



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

**RANOLAZİNE ve RİLUZOLE KOMBİNASYONUNUN NA_v1.7
VOLTAJ KAPILI SODYUM KANAL (VGSC) BLOKERİ OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ceyda ÖNEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı


DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN


Temmuz, 2019


İSTANBUL

Bu çalışma, 30.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Nihal Öntür BULAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Seyhan ALTUN
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi


Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 27206 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tereddüt etmeden danışmanlığımı üstlenip beni motive eden ve cesaretlendiren danışmanım Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN'a,

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilgi birikimini ve tecrübesini benimle paylaşan Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a,

Deneylemlerin hazırlığında, yapımında ve analizlerinde yardımcı olarak yükümü hafifleten Dr. İlknur BUGAN'a,

Yardımları için yüksek lisans arkadaşlarım Esmâ PURUT ve Sercan UZUN'a,

Çemberlitaş Anadolu Lisesi başta idari kadrosu olmak üzere desteklerini her zaman hissettiğim öğretmen arkadaşlarıma,

Hayatıma anlam katan biricik öğrencilerime,

Bana olan inançlarını hiçbir zaman yitirmeyen ve bu zorlu süreci atlatmamı sağlayan kıymetli aileme teşekkür ederim.

Temmuz 2019

Ceyda ÖNEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. HÜCRE MEMBRANINDA İYON KANALLARI	4
2.2. VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI (VGSC).....	5
2.3. VGSC VE KANSER.....	9
2.4. PROSTAT KANSERİ.....	11
2.5. PROSTAT KANSERİ VE METASTAZ	15
2.6. PROSTAT KANSERİ DENEYSEL MODELLERİ	17
2.7. VGSC BLOKERLERİ	19
2.8. TETRODOTOKSİN (TTX)	19
2.9. RANOLAZİNE (RNL)	22
2.10. RİLUSOLE (RİL)	25
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	31
3.2. FARMAKOLOJİK AJANLARIN HAZIRLANMASI.....	31
3.2.1. RNL	31
3.2.2. RİL.....	31
3.2.3. Tetradotoksin (TTX)	31
3.3 TOKSİSİTE.....	32
3.4. HÜCRE PROLİFERASYONU	33
3.5. HÜCRE HAREKETİ (MİGRASYON= MOTİLİTE)	33
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	34
4. BULGULAR.....	35

4.1. TOKSİSİTE.....	35
4.2. HÜCRE ÇOĞALMASI	36
4.2.1. Hücrelerin Büyümesi ve Korelasyonu.....	37
4.2.2. Hücre Proliferasyonu.....	39
4.3. MİGRASYON (MOTİLİTE).....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ	69



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Farklı tipteki iyon kanalları (https://www.cusabio.com/c-20803.html).	5
Şekil 2.2: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı (Andavan ve Gruber, 2011).	6
Şekil 2.3: 2018'de dünya çapında erkeklerde insidans ve ölüm oranları (Globocan, 2018)	11
Şekil 2.4: 50-69 Yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen kanserlerin yüzdelik dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014).	12
Şekil 2.5: Kanser hücrelerinde metastatik süreç.	16
Şekil 2.6: Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin orijini.	18
Şekil 2.7: TTX'in kimyasal formülü.	20
Şekil 2.8: Ranolazine'in kimyasal formülü.	23
Şekil 2.9: Riluzole'ün kimyasal formülü.	26
Şekil 4.1: Mat-LyLu hücrelerine RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonu uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdesi (\pm SE).	35
Şekil 4.2: AT-2 hücrelerine RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonu uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdesi (\pm SE).	36
Şekil 4.3: Mat-LyLu hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki ve doğru denklemi ile korelasyonu.	37
Şekil 4.4: AT-2 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki ve doğru denklemi ile korelasyonu.	38
Şekil 4.5: Mat-LyLu hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL'in kombine olarak 24 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları (\pm SE).	39
Şekil 4.6: Mat-LyLu hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL'in kombine olarak 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları (\pm SE). (* $P<0,05$).	40
Şekil 4.7: AT-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL'in kombine olarak 24 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları (\pm SE).	41

Şekil 4.8: AT-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL'in kombine olarak 48	42
Şekil 4.9: RNL, RİL ve RNL+RİL'in, Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi.	44



