \pm 0,01$ ve $0,68 \pm 0,01$ olarak saptanmıştır. Sodyum kanal blokeri olan TTX'in 24.ve 48. saatteki motilite indeksleri sırasıyla $0,32 \pm 0,01$ ve $0,51 \pm 0,01$ olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, TTX, AT-2 hücrelerinin lateral hareketi üzerinde sırasıyla % 5,9 ve % 25 oranında inhibisyon meydana getirmekte ve bu inhibisyonun anlamlı olduğu ($P<0,05$) görülmektedir. 1 µM PHT uygulanan deney grubunda hücrelerin motilite indeksi, 24. saatte $0,31 \pm 0,01$ ve 48. saatte ise, $0,55 \pm 0,01$ olmaktadır. Yapılan istatistik analize göre; 1 µM PHT'nin hücrelerin lateral hareketinde azalmaya neden olduğu, kontrole oranla 24. ve 48. saatte sırası ile % 8,8 ve % 19 anlamlı ($P<0,05$) bir inhibisyon meydana getirdiği gözlemlenmiştir. 2 µM PHT ise, AT-2 hücrelerin motilite indeksi, 24. saatte $0,33 \pm 0,01$ ve 48. saatte ise, $0,61 \pm 0,01$ olmaktadır. AT-2 hücrelerinin lateral hareketinin sadece 48.saatte yüzde 10,3 oranında inhibe etmiş ve bu inhibisyon anlamlı ($P<0,05$) bulunmuştur.

Tablo 4.2. AT-2 hücrelerine TTX ve PHT uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri (\pm SE).

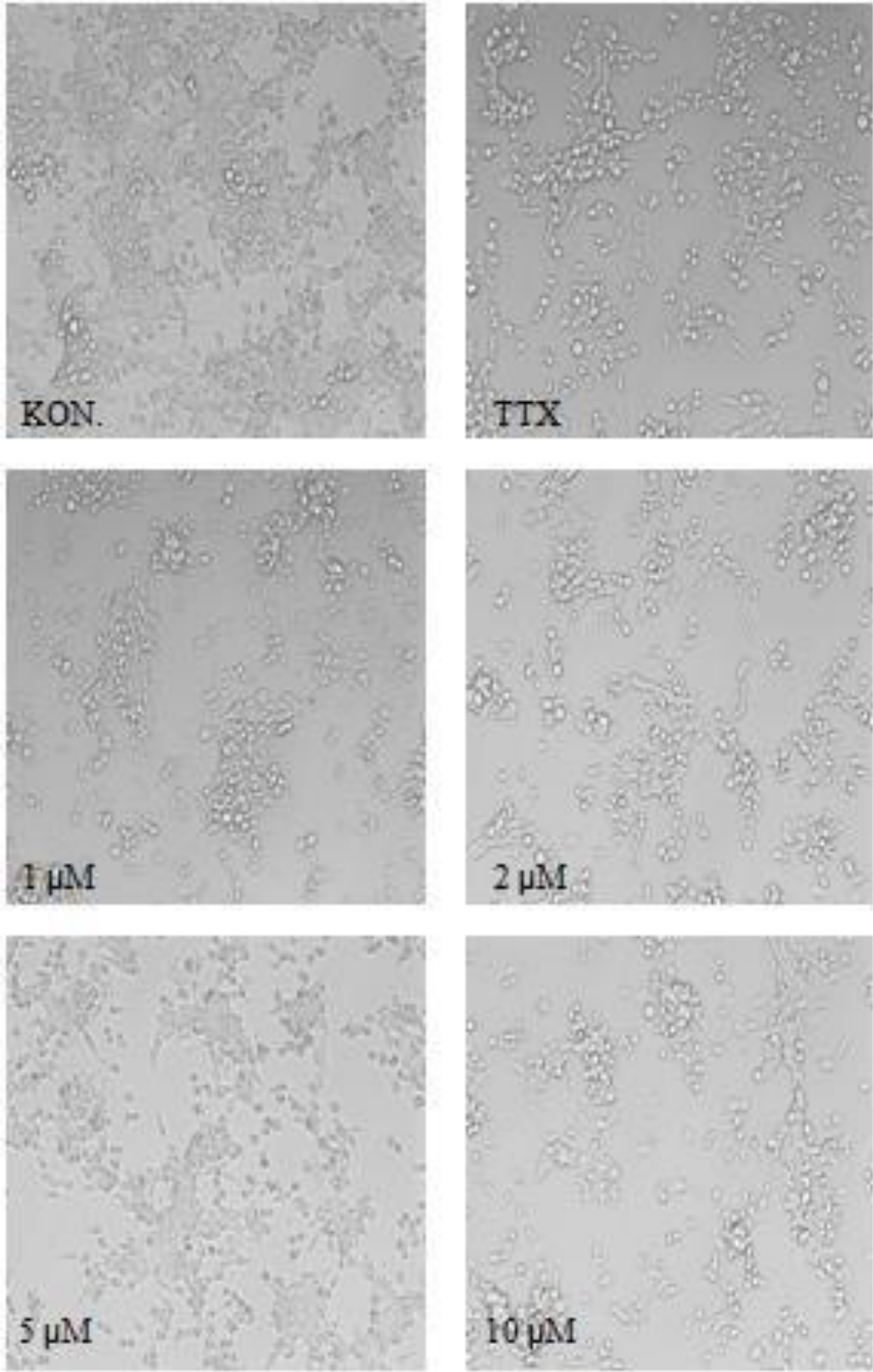
| | Motilite İndeksi (Mol) | | Motilite İndeksindeki Değişim (%) | | İstatistik Değerlendirme |
|----------------------------|------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------|--------------------------|
| | 24. Saat | 48. Saat | 24. Saat | 48. Saat | |
| Kontrol | 0.34 \pm 0.01 | 0.68 \pm 0.01 | - | - | - |
| TTX (600 nM) | 0.32 \pm 0.01 | 0.51 \pm 0.01 | 5.9 (1)* | 25 (1)* | * P<0.05 |
| 1μM | 0.31 \pm 0.01 | 0.55 \pm 0.01 | 8.8 (1)* | 19 (1)* | * P<0.05 |
| 2 μM | 0.35 \pm 0.01 | 0.61 \pm 0.01 | 3 (1) | 10.3 (1)* | * P<0.05 |