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: VGSC α alt birimlerinin buldukları dokular ve ilişkisi oldukları kanser tipleri (Goldin ve diğ., 2000; Brackenbury, 2012)	7
Tablo 2.2: VGSC β alt birimlerinin, buldukları dokular ve ilişkili oldukları kanser tipleri (Brackenbury and Isom, 2011; Brackenbury, 2012).....	7
Tablo 2.3: VGSC α ve β alt birimlerinin kanser hücrelerindeki tamamlayıcı işlevleri.....	8
Tablo 2.4: VGSC'ler tarafından düzenlenen metastatik hücre davranışları (Brackenbury, 2012).....	10
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan hücreler ve değerlendirilen parametrelere ait şema.....	32
Tablo 4.1: Mat-LyLu hücrelerine TTX, RNL, RİL ve RNL+RİL uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri(\pm SE). *:($P<0,05$).....	43

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

Ca²⁺ : Kalsiyum

K⁺ : Potasyum

Na⁺ : Sodyum

Cl⁻ : Klor

α : Alfa

β : Beta

Kısaltmalar Açıklama

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

AP: Aksiyon Potansiyeli

DMSO : Dimetil Sülfoksit

FDA : Amerikan İlaç ve Besin Birliği

GRM1: Metabotropik Glutamat Reseptörü 1

HEK293 : İnsan Embriyonik Böbrek Hücreleri

IARC : Uluslararası Kanser Ajansı

INa(P) : Israrlı Sodyum Kanal Akımı

INa(T) : Geçici Sodyum Kanal Akımı

MMP : Matriks Metalloproteinaz

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium Bromide

PSA : Prostat Spesifik Antijen

PSS: Periferik Sinir Sistemi

RİL: Riluzole

RNL : Ranolazine

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

TNBC: Üçlü Negatif Meme Kanseri

TTX : Tetrodotoksin

VGSC : Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RANOLAZİNE ve RİLUZOLE KOMBİNASYONUNUN Na^+ 1.7 VOLTAJ KAPILI SODYUM KANAL (VGSC) BLOKERİ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Ceyda ÖNEN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN

İyon kanalları, hücre zarında bulunan ve açılıp kapanarak partiküler iyonların zardan geçişini sağlayan transmembran proteinlerdir. İyon kanallarından voltaj kapılı iyon kanalları (VGSC) diğer hücrelerin yanı sıra, metastatik kanser hücreleri tarafından da ekspresse olurlar. Kontrolsüz büyüme ve çoğalmaları ile karakterize olan kanser hücrelerinin uzaktaki organlarda oluşturdukları metastazlar, kanserden meydana gelen ölümlerin en temel sebeplerindedir. Prostat, meme ve kolon kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonu sırasında, VGSC ekspresyon düzeylerinin artması, yeni antimetastatik hedef olabileceklerini ortaya koymaktadır. VGSC ile yapılan *in vitro* çalışmalar bu kanalların fonksiyonunun, kanser hücrelerinin metastazıyla ilişkili olduğunu, kanal fonksiyonunun inhibe edilmesiyle, metastatik aktivitede de inhibisyon meydana geldiğini göstermiştir. Böylece VGSC blokasyonu yapan ajanlar/ilaçlarla bu hücre hareketlerinin baskılanabileceği bulunmuştur.

Klinikte, anjina pectoris tedavisinde kullanılan Ranolazine (RNL) Na^+ iyon kanallarını bloke ederek etki gösterir ve kalpteki diastolik fonksiyonları iyileştirerek, iskemi sonrasındaki bozuklukları azaltmaktadır. Literatürde RNL'nin, hücrelerin lateral ve transvers hareketlerini inhibe ettiği ve akciğer metastazını azalttığı saptanmıştır. Nöroprotektif bir ilaç olan Riluzole (RİL) ise, ALS hastalığında kullanılmakta ve spesifik VGSC blokeri olarak etki göstermektedir. İnsan prostat kanseri hücrelerinde RİL'in, hücre poliferasyonunu ve sıçan prostat kanseri hücrelerinde lateral motiliteyi inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Na⁺ kanal blokeri olan antianjinal RNL ve nöroprotektif RİL kombinasyonunun, Dunning sıçan prostat kanser modeli yüksek metastatik Mat-LyLu ve düşük metastatik AT-2 hücre soyları üzerindeki etkileri değerlendirilerek, antimetastatik hedef olan VGSC'ler ile RNL+RİL kombinasyonu arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, toksik olmadığı saptanan farmakolojik ajanlardan RNL+RİL kombinasyonunun 5 µM+5 µM konsantrasyonu yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken AT-2 hücreleri üzerinde bir etki göstermemiştir. Hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen RNL, RİL, RNL+RİL konsantrasyonlarının 48. saatte Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketi/motilitesi üzerinde inhibisyon meydana getirdiği saptanmıştır. VGSC blokeri olan RNL ve RİL'in kombine etkilerinin ilk kez değerlendirildiği bu çalışma, 2,5 µM+2,5 µM RNL+RİL kombinasyonunun prostat kanser hücrelerinin metastaza gidişinde rol oynayan lateral hücre hareketi üzerinde etkili olabileceğini *in vitro* olarak ortaya koymuştur. Ancak antimetastatik tedavide yerini alabilmesi için, VGSC blokeri ajanların hem tek başlarına hem de kombinasyonlar şeklindeki rollerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Temmuz 2019, 83 sayfa.

Anahtar kelimeler: VGSC, Prostat kanseri, Mat-LyLu hücreleri, Ranolazine, Riluzole, Motilite

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EVALUATION AS $Na_v1.7$ VOLTAGE GATED SODIUM CHANNEL (VGSC) BLOCKER OF RANOLAZINE AND RILUZOLE COMBINATION

Ceyda ÖNEN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN

Ion channels are transmembrane proteins located in the cell membrane that open and close, enabling the passage of particulate ions through the membrane. Voltage-gated ion channels (VGSC) from ion channels are, among other cells, expressed by metastatic cancer cells. The cancer cells that are characterized by uncontrolled growth and proliferation form metastases in distant organs are one of the main causes of death from cancer. Increased VGSC expression levels during migration and invasion of prostate, breast and colon cancer cells reveal that they may be new antimetastatic targets. *In vitro* studies with VGSC have shown that the function of these channels is associated with metastasis of cancer cells, and inhibition of channel function results in inhibition of metastatic activity. Thus, it has been found that these cell movements can be suppressed by agents / drugs that block VGSC.

Clinically, Ranolazine (RNL), used in the treatment of angina pectoris, acts by blocking the Na^+ ion channels and improves diastolic functions in the heart, reducing post-ischemic disorders. In the literature, RNL has been shown to inhibit lateral and transverse movement of cells and reduce lung metastasis. Riluzole (RIL), a neuroprotective drug, is used in ALS disease and acts as a specific VGSC blocker. In human prostate cancer cells, RIL has been shown to inhibit cell proliferation and lateral motility in rat prostate cancer cells.

In this study, the effects of antianginal RNL and neuroprotective RIL combination with Na⁺-channel blocker on Dunning rat prostate cancer model high metastatic Mat-LyLu and low metastatic at-2 cell lineages were evaluated and the relationship between Vgscs and RNL+RIL combination with the antimetastatic target was determined.

According to the results, 5 μ M + 5 μ M concentration of RNL + RIL combination of non-toxic pharmacological agents inhibited proliferation of high metastatic Mat-LyLu cells but did not show an effect on AT-2 cells. RNL, RIL, RNL + RIL concentrations that do not affect cell proliferation were found to occur inhibition of lateral movement / motility of Mat-LyLu cells at 48 hours. This study, which was the first to evaluate the combined effects of RNL and RIL, a VGSC blocker, revealed *in vitro* that the 2.5 μ M+2.5 μ M RNL+RIL combination may be effective on lateral cell movement, which plays a role in the progression of prostate cancer cells to metastasis. However, in order to take its place in antimetastatic treatment, the roles of VGSC blocker agents both alone and in combination form need to be investigated both *in vitro* and *in vivo*.

July 2019, 83 pages.