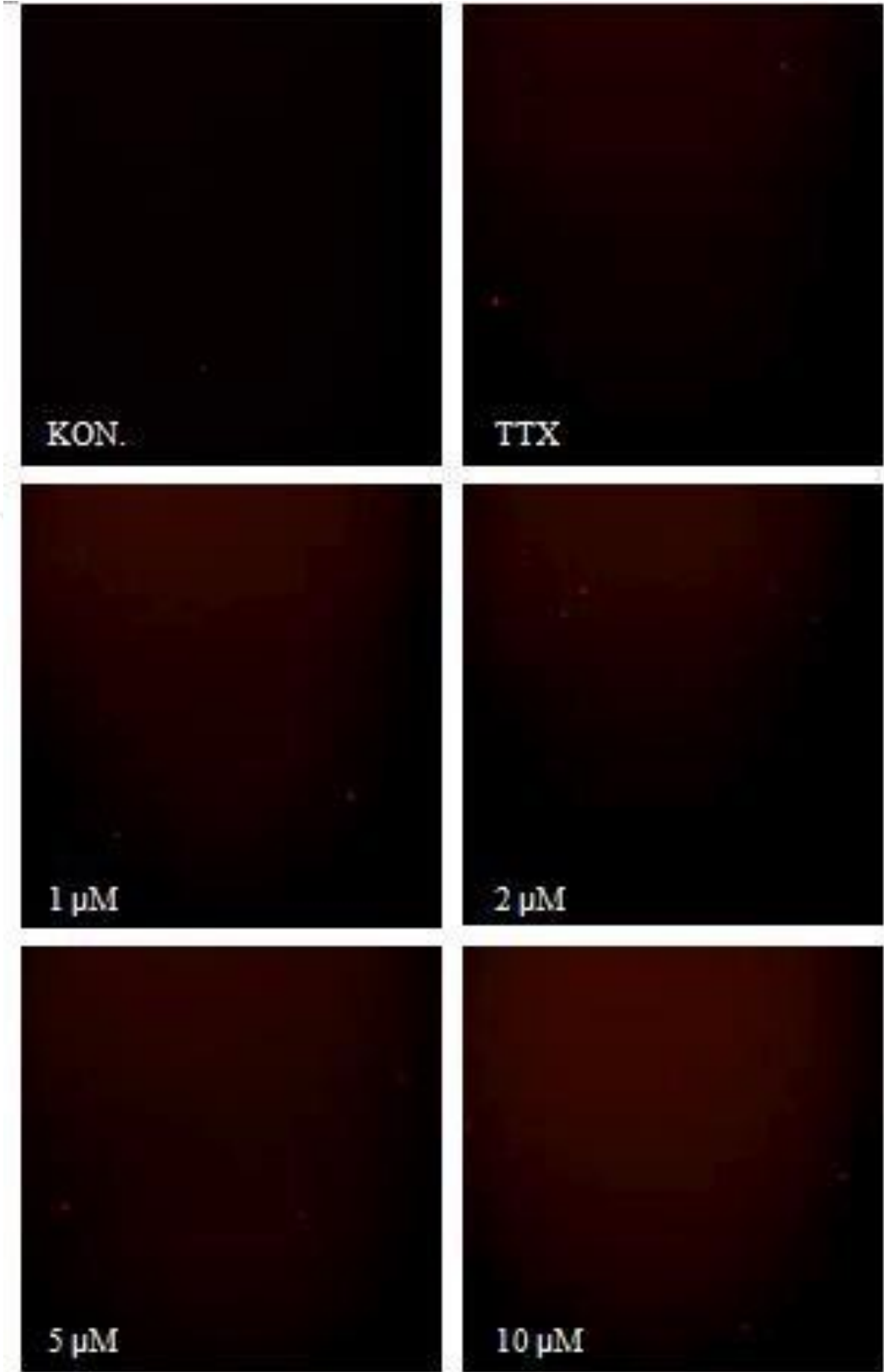
Şekil 4.10. PHT'nin, AT-2 hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi (* p<0,05).

4.5. Apoptotik Hücre Ölümü

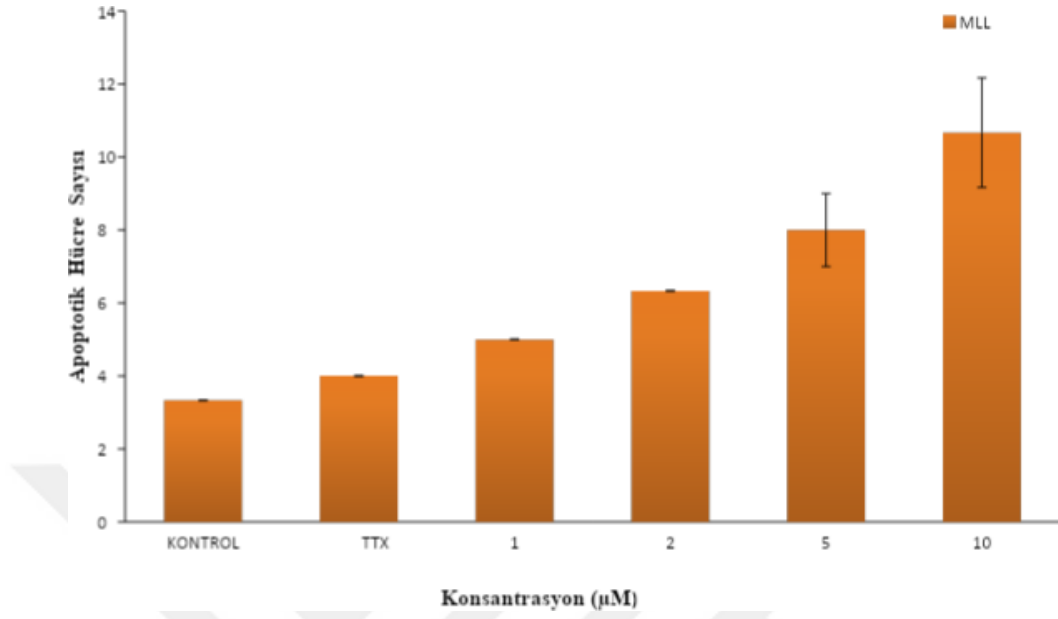
PHT'nin düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-Lylü hücresoyları üzerindeki apoptotik etkisi propidyum iyodur ile floresan mikroskobu ile bakılmıştır. Şekil 4.11'de Mat-Lylü hücrelerinin ışık mikroskobunda 20x büyütmede deney gruplarının dozları arttıkça canlılığın azaldığı izlenmektedir. Ayrıca floresan mikroskobunda Mat-Lylü hücrelerinin 48 saat süre ile 1 µM, 2 µM, 5 µM ve 10 µM PHT'ye maruz kalmaları sonucu doza bağlı olarak apoptotik ölümün arttığı görülmüştür (Şekil 4.12). Mat-Lylü hücre hattının Şekil 4.13'te ölü hücre sayısı grafiğinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. Düşük metastatik AT-2 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.14 de floresan mikroskobu görüntüsü ise, Şekil 4.15 de verilmiştir. AT-2 hücrelerinin 1 µM, 2 µM, 5 µM ve 10 µM PHT'de 48 saat kalması sonucunda ölü hücre yüzdesinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.16).



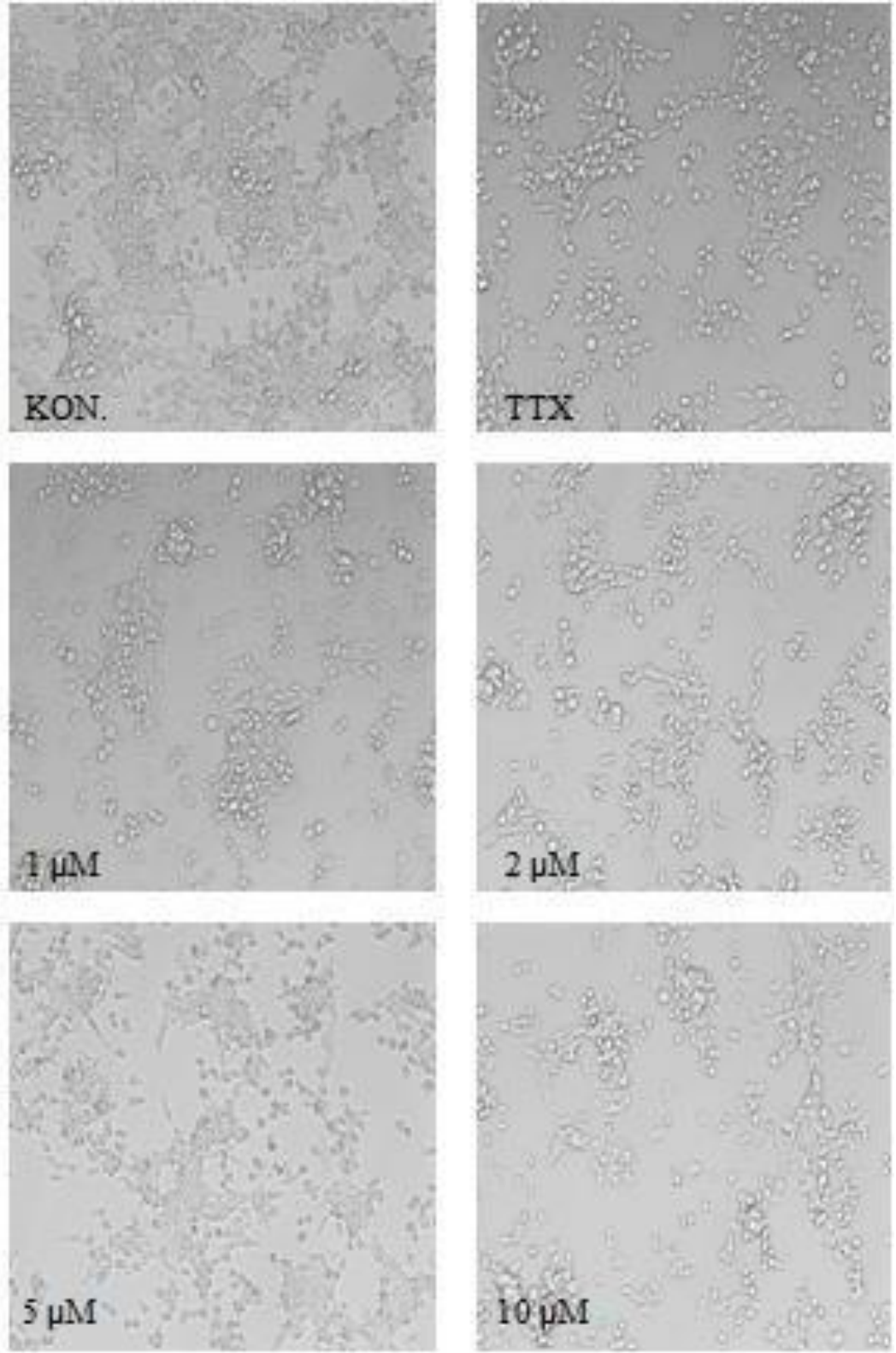
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan Mat-Lylu hücrelerinin ışık mikroskobu (20x) görüntüsü.