Keywords: VGSC, Prostate cancer, Mat-LyLu cells, Ranolazine, Riluzole, Motility

1. GİRİŞ

Dünyada kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelen ikinci sırada gelen ölüm nedenidir. Erkeklerde en sık teşhis edilen kanser türü ise, akciğer kanserinden sonra prostat kanseridir (Edwards ve diğ., 2005; Jemal ve diğ., 2010; Bray ve diğ., 2018). Hücreler genetik mutasyonlar (proto-onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerde) ve DNA'larındaki epigenetik değişiklikler (hipo- veya hiper-metilasyon) sonucu kanser hücrelerine dönüşerek tümörleri oluşturmaya başlar. Aşırı proliferasyon gösteren hücreler aynı zamanda apoptoza dirençli bir hal alır. Primer tümör oluşumunu takiben metastatik potansiyeli olan hücreler yerel veya uzak bölgelere yayılır ve metastazı oluşturmaya başlar (Hanahan ve Weinberg, 2000). İkincil bölgelerdeki tümörleri oluşturmak için kanserin primer neoplazmadan yayılımı olan metastaz, vakaların yaklaşık %90'ında kansere bağlı ölümlerin nedenidir ve genellikle tedavi edilemeyecek durumdadır (Stetler-Stevenson ve diğ., 1993; Sporn, 1996; Pantel ve Brakenhoff, 2004; Djamgoz ve Onkal, 2013; Fairhurst ve diğ., 2015; Bagan ve diğ., 2019). Özellikle metastazların sıklıkla görüldüğü prostat kanserinde ikincil tümör oluşumu ortamın da etkisiyle (büyüme faktörü ve yüksek Ca^{+2} içeriği) kemiklerde yoğunlaşmaktadır. Bunun dışında akciğer, karaciğer ve beyinde de metastazlar geliştirebilmektedir (Bubendorf ve diğ., 2000). Metastaz baskılayıcıların keşfi (Berger ve diğ., 2004; Vaidya ve Welch, 2007), metastatik hastalığın da ilaçlarla tedavi edilebileceği ihtimalini arttırmıştır. Bu ihtimal dahilinde kanser hücrelerinin metastatik davranışını düzenleyen genlerin, proteinlerin ve sinyal yollarının belirlenmesinde araştırmalar yapılmıştır (Schwirzke ve diğerleri., 1999; Weigelt ve diğ., 2005). Bu noktada iyon kanallarının keşfi umut vaat eden bir gelişme olmuştur. Voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC) çok çeşitli metastatik karsinomlarda antimetastatik ilaç hedefleri olarak kullanılmaya başlamıştır. VGSC'ler, aksiyon potansiyellerinin (AP'ler) başlatılması ve yayılmasına aracılık ettikleri "uyarıcı" dokularda (örneğin nöronlar ve kas) yaygın şekilde ifade edilir (Ogata ve Ohishi, 2002). Ayrıca fonksiyonel rollerinin daha az tanımlandığı glia, endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitelyal kökenli metastatik kanser hücreleri de dahil olmak üzere klasik olarak "uyarılmayan" hücre tiplerinde de ifade edildiği gösterilmiştir (Diss ve diğ., 2004). Metastatik kanser hücrelerinde VGSC gen ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenmiş ve kanser istilasını kontrol eden bir gen transkripsiyonel ağının ana regülatörü olduğu ifade edilmiştir (House ve diğ., 2010).

İnsan ve sıçan prostat kanseri hücrelerinde VGSC'lerin bulunduğu tespit edilmiştir (Laniado ve diğ., 1997; Bennet ve diğ., 2004; Onganer ve Djamgoz, 2007; Nakajima ve diğ., 2009). Prostat kanseri araştırmalarında yaygın olarak Dunning sıçan prostat tümör modeli deneysel model olarak kullanılmaktadır (Tennant ve diğ., 2000; Yıldırım ve diğ., 2012; Bagan ve diğ., 2016). VGSC'ler üzerinde metastaz oluşumunu engellemek üzere kanal blokeri olarak çeşitli ilaçlar ve toksinler kullanılmaktadır. Dunning sıçan prostat kanser hücrelerinden olan Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinde bulunan VGSC'lerin Tetrodotoksin (TTX) (Grimes ve diğ., 1995., Yıldırım ve diğ., 2012), Gabapentin (Bagan ve diğ., 2016), Fenitoin (Fairhurst ve diğ., 2014; Fairhurst ve diğ., 2015), Ranolazine (Driffort ve diğ., 2014; Karagöz, 2015; Bagan ve diğ., 2019), Lidocaine (Altun ve Purut, 2017) gibi iyon kanal blokerleri ile baskılanmasıyla metastaz oluşumunun inhibe edildiği gösterilmiştir.