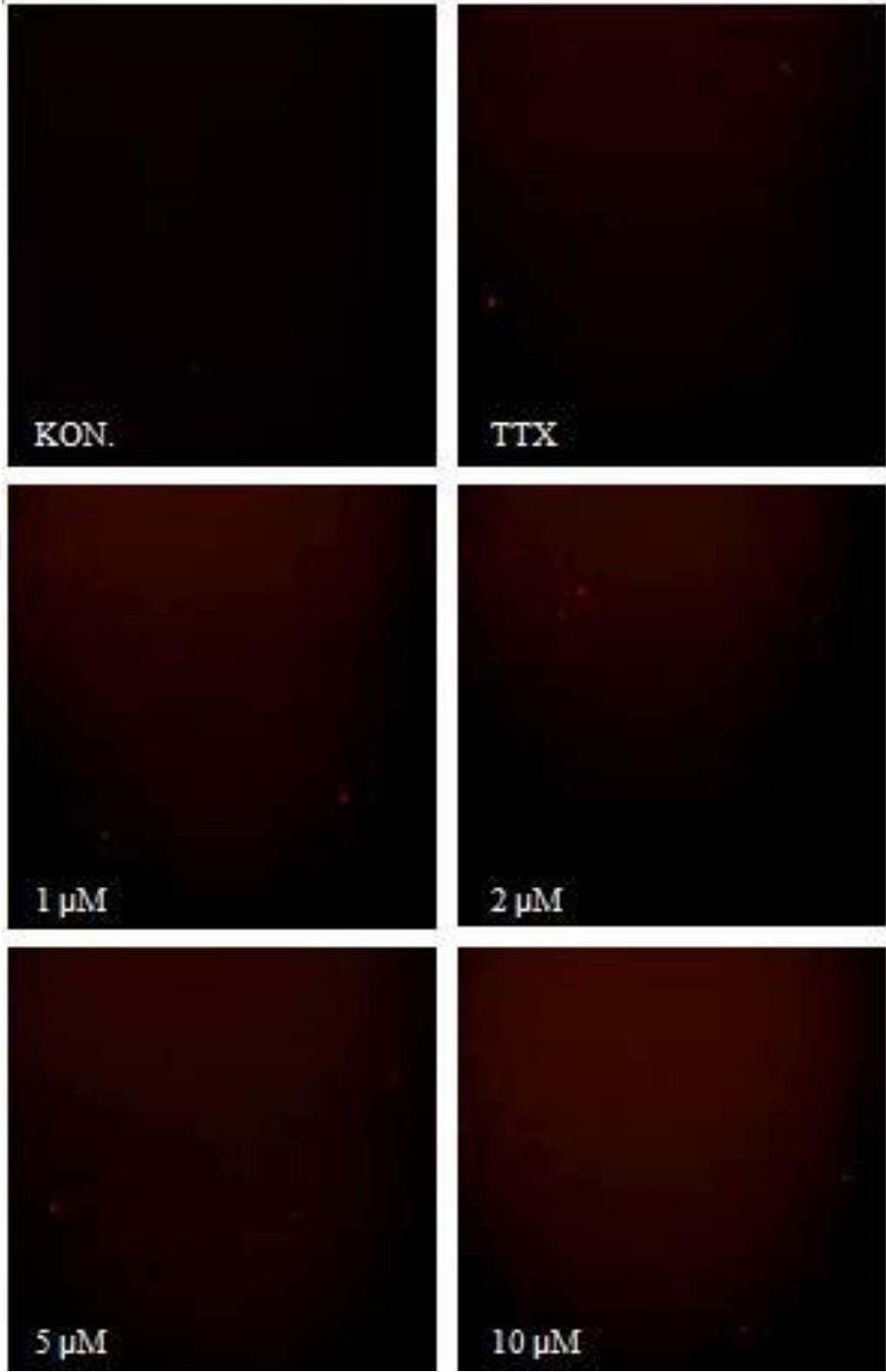
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan ve propidyum iyodür ile boyanmış Mat-Lyly hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (20x) (Kırmızı noktalar ölü hücreleri göstermektedir).



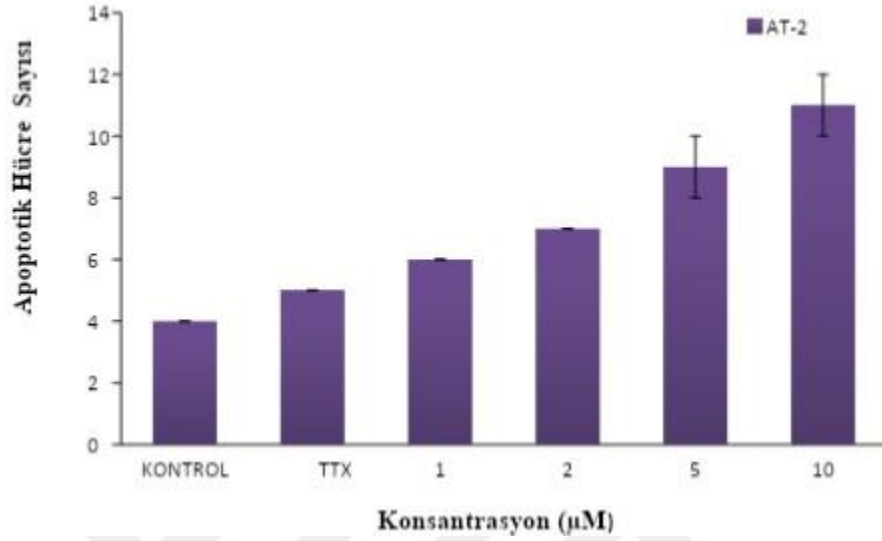
Şekil 4.13.PHT'nin Mat-Lylu hücre soyu üzerinde apoptotik hücre sayısı.



Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan AT-2 hücrelerinin ışık mikroskobu (20 x) görüntüsü.



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda PHT uygulanan ve propidyum iyodür ile boyanmış AT-2 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (20x) (Kırmızı noktalar ölü hücreleri göstermektedir).



Şekil 4.16. PHT'nin AT-2 hücre soyu üzerinde apoptotik hücre sayısı.

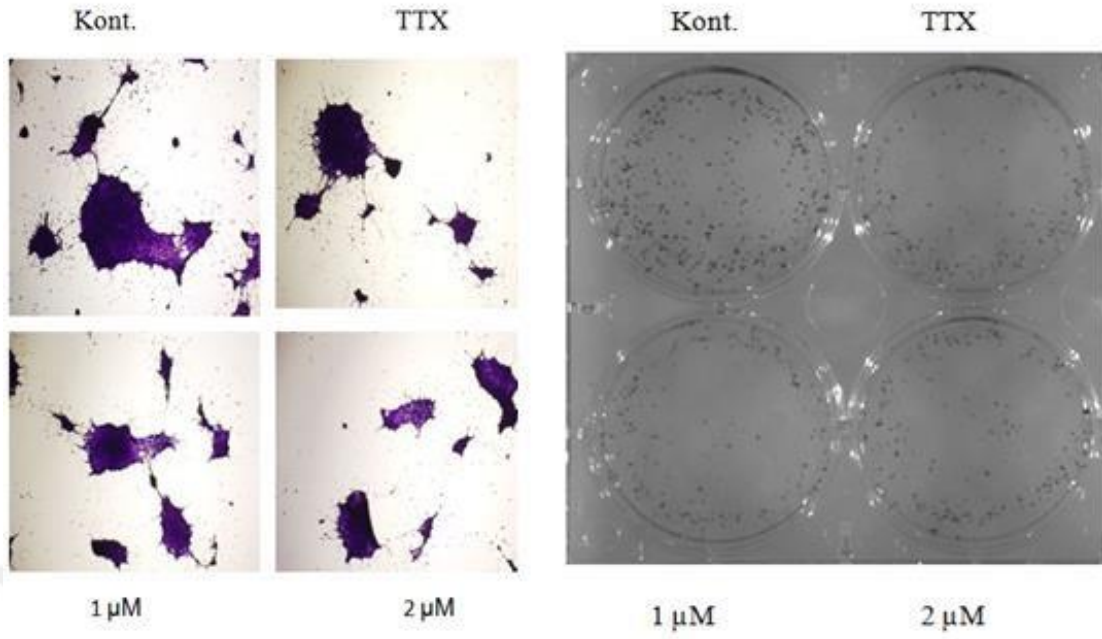
4.6. Koloni Oluşumu

AT-2 ve Mat-Lylu prostat hücre soylarının in vitro olarak koloni oluşumları üzerine PHT'nin etkisi değerlendirilmiştir. 48 saat TTX, 1 µM ve 2 µM PHT uygulanması sonucu oluşan hem AT-2 hem de Mat-Lylu hücrelerinde kolonilerin (≥ 50 hücre) yüzdeleri Tablo 4.3'te verilmiş ve grafikleri çizilmiştir. Yüksek metastatik Mat-Lylu hücrelerinin koloni morfolojileri ve koloni yüzdeleri Şekil 4.17'de verilmiştir. TTX, 1 µM ve 2 µM PHT'nin koloni sayısını azalttığı belirlenmiş olup, TTX, 1 µM ve 2 µM PHT'de bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı ($P > 0.05$) olmadığı görülmüştür.

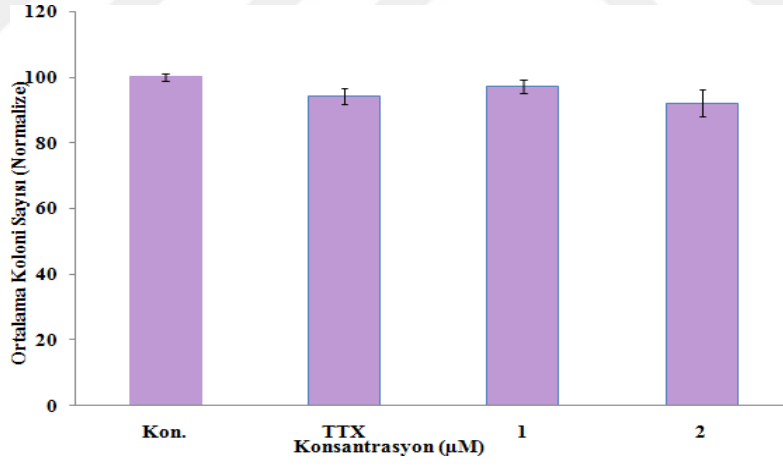
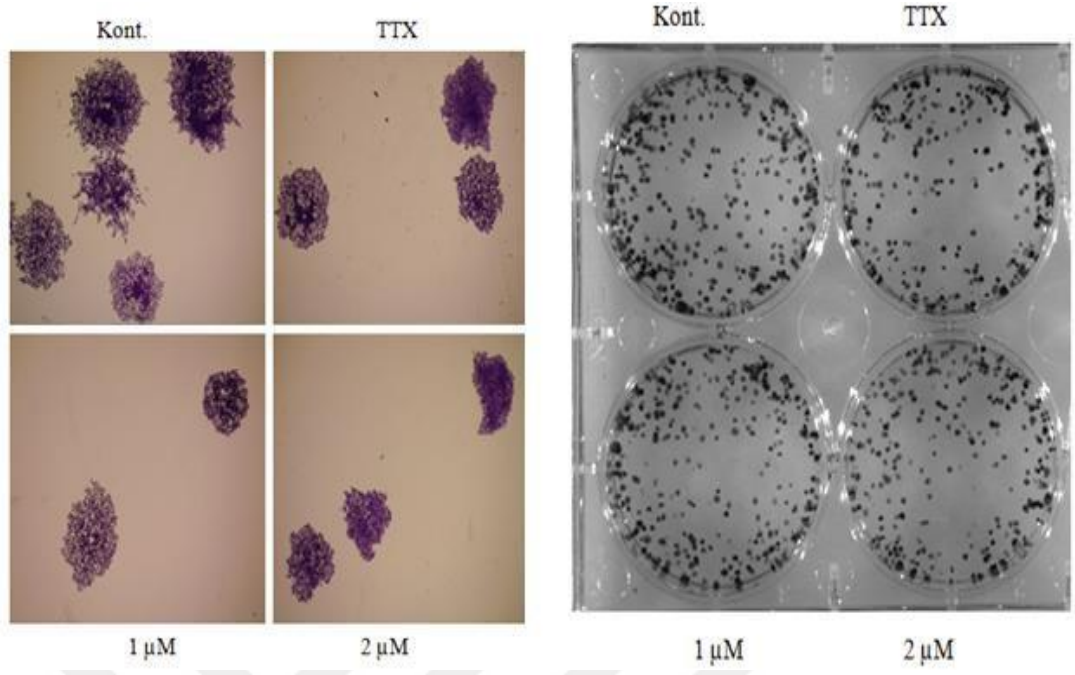
Tablo 4.3. PHT'nin koloni yüzdesi üzerindeki etkisi ($P>0.05$).

| | Koloni Yüzdesi (%) | | | |
|-----------------|---------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| | Kon | TTX | 1 μM | 2 μM |
| Mat-LyLu | 100 | 86 \pm 7.2 | 90 \pm 11.2 | 88 \pm 7.2 |
| AT2 | 100 | 94 \pm 2.5 | 97 \pm 1.9 | 92 \pm 4.1 |

PHT'nin düşük metastatik AT-2 hücrelerinin koloni morfolojisi ve koloni yüzdeleri üzerindeki etkisi ise, Tablo 4.3 ve Şekil 4.18'da görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre Mat-LyLu hücre hattı ile paralellik göstermiştir.



Şekil 4.17. PHT uygulanan Mat-Lyly hücrelerinin koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi.



Şekil 4.18. PHT uygulanan AT-2 hücrelerinin koloni morfolojisi ve koloni yüzdesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli faktörlerin etkisi ile görülme sıklığı giderek artan ve dünya çapında bir sağlık sorununa yol açan kanser, mortalite ve morbiditesinin yüksek olması, tedavi maliyeti, süresi, yan etkilerinin yanı sıra sosyal ve psikolojik etkileri nedeniyle çağımızın en önemli sağlıksorunlarından birini oluşturmaktadır. Kanserden kaynaklanan mortalitenin değerlendirilmesi sonucu, ölümlerin primer tümörden çok metastazlardan kaynaklandığı anlaşılmaktadır (Djamgoz&Onkal 2013; Fairhurst v.d., 2015; Bugan v.d., 2019). Dolayısıyla son yıllarda metastaza yönelik tedavi stratejileri konusunda yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Bu çalışmalarda VGSC'lerin metastatik süreci etkileyen bir faktör olarak rol aldıkları ve yeni bir tedavi stratejisi olabilecekleri belirlenmiştir (Brackenbury v.d., 2012; Nelson v.d., 2015). Prostat kanser hücrelerinde VGSC'lerden Nav 1.7 alt tipinin artan ekspresyonu saptanmış ve metastatik davranışlardan sorumlu olduğu ortaya konmuştur (Djamgöz& Onkalv.d., 2013; Brackenburry v.d., 2012). Bu kanalların bloke edilmesiyle metastatik ilerlemenin baskılanabileceği hipotezi ile etki mekanizması iyon kanallarını bloke etme üzerine olan bazı ilaç veya farmakolojik ajanlar ile çalışmalar yoğunlaşmıştır (Djamgöz& Onkal v.d., 2013; Bugan vd., 2015; Preverskaya v.d., 2018; Djamgoz v.d., 2019).