Ranolazine (RNL), kronik anjina tedavisi için kullanılan anti-iskemik bir ilaçtır. Bunu yaparken VGSC "ısrarlı akım" $INa(P)$ 'nin engelleyicisi olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Undrovinas ve Maltsev, 2006; Rajamani ve diğ., 2008). Riluzole (RİL) ise, nörodejeneratif bir hastalık olan amyotrofik lateral skleroz (ALS) tedavisinde kullanılan ve etki mekanizmasında VGSC inhibisyonu olan nöroprotektif bir ilaçtır (Zona ve diğ., 1998; Urbani ve Belluzi, 2000). Farklı tedavilere yönelik olarak onaylanan bu iki ilaç; klinikteki kullanım amacından farklı olarak, VGSC blokeri olması özelliği dikkate alınarak, kanserde antimetastatik tedavi seçeneği olabilme ihtimali çerçevesinde araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme özelliğinin yanı sıra hücrelerin lateral hareketi üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği ve metastaz oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Abdul ve Hoosein, 2002; Driffort ve diğ., 2014; Karagöz, 2015; Uzun ve diğ., 2017; Bagan ve diğ., 2019). Farklı kanserlerde RNL ve RİL'in hem antiproliferatif hem de antimetastatik etkilerinin varlığı nedeniyle tek başlarına kullanıldığı çalışmalar bulunmakla birlikte, kombinasyon şeklinde *in vitro* veya *in vivo* olarak uygulandığına dair bir bilgiye literatürde rastlanılmamıştır.

Çalışmada, Na^+ kanal blokeri olan antianjinal RNL ve nöroprotektif RIL ilaçlarının Dunning sıçan prostat kanser modeli yüksek metastatik Mat-LyLu ve düşük metastatik AT-2 hücre soylarının proliferasyonu ve Mat-LyLu hücrelerinin lateral motilitesi üzerindeki etkisi *in vitro* olarak ayrı ayrı ve iki ilacın kombinasyonu şeklinde incelenerek değerlendirilmiştir. Kanalların bloklanmasıyla metastatik yayılımın baskılanabileceği hipotezi doğrultusunda yapılan

deneylerde iki kanal blokerinin bir arada kullanılmasının ayrı ayrı kullanılmasına göre hem proliferasyon hem de motilite üzerindeki etkisi ilk kez karşılaştırılmıştır.