Bu çalışmada; meme kanserinde metastatik aktiviteden sorumlu olan Nav 1.5 VGSC ler üzerinde etki gösteren antiepileptiklerden PHT'nin, prostat kanserinde metastatik davranışlarından sorumlu olan Nav 1.7 üzerindeki etkisi, yüksek metastatik Mat-Lylu ve düşük metastatik AT-2 hücreleri aracılığıyla; proliferasyon, koloni oluşumu, apoptotik hücre ölümü ve metastaza yönelik hücre migrasyonu araştırılmıştır.

Çalışmamızda prostat kanseri yüksek metastatik Mat-Lylu ve düşük metastatik AT-2 hücreleri üzerinde PHT, sitotoksik bir etki göstermemiştir. Her iki hücre soyunun hücre proliferasyonu deneyleri MTT yöntemi ile yapılmış ve 1 - 100 µM PHT konsantrasyonları araştırılmıştır. Hücrelerin PHT ile 48. saatlik inkübasyonu sonucunda, düşük metastatik AT-2 hücrelerinde 10 µM, yüksek metastatik Mat-Lylu hücrelerinde ise, 5 µM PHT konsantrasyonlarından itibaren PHT'nin, hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir inhibisyon meydana getirdiği saptanmıştır. Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin apoptotik hücre ölümü propidyum iyodür, floresan

yöntemiile araştırılmış ve her iki hücrenin üzerinde PHT konsantrasyonu arttıkça ölü hücre sayısının arttığı ancak bu artışın anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir.

Literatürde, PHT'nin prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran sadece bir çalışma bulunmakta olup, Fraser ve arkadaşları (2003) bu çalışmalarında 200 µM PHT'nin 48 saat süreyle uygulanması sonucu toksik etki göstermediğini belirtmişlerdir. 200 µM PHT hem yüksek metastatik Mat-LyLu, hem de düşük metastatik AT-2 hücrelerinin proliferasyonunu azaltırken, 100 µM PHT sadece MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonu inhibe etmiştir (Fraser v.d., 2003). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, bu çalışmada elde edilenlere benzer olmakla birlikte, Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin proliferasyonlarını daha düşük PHT konsantrasyonlarında inhibe ettiğini gösterdik.

Meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine PHT etkilerinin araştırıldığı literatürde birkaç çalışma bulunmaktadır. PHT'nin meme kanseri üzerindeki etkilerini ilk kez araştıran Yang ve arkadaşları (2012) Nav 1.5 ekspresyonu yapan yüksek metastatik MDA-MB-231 ve düşük metastatik MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine 5 µM, 50 µM ve 200 µM PHT'nin herhangi bir etki göstermediğini saptamıştır. Aynı araştırmacı grubu PHT'nin etkilerini farelerde oluşturdukları tümörler üzerinde in vivo olarak da incelemişlerdir.

Farelerde MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile oluşturulan tümörlere uygulanan 60mg/kg PHT'nin tümör büyümesi üzerinde inhibisyon meydana getirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, aktif kaspaz-3'ü eksprese eden apoptik hücrelerin sayısında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Nelson v.d., 2015).

Anti epileptik ilaç olan PHT, östrojen reseptörü pozitif olan MCF hücreleri ile östrojen reseptörünün susturulması ile elde edilen ve VGSC akımı saptanan pII hücrelerine de uygulanmış ve 1 µM PHT'nin pII hücrelerinin proliferasyonunu %25 azalttığı tespit edilmiştir (Mohammed v.d., 2016).

Kanserin korkutucu özelliklerinden biri olan metastaz, hücrelerin primer tümörden ayrılması ile gerçekleşmektedir. İn vitro çalışmalarda metastazın değerlendirilmesinde hücre hareketi izlenmekte, hücrenin lateral hareketi yani migrasyonu ile invazyonu araştırılmaktadır. PHT'nin Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin lateral hareketi üzerine

etkisi hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen konsantrasyonlar ile sürdürülmüştür.

PHT'nin düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-Lyly prostat kanseri hücreleri üzerindeki metastatik etkisi, hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen 1 μ M ve 2 μ M PHT konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan sodyum kanal blokeri TTX, yüksek metastatik Mat-Lyly hücrelerinin 48. saatteki migrasyonunu %21,3; 1 μ M PHT %22,7; 2 μ M PHT %18,7 oranında anlamlı ($P<0,05$) olarak inhibe etmiştir. Düşük metastatik AT-2 hücrelerinin migrasyonunda sırası ile TTX % 25; 1 μ M PHT % 19; 2 μ M PHT ise % 10,3 inhibisyon meydana getirmiştir. Migrasyonun yanı sıra, hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri de araştırılmış, düşük metastatik AT-2 ve yüksek metastatik Mat-Lyly hücrelerine uygulanan TTX, 1 μ M ve 2 μ M PHT'nin her iki hücre soyu üzerinde de koloni oluşum oranında bir azalma meydana getirmekle birlikte, inhibisyon görülmemiştir. Ancak kontrol grubuna göre deney grupları koloni oluşum oranında az da olsa bir azalma saptanmıştır.

Fraser ve arkadaşları (2003) Nav 1.7 ekspresyonunun görüldüğü yüksek metastatik Mat-Lyly ve düşük metastatik AT-2 prostat kanser hücrelerinde veratridine, aconitine gibi VGSC açıcılarının yanı sıra, TTX, PHT gibi blokerlerin hücre hareketi üzerine etkilerinin de araştırmışlardır. Sodyum kanal blokeri TTX (1 μ M) in vitro olarak MAT-LyLy hücrelerinin motilitesini %47 oranında inhibe ederken, AT-2 hücreleri üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir. PHT çalışmada 5 μ M ve 50 μ M olarak kullanılmış ve Mat-Lyly hücreleri üzerinde sırasıyla %17 ve %11 oranında inhibisyon meydana getirmiştir. AT-2 hücreleri üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir (Fraser v.d., 2003). Prostat kanseri üzerinde PHT'nin metastatik aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Meme kanserinde MCF-7 hücrelerinin migrasyonu üzerinde 5-200 μ M PHT herhangi bir etki göstermezken, yüksek metastatik, Nav 1.5 VGSC ekspresyonu yüksek olan MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonunu 50 μ M PHT, %27,3; 200 μ M PHT ise, %37,2 gibi önemli düzeyde inhibe etmiştir. Aynı şekilde MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonunda da inhibisyon görülmüştür (Yang v.d., 2012). Hücrelerin migrasyon ve invazyonundan elde edilen bu sonuçlar üzerine, meme kanseri Nav 1.5 ekspresyonunun metastatik aktiviteyi artırdığı ve PHT gibi, VGSC bloke eden

ilaçlar ile bu aktivitenin baskılanabileceği ileri sürülmüştür (Yang v.d., 2012). MDA-MB-231 meme hücreleri ile dişi farelerin meme pedlerinde tümör oluşturan ve PHT nin etkisini in vivo olarak araştıran Nelson ve arkadaşları (2015) akciğer, karaciğer ve dalakta metastazın azaldığını saptamışlardır. Aynı zamanda farelerden elde ettikleri dokuları DAPI gibi boyalar ile immun boyama sonucunda, doku kesitlerinde de metastatik odakların azaldığını göstermişlerdir.

Yine antiepileptik olan valproikasitin insan prostat kanseri hücreleri PC3 ve DU145 de doza bağımlı olarak istilacılığı önemli ölçüde azalttı (Jiang v.d., 2013). Valproikasitin prostat kanseri hücrelerinde hücre göçünü inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca E-kadherin proteinin yukarı regülasyonu ve hücre göçünde inhibisyon görülmüştür (Zhang v.d., 2011).

Lu-165 akciğer hücresinde antidiüretik hormon mRNA seviyeleri 25 µg/mL dozlarında fenitoinin tedavisinden sonra azaldığı, 10 ve 20 mEq/L'de ilave sodyum ile sodyum yüklemesinde Nav 1.3 mRNA seviyelerini azalttığı görülmüştür (Ohta v.d., 2017).

Prostat kanserinin allogreft modelinde tetradoksin akciğer metastazını inhibe etmiştir. PCa hücrelerinde, PHT ve karbamazepin hem interlökin hem de PSA salgılanmasını azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda valproatın PSA ve interlökin salgılanmasını daha az inhibe ettiği bulunmuştur. Böylece prostat kanseri hücre proliferasyonunu ilacında inhibe ettiği görülmüştür (Martin v.d., 2015).

PHT'nin hücre proliferasyonu üzerinde ilgili dozlarda metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sodyum akımını, göçünü ve istilasını inhibe ettiği görülmüştür. Zayıf metastatik MCF-7 hücrelerinin göçü, çoğalması veya istilası üzerinde etki yoktur. Bu da PHT'nin etkisinin VGSC'ye bağımlı olduğunu gösterir (Pellegrino v.d., 2022).

Dirençli prostat kanseri hücre hatları olan PC3 ve DU145'de δ-Tocotrienol'ün 15 µg/mL'de 48 ile tedavisi sonucunda koloni oluşturma yeteneklerine bakıldı. Tedavi edilmeyen hücrelerde koloni oluşturduğu ancak δ-Tocotrienol ile tedavi edilen hücrelerde koloni oluşturma yeteneğinin azaldığı görüldü (Fontana v.d., 2019).

Bu tez çalışmasında, antiepileptik ilaç olan PHT'nin prostat kanseri üzerindeki etkisi hücre proliferasyonu, koloni oluşumu ve lateral motilite ile araştırılmıştır. PHT'nin Dunning modeli prostat kanseri Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin lateral hareketi yani migrasyonu üzerinde inhibisyon meydana getirdiği görülmüştür. Koloni oluşumu, migrasyon ve apoptoz deneyi ile elde ettiğimiz hücre ölümü sonuçlarımız burada belirtilen çalışmalarla paralellik göstermekte ve PHT'in hücrelerin migrasyonu üzerinde oluşturduğu inhibisyon, muhtemelen, Nav 1.7 VGSC aktivitesinin bloke olmasından kaynaklanmaktadır. VGSC üzerinde etkili olan antieliptik ilaç PHT'nin, in vitro etkisini değerlendiren bu ön çalışmanın moleküler yöntemlerle daha ayrıntılı olarak in vitro ve daha sonra in vivo çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

Aaron L., Franco OE., Hayward SW., 2016, Review Of Prostate Anatomy And Embryology And The Etiology Of Benign Prostatic Hyperplasia The Urologic Clinics of North America, 43(3):279-288 DOI: 10.1016/j.ucl.2016.04.012 PMID: 27476121 PMCID: PMC4968575

Angus M, Ruben P. Voltage gated sodium channels in cancer and their potential mechanisms of action. Channels (Austin). 2019 Dec;13(1):400-409. doi: 10.1080/19336950.2019.1666455. PMID: 31510893; PMCID: PMC6768049.

Arora K, Barbieri CE. Molecular Subtypes of Prostate Cancer. Curr Oncol Rep. 2018 Jun 1;20(8):58. doi: 10.1007/s11912-018-0707-9. PMID: 29858674.

Bijoux W, Cordina-Duverger E, Balbolia S, Lamy PJ, Rebillard X, Tretarre B, Cenee S, Menegaux F. Occupation and prostate Cancer risk: results from the epidemiological study of prostate cancer (EPICAP). J Occup Med Toxicol. 2022 Feb 7;17(1):5. doi: 10.1186/s12995-022-00346-2. PMID: 35130905; PMCID: PMC8819870.

Bleeker J, Wang ZA. Applications of Vertebrate Models in Studying Prostatitis and Inflammation-Associated Prostatic Diseases. Front Mol Biosci. 2022 Jul 5;9:898871. doi: 10.3389/fmolb.2022.898871. PMID: 35865005; PMCID: PMC9294738.

Bostwick DG, Liu L, Brawer MK, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. Rev Urol. 2004 Fall;6(4):171-9. PMID: 16985598; PMCID: PMC1472840.

Bouza AA, Isom LL. Voltage-Gated Sodium Channel β Subunits and Their Related Diseases. Handb Exp Pharmacol. 2018; 246:423-450. doi: 10.1007/164_2017_48. PMID: 28965169; PMCID: PMC6338345.

Brackenbury WJ, Chioni AM, Diss JK, Djamgoz MB. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2007 Jan;101(2):149-60. doi: 10.1007/s10549-006-

9281-1. Epub 2006 Jul 13. PMID: 16838113; PMCID: PMC4122814.

Brackenbury WJ. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels (Austin)*. 2012 Sep-Oct;6(5):352-61. doi: 10.4161/chan.21910. Epub 2012 Sep 1. PMID: 22992466; PMCID: PMC3508774.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.

Bugan, İ., Karagöz, Z., Altun, S. ve Djamgoz, MB (2015). Kanserle ilişkili nöropatik ağrıya karşı kullanılan bir analjezik olan Gabapentin: in vivo sıçan modelinde prostat kanseri ilerlemesi üzerindeki etkiler. *Temel Klin. Farmakol. Toksikol.* doi: 10.1111/bcpt.12484

Campbell, T. M., Main, M. J., & Fitzgerald, E. M. 2013. Functional expression of the voltage-gated Na⁺-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 21), 4939–4949.

Perdana, NR., Mochtar CA, , Umbas, R., Hamid, AR. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones*, 2016 Jul;48(3):228-238.

Cheung E, Wadhera P, Dorff T, Pinski J. Diet and prostate cancer risk reduction. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008 Jan;8(1):43-50. doi: 10.1586/14737140.8.1.43. PMID: 18095882.

Chisamore MJ, Gentile MA, Dillon GM, Baran M, Gambone C, Riley S, Schmidt A, Flores O, Wilkinson H, Alves SE. A novel selective androgen receptor modulator (SARM) MK-4541 exerts anti-androgenic activity in the prostate cancer xenograft R-3327G and anabolic activity on skeletal muscle mass & function in castrated mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Oct;163:88-97. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.04.007. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27106747.

D A Beneski, W A Catterall Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci* , 1980 Jan;77(1):639-43.doi: 10.1073/pnas.77.1.639.

Davidsson S, Andren O, Ohlson AL, Carlsson J, Andersson SO, Giunchi F, Rider JR, Fiorentino M. FOXP3⁺ regulatory T cells in normal prostate tissue, postatrophic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and tumor histological lesions in men with and without prostate cancer. *Prostate*. 2018 Jan;78(1):40-47. doi: 10.1002/pros.23442. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29105795; PMCID: PMC5725695.

Diss, J. K. J., Archer, S. N., Hirano, J., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B. 2001. "Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell line", *The Prostate*, 48, 165-178.

Diss, J. K. J., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B. A. 2004. "Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implication and pathophysiological aspects", *European Biophysics Journal*, 33, 180 -193.

Diss, J.K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., Djamgoz, M.B.A, (2005). Potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, 8, 266- 273.

Djamgoz MB, Coombes RC, Schwab A. Ion transport and cancer: from initiation to metastasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014 Feb 3;369(1638):20130092. doi: 10.1098/rstb.2013.0092. PMID: 24493741; PMCID: PMC3917347.