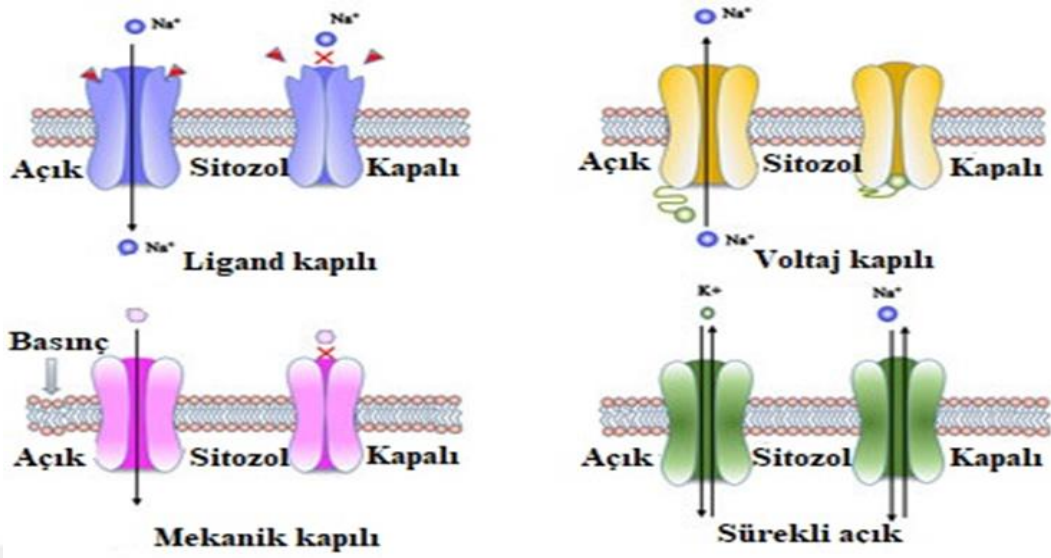
2. GENEL KISIMLAR

2.1. HÜCRE MEMBRANINDA İYON KANALLARI

Hücre membranı çift katlı fosfolipit tabakadan meydana gelmiştir, dış ortamdan hücreyi ayırır ve korur. Seçici geçirgen özellikteki hücre membranından karbondioksit ve oksijen gibi gazlar, üre ve etanol gibi küçük yüksüz moleküller basit difüzyon yolu ile geçebilirken, iyonlar veya diğer moleküller bu şekilde geçemezler. İyonların hücre membranından geçebilmesi için, çift katlı fosfolipit tabakada bulunan özel proteinlerin aracılığına ihtiyaç vardır. Bunlar; hücre zarında iyon iletkenliğini sağlayan kanal proteinleri, enerjiye ihtiyaç duymadan iyonları taşıyan taşıyıcı proteinler ve enerji kullanarak iyonları elektrokimyasal gradientin tersine taşıyabilen taşıyıcı pompalardır (Lodish ve diğ., 2003). Özellikle inorganik iyonları taşıdığı için bu kanal proteinleri iyon kanalları olarak adlandırılırlar. İyon kanalları, plazma membranları veya hücre içi organellerin membranları boyunca iyon akışını sağlayan por oluşturu proteinler olarak da tanımlanmaktadır (Hille, 2001).

İyon kanalları açık olduklarında, Na^+ , K^+ , Ca^{+2} ve Cl^- gibi spesifik oldukları iyonların elektrokimyasal derecelenmeleri doğrultusunda zardan pasif olarak geçmelerini sağlarlar. Kanallar geçirgen oldukları iyonun ismiyle anılırlar. Örneğin; sodyum kanalı, potasyum kanalı gibi. Bu kanallar, açılıp kapanmasını sağlayan uyarıya göre sınıflandırılır (Şekil 2.1). Bunlar, hücre içi veya dışı bir ligantın kanala bağlandığı ligand kapılı iyon kanalları, hücre zar potansiyelindeki değişimlerle hareket eden voltaj kapılı iyon kanalları ve mekanik gerilmeye bağlı olarak çalışan mekanosensitif iyon kanallarıdır. Bunların dışında bir uyarıdan bağımsız olarak sürekli açık olan kanallar bulunur (Lodish ve diğ., 2003; Karp, 2009; Kandel, 2013).

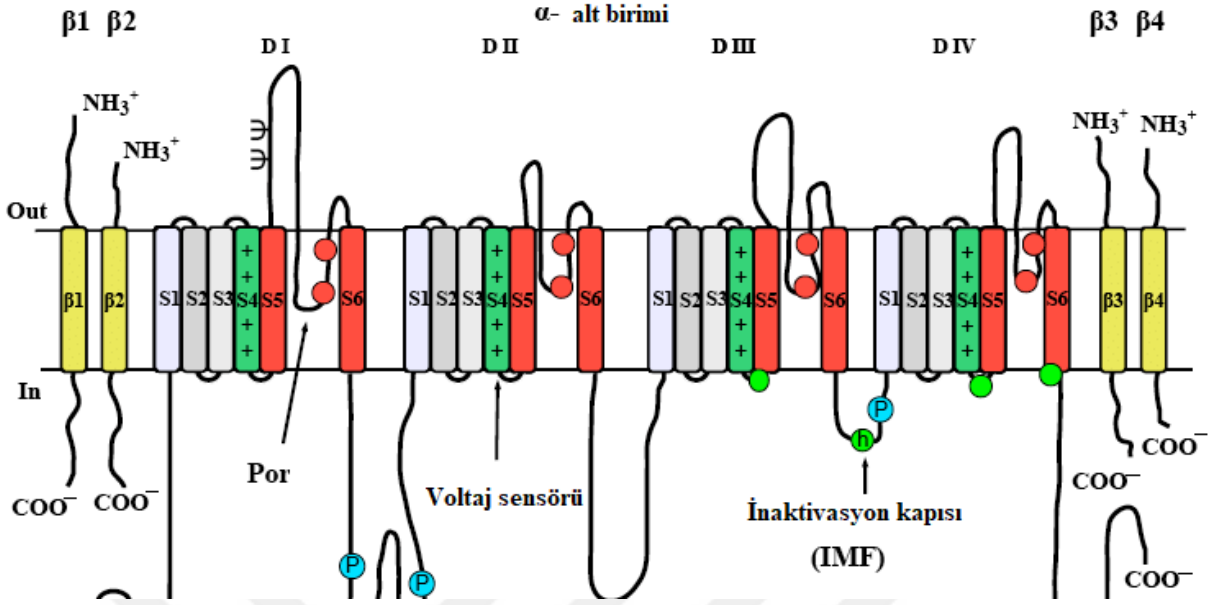
İyon kanallarının en önemli fizyolojik özelliği elektriksel sinyallerdir ve elektriksel uyarının yüksek olduğu sinir ve kas gibi hücrelerde membran potansiyeli oluşumunu sağlarlar. Kas kasılması, sinir hücrelerinin uyarımı, hormon salgılanması, çevresel uyarıların alınması, elektriksel sinyaller tarafından gerçekleştirilir. Voltaj kapılı iyon kanallarının bu işlevleri; uyarılabilir hücrelerde zar depolarizasyonu ile aksiyon potansiyeli oluşumunu sağlar. Voltaj kapılı iyon kanalları gen ekspresyonunda, hücre bölünmesinde, hücreysel olaylarda, sinyal iletiminde de rol oynarlar (Yu ve diğ., 2005; Catterall ve diğ., 2007).



Şekil 2.1: Farklı tipteki iyon kanalları (<https://www.cusabio.com/c-20803.html>).

2.2. VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI (VGSC)

Voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC), hayvan hücrelerinde, zar depolarizasyonu ile aksiyon potansiyelini başlatan ve elektriksel uyarılabilirliğin düzenlenmesini sağlayan iyon kanalıdır (Goldin, 2003). Elektriksel sinyalleşme üzerine modern araştırma dönemi, 1952'de, Hodgkin ve Huxley tarafından sinir, kas ve diğer uyarılabilir hücrelerde başlatılmıştır (Hodgkin ve Huxley, 1952 a, b, c ve d). Hodgkin ve Huxley'den sonra, Hille ve Armstrong, sodyum ve potasyum akımlarının 1960'larda belirli iyon kanalları tarafından yürütüldüğü fikrini ortaya koymuş ve birçok araştırmacı, sodyum kanallarının işlevsel özelliklerini daha iyi tanımlamak ve kavramsal modeller geliştirmek için patch clamp tekniğini kullanmıştır. Hille, (1971, 1972, 1975) iyon seçiciliği, doygunluk ve sodyum geçirgenliği bloğunu analiz etmiş ve sodyum kanalının iyon seçiciliği filtresinin detaylı bir modelini ve bunun sodyum seçiciliğindeki işlevini geliştirmiştir. Ayrıca, lokal anesteziğin ve sodyum kanalları üzerinde etki yapan bazı ilaçların, kanalın porlarındaki bir reseptör bölgesine bağlandığını göstermiştir (Hille, 1977). 1980 yılında, sodyum kanalına ait protein alt birimlerini fotoafinite etiketlemesiyle tanımlamak için akrep toksinleri kullanılarak, 260 kDa büyük α alt birimleri ve 30-40 kDa'luk daha küçük alt birimleri ortaya çıkarılmıştır (Beneski ve Catterall, 1980). VGSC bir α alt birimi (220-260 kD) ile bir veya daha fazla β alt birimden (33-36 kD) oluşmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı (Andavan ve Gruber, 2011).

Memelilerde işlevsel VGSC α alt birimlerinin aminoasit düzenlenmesinde dokuz farklı gen tarafından kodlanan (SCN1A-SCN11A) dokuz VGSC alt tipi (Na_v 1.1 – Na_v 1.9) bulunmaktadır (Tablo 2.1). Ayrıca bir tane de işlevsel olmayan alt tip (Na_x) kodlanmaktadır. Bunların dışında, dört β alt birimi (β 1- β 4) kodlayan SCN1B-SCN4B genleri tanımlanmıştır (Tablo 2.2). α alt birimi, VGSC'nin fonksiyonel merkezlerini içerir ve 4 adet oldukça benzer transmembran alandan (I-IV) oluşur (Catterall, 2000). Her alan bir α sarmalının (S1-S6) altı transmembran segmentini içerir. S4, transmembran segmentini zardan dışarı hareket ettirerek, kanal proteininin üç boyutlu yapısının değişmesine neden olarak kanal açıklığını sağlayan bir voltaj sensörüdür (Ulbricht, 2005). S5 ve S6 bölümleri, merkezi por alanını içine alır ve bunların yerleştirme dizileri, Na^+ seçiciliğini belirleyen ve bir geçit (Shen ve diğ., 2017) olarak işlev gören seçicilik filtresini oluşturur.

VGSC'ler farklı hücrelerde farklı fizyolojik rollere sahiptir ve fonksiyonlarında meydana gelen düzensizlikler bazı hastalıklara sebep olmaktadır. Sinir, kas hücreleri gibi uyarılabilir hücrelerin yanı sıra lenfosit, glia, fibroblast, epitel kökenli metastatik kanser hücrelerinde de VGSC ekspresyonunun olduğu bilinmektedir (Diss ve diğ., 2004).