Djamgoz, M.B.A. & Onkal, R. (2013). Persistent Current Blockers of Voltage Gated Sodium Channels: A Clinical Opportunity for Controlling Metastatic Disease. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8, 66-84

Fairhurst C, Watt I, Martin F, Bland M, Brackenbury WJ. Sodium channel-inhibiting drugs and survival of breast, colon and prostate cancer: a population-based study. *Sci Rep*. 2015 Nov 18;5:16758. doi: 10.1038/srep16758. PMID: 26577038; PMCID:

PMC4649474.

Fiandalo MV, Wu W, Mohler JL. The role of intracrine androgen metabolism, androgen receptor and apoptosis in the survival and recurrence of prostate cancer during androgen deprivation therapy. *Curr Drug Targets*. 2013 Apr;14(4):420-40. doi: 10.2174/1389450111314040004. PMID: 23565755; PMCID: PMC3991464.

Fontana F, Moretti RM, Raimondi M, Marzagalli M, Beretta G, Procacci P, Sartori P, Montagnani Marelli M, Limonta P. δ -Tocotrienol induces apoptosis, involving endoplasmic reticulum stress and autophagy, and paraptosis in prostate cancer cells. *Cell Prolif*. 2019 May;52(3):e12576. doi: 10.1111/cpr.12576. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30719778; PMCID: PMC6536411.

Francis JC, Swain A. Prostate Organogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Jul 2;8(7):a030353. doi: 10.1101/csh.perspect.a030353. PMID: 29229667; PMCID: PMC6027935.

Fraser Scott P., Gündüz-Özerlat İ., Brackenbury William J., Fitzgerald Elizabeth M., Campell Thomas M., Coombes R. C. 'Derl.' Djamgöz Mustafa B.A.. 'Derl.' (2014), Regulation Of Voltage-Gated Sodium Channel Expression In Cancer: Hormones, Growth Factors And Auto-Regulation, *Phil. Trans. R. Soc. B*3692013010520130105

Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D. S., Coombes, R. C., Djamgoz, M. B. 2005. "Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis", *Clinical Cancer Research*, 11(15), 5381-5389.

Fraser, S.P., Salvador, V., Manning, E., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R., Djamgoz, M.B.A., 2003, Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviours involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility, *Journal of cellular physiology*, 169, 479-87.

Fraser, SP., Diss, JK., Chioni, AM., et. al. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res.*11(15):5381–9.

Ganesh K, Massagué J. Targeting metastatic cancer. *Nat Med.* 2021 Jan;27(1):34-44. doi: 10.1038/s41591-020-01195-4. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33442008; PMCID: PMC7895475159; PMCID: PMC3401508.

González-Cano R, Ruiz-Cantero MC, Santos-Caballero M, Gómez-Navas C, Tejada MÁ, Nieto FR. Tetrodotoxin, a Potential Drug for Neuropathic and Cancer Pain Relief *Toxins (Basel).* 2021 Jul 12;13(7):483. doi: 10.3390/toxins13070483. PMID: 34357955; PMCID:PMC8310002.

Grimes JA, Fraser SP, Stephens GJ, Downing JE, Laniado ME, Foster CS, Abel PD, Djamgoz MB. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett.* 1995 Aug 7;369(2-3):290-4. doi: 10.1016/0014-5793(95)00772-2. PMID: 7649275.

Haddad, A. Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S. J., Fleshner, N. E., Klotz, L. H. 2006. “Novel antiproliferative flavonoid induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines”, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 9, 68-76.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*,144(5),646674.<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013/ATTACHMENT/68024D79-3A9C-46C4-930B-640934F11E2E/MMC1.PDF>

House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM, Lee NH. Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res.* 2010 Sep 1;70(17):6957-67. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1169. Epub 2010 Jul 22. PMID: 20651255; PMCID: PMC2936697.

Jiang, W., Zheng, Y., Huang, Z., Wang, M., Zhang, Y., Wang, Z., *vediglerleri.* (2014). Valproik asidin prostat kanseri hücresi istilası üzerindeki önleyici

etkisinin mekanizmasında SMAD4'ün rolü. *Uluslararası Urol. Nefrol.* 46, 941–946. doi: 10.1007/s11255-013-0609-6.

Khattak AS, Raison N, Hawazie A, Khan A, Brunckhorst O, Ahmed K. Contemporary Management of Chronic Prostatitis. *Cureus.* 2021 Dec 7;13(12):e20243. doi: 10.7759/cureus.20243. PMID: 35004057; PMCID: PMC8735884.

Komura K, Sweeney CJ, Inamoto T, Ibuki N, Azuma H, Kantoff PW. Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *Int J Urol.* 2018 Mar;25(3):220-231. doi: 10.1111/iju.13512. Epub 2017 Dec 20. PMID: 29266472; PMCID: PMC6053280.

Koltai T. Voltage-gated sodium channel as a target for metastatic risk reduction with re-purposed drugs. *F1000 Res.* 2015 Jul 22;4:297. doi: 10.12688/f1000research.6789.1. PMID: 27408684; PMCID: PMC4920216.

Kumar N, Chakraborty A, Suresh SH, Basappaji S, Betdur AL. Phenytoin-induced cerebellar atrophy in an epileptic boy. *Indian J Pharmacol.* 2013 Nov-Dec;45(6):636-7. doi: 10.4103/0253-7613.121388. PMID: 24347780; PMCID: PMC3847262.

Laniado, M. E., Lalani, E. N., Fraser, S. P., Grimes, J. A., Bhangal, G., Djamgoz, M. B., Abel, P.D. 1997. “Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro”, *American Journal of Pathology*, 150(4), 1213-21.

Lee CY, Lai HY, Chiu A, Chan SH, Hsiao LP, Lee ST. The effects of antiepileptic drugs on the growth of glioblastoma cell lines. *J Neurooncol.* 2016 May;127(3):445-53. doi: 10.1007/s11060-016-2056-6. Epub 2016 Jan 13. PMID: 26758059; PMCID: PMC4835521.

Lee D, Lee C, Kwon T, You D, Jeong IG, Hong JH, Ahn H, Kim CS. Clinical features and prognosis of prostate cancer with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Korean J Urol.* 2015 Aug;56(8):565-71. doi: 10.4111/kju.2015.56.8.565. Epub 2015 Jul 24. PMID: 26279825; PMCID: PMC4534430.

Leslie SW, Soon-Sutton TL, Sajjad H, et al. Prostate Cancer. Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2022 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>

Lopez-Charcas O, Pukkanasut P, Velu SE, Brackenbury WJ, Hales TG, Besson P, Gomora JC, Roger S. Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. *iScience*. 2021 Mar 6;24(4):102270. doi: 10.1016/j.isci.2021.102270. PMID: 33817575; PMCID: PMC8010468.

Martin F, Ufodiana C, Watt I, Bland M, Brackenbury WJ. Therapeutic Value of Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitors in Breast, Colorectal, and Prostate Cancer: A Systematic Review. *Front Pharmacol*. 2015 Nov 12;6:273. doi: 10.3389/fphar.2015.00273. PMID: 26834632; PMCID: PMC4714608.

Martin LJ, Corry B. Locating the route of entry and binding sites of benzocaine and phenytoin in a bacterial voltage gated sodium channel. *PLoS Comput Biol*. 2014 Jul 3;10(7):e1003688. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003688. PMID: 24992293; PMCID: PMC4084639.

Mitsunari K, Miyata Y, Matsuo T, Mukae Y, Otsubo A, Harada J, Kondo T, Matsuda T, Ohba K, Sakai H. Pharmacological Effects and Potential Clinical Usefulness of Polyphenols in Benign Prostatic Hyperplasia. *Molecules*. 2021 Jan 16;26(2):450. doi: 10.3390/molecules26020450. PMID: 33467066; PMCID: PMC7829696.

Mohammed FH, Khajah MA, Yang M, Brackenbury WJ, Luqmani YA. Blockade of voltage-gated sodium channels inhibits invasion of endocrine-resistant breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2016 Jan;48(1):73-83. doi: 10.3892/ijo.2015.3239. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26718772; PMCID: PMC4734602.

Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Von Hoff DD. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment. *Clin Cancer Res*. 2018 Jan 15;24(2):266-275. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1117. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28765323.

Munkley J, Livermore K, Rajan P, Elliott DJ. RNA splicing and splicing regulator

changes in prostate cancer pathology. *Hum Genet.* 2017 Sep;136(9):1143-1154. doi: 10.1007/s00439-017-1792-9. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28382513; PMCID: PMC5602090.

Nelson M, Yang M, Dowle AA, Thomas JR, Brackenbury WJ. The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. *Mol Cancer.* 2015 Jan 27;14(1):13. doi: 10.1186/s12943-014-0277-x. PMID: 25623198; PMCID: PMC4320839.

Nevitt SJ, Marson AG, Tudur Smith C. Carbamazepine versus phenytoin monotherapy for epilepsy: an individual participant data review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Jul 18;7(7):CD001911. doi: 10.1002/14651858.CD001911.pub4. PMID: 31318037; PMCID: PMC6637502.

Ng M, Baradhi KM. Benign Prostatic Hyperplasia. Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558920/>

Ohta T, Mita M, Hishinuma S, Ishii-Nozawa R, Takahashi K, Shoji M. Inhibition of Ectopic Arginine Vasopressin Production by Phenytoin in the Small Cell Lung Cancer Cell Line Lu-165. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Apr 28;8:94. doi: 10.3389/fendo.2017.00094. PMID: 28503166; PMCID: PMC5408062.

Ozel AB, Dagsuyu E, Aydın PK, Bugan I, Bulan OK, Yanardag R, Yarat A. Brain Boron Level, DNA Content, and Myeloperoxidase Activity of Metformin-Treated Rats in Diabetes and Prostate Cancer Model. *Biol Trace Elem Res.* 2022 Mar;200(3):1164-1170. doi: 10.1007/s12011-021-02708-z. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33860456

Patocka J, Wu Q, Nepovimova E, Kuca K. Phenytoin - An anti-seizure drug: Overview of its chemistry, pharmacology and toxicology. *Food Chem Toxicol.* 2020 Aug;142:111393. doi: 10.1016/j.fct.2020.111393. Epub 2020 May 4. PMID: 32376339.

Pellegrino M, Ricci E, Ceraldi R, Nigro A, Bonofiglio D, Lanzino M, Morelli C. From

HDAC to Voltage-Gated Ion Channels: What's Next? The Long Road of Antiepileptic Drugs Repositioning in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 10;14(18):4401. doi: 10.3390/cancers14184401. PMID: 36139561; PMCID: PMC9497059.

Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Dec 3;8(12):a030361. doi: 10.1101/cshperspect.a030361. PMID: 29311132; PMCID: PMC6280714.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Onco channelopathies? *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):559-621. doi: 10.1152/physrev.00044.2016. PMID: 29412049.

Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal PI, Iochmann S, Lei M, Bougnoux P, Gruel Y, Le Guennec JY. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):774-86. doi: 10.1016/j.biocel.2006.12.007. Epub 2007 Jan 20. PMID: 17307016.

Roger, S., Besson, P., Guennec, J. L. 2003. "Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1616, 107–111.

Sanchez-Sandoval AL, Hernández-Plata E, Gomora JC. Voltage-gated sodium channels: from roles and mechanisms in the metastatic cell behavior to clinical potential as therapeutic targets. *Front Pharmacol*. 2023 Jun 30;14:1206136. doi: 10.3389/fphar.2023.1206136. PMID: 37456756; PMCID: PMC10348687.

Sekhoacha, M.; Riet, K.; Motloun, P.; Gümenkü, L.; Adegoke, A.; Mashele, S. Prostat Kanseri İncelemesi: Genetik, Teşhis, Tedavi Seçenekleri ve Alternatif Yaklaşımlar *Moleküller 2022* , 27 ,5730. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>

Silberstein JL, Pal SK, Lewis B, Sartor O. Current clinical challenges in prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2013 Sep;2(3):122-36. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.03. PMID: 26816735; PMCID: PMC4708189.

Silva MP, Rodrigues CG, Varanda WA, Nogueira RA. Memory in Ion Channel Kinetics. *Acta Biotheor.* 2021 Dec;69(4):697-722. doi: 10.1007/s10441-021-09415-1. Epub 2021 May 27. PMID: 34043104.

Speakman MJ., Cheng X., 2014, Management of the complications of BPH/BOO *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India*, 30(2):208-213 DOI: 10.4103/0970-1591.127856 PMID:24744522 PMCID: PMC3989825

Strand DW, Costa DN, Francis F, Ricke WA, Roehrborn CG. Targeting phenotypic heterogeneity in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2017 Jul-Aug;96:49-61. doi: 10.1016/j.diff.2017.07.005. Epub 2017 Aug 4. PMID: 28800482; PMCID: PMC5669834.

Suy S, Hansen TP, Auto HD, Kallakury BV, Dailey V, Danner M, Macarthur L, Zhang Y, Miessau MJ, Collins SP, Brown ML. Expression of Voltage-Gated Sodium Channel $Na_v1.8$ in Human Prostate Cancer is Associated with High Histological Grade. *J Clin Exp Oncol.* 2012 Nov 1;1(2):10.4172/2324-9110.1000102. doi: 10.4172/2324-9110.1000102. PMID: 24163825; PMCID: PMC3807742.

Tennant TR, Kim H, Sokolof M, Rinker-Schaeffer CW (2000) Dunning modeli. *Prostat* 43(4):295–302

Termini D, Den Hartogh DJ, Jaglanian A, Tsiani E. Curcumin against Prostate Cancer: Current Evidence. *Biomolecules.* 2020 Nov 10;10(11):1536. doi: 10.3390/biom10111536. PMID: 33182828; PMCID: PMC7696488.

Valastyan, S., & Weinberg, R.A. (2011). Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell Press*, 147(2), 275-292.

Vietri MT, D'Elia G, Caliendo G, Resse M, Casamassimi A, Passariello L, Albanese L, Cioffi M, Molinari AM. Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 4;22(7):3753. doi: 10.3390/ijms22073753. PMID: 33916521; PMCID: PMC8038462.

Wang GC, Huang TR, Wang KY, Wu ZL, Xie JB, Zhang HL, Yin L, Tang WL, Peng B. Inflammation induced by lipopolysaccharide advanced androgen receptor expression and epithelial-mesenchymal transition progress in prostatitis and prostate cancer. *TranslAndrol Urol.* 2021 Nov;10(11):4275-4287. doi: 10.21037/tau-21-964. PMID: 34984192; PMCID: PMC8661260.

Wasim S, Lee SY, Kim J. Complexities of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 17;23(22):14257. doi: 10.3390/ijms232214257. PMID: 36430730; PMCID: PMC9696501.

Whitaker H, Tam JO, Connor MJ, Grey A. Prostate cancer biology & genomics. *TranslAndrol Urol.* 2020 Jun;9(3):1481-1491. doi: 10.21037/tau.2019.07.17. PMID: 32676435; PMCID: PMC7354295.

Xia J, Huang N, Huang H, Sun L, Dong S, Su J, Zhang J, Wang L, Lin L, Shi M, Bin J, Liao Y, Li N, Liao W. Voltage-gated sodium channel Nav 1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *Int J Cancer.* 2016 Dec 1;139(11):2553-69. doi: 10.1002/ijc.30381. Epub 2016 Aug 26. PMID: 27529686.

Yang M, Kozminski DJ, Wold LA, Modak R, Calhoun JD, Isom LL, Brackenbury WJ. Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jul;134(2):603-15. doi: 10.1007/s10549-012-2102-9. Epub 2012 Jun 8. PMID: 22678

Yıldırım, S., Altun, S., Gumushan, H., Patel, A. & Djamgoz, M. (2012). Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer letters*, 323(1), 58–61.

Zhang, L., Wang, G., Wang, L., Song, C., Wang, X. ve Kang, J. (2011). Valproikasit, Ekadherin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek prostat kanseri hücre göçünü engeller. *Pharmazie* 66, 614–618.