Tablo 2.1: VGSC α alt birimlerinin buldukları dokular ve ilişkisi oldukları kanser tipleri (Goldin ve diğ., 2000; Brackenbury, 2012).

VGSC alt tipleri	Gen	Doku lokasyonu	Kanser tipi
Na _v 1.1	SCN1A	Merkezi sinir sistemi (MSS), Periferel sinir sistemi (PSS), kalp	Yumurtalık
Na _v 1.2	SCN2A	MSS, PSS	Rahim ağzı, mezotelyoma, yumurtalık, prostat
Na _v 1.3	SCN3A	MSS, PSS	Yumurtalık, prostat, küçük hücreli akciğer kanseri
Na _v 1.4	SCN4A	İskelet kası	Rahim ağzı, yumurtalık, prostat
Na _v 1.5	SCN5A	İskelet kası, kalp, beyin	Meme, kolon, lenfoma, nöroblastoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık, küçük hücreli akciğer kanseri
Na1.6	SCN8A	MMS, PSS, kalp	Meme, rahim ağzı, lenfoma, melanoma, mezotelyoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat, küçük hücreli akciğer kanseri
Na _v 1.7	SCN9A	PSS, nöroendokrin hücreler, duyuşal nöronlar	Meme, rahim ağzı, lenfoma, mezotelyoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık, prostat
Na _v 1.8	SCN10A	Duyuşal nöronlar	Prostat
Na _v 1.9	SCN11A	Duyuşal nöronlar	Lenfoma, küçük hücreli akciğer kanseri

Tablo 2.2: VGSC β alt birimlerinin, buldukları dokular ve ilişkili oldukları kanser tipleri (Brackenbury and Isom, 2011; Brackenbury, 2012).

Protein	Gen	Doku lokasyonu	Kanser tipi
β 1	SCN1B	Kalp, iskelet kası, böbreküstü, MSS, glia, PSS	Meme, rahim ağzı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
β 2	SCN2B	MSS, PSS, kalp, glia	Meme, rahim ağzı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
β 3	SCN3B	MSS, böbreküstü, böbrek, PSS	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat
β 4	SCN4B	Kalp, iskelet kası, MSS, PSS	Meme, rahim ağzı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, prostat

VGSC α alt birimi metastatik hücrelerde yüksek oranda ekprese edilir ve migrasyon, invazyon gibi davranışların oluşumuna yol açar (Brackenbury ve diğ., 2008; Onkal ve Djamgoz, 2009). β alt birimi ise, zayıf metastatik hücrelerde yaygın olarak ekspresye olur ve plazma zarı üzerindeki voltaj kapılı iyon kanallarının ekspresyonunun düzenlenmesi, adhezyonun artırılmasını sağlar (Tablo 2.3) (Brackenbury ve diğ., 2008; Kaufmann ve diğ., 2010). Ayrıca son zamanlarda VGSC'lerin β alt birimlerinin α alt biriminin fonksiyonunu etkileyebileceği, biyofiziksel ve farmakolojik özelliklerini kanal fosforilasyonu ile birlikte düzenleyebildiği de ortaya konmuştur (Sokolov ve diğ., 2018).

VGSC aktivitesi ile açığa çıkan membran akımı iki farklı bileşenden oluşmaktadır. Membran akımının ilk bileşenini 1 ms'n kadar süren geçici akım ($INa(T)$), ikinci bileşenini, 100 ms'n den 1 dakikaya kadar devam eden ısrarlı akım ($INa(P)$) meydana getirmektedir. $INa(P)$ biyofiziksel olarak, yavaş inaktive olması dışında geçici sodyum kanal akımına $INa(T)$ benzer özellikler taşımaktadır. Repolarizasyonda $INa(P)$ çok hızlı deaktive olur ve makroskopik düzeyde $INa(T)$ ile aktivasyon özellikleri bakımından çok az bir fark vardır (Saint ve diğ., 1992).

Tablo 2.3: VGSC α ve β alt birimlerinin kanser hücrelerindeki tamamlayıcı işlevleri.

α alt birimi	β alt birimi
Kuvvetli metastatik hücrelerde yüksek oranda ifade edilir (Onkal ve Djamgoz, 2009).	Yüksek derecede zayıf metastatik hücrelerde ekspresye edilir (Jansson ve diğ., 2012).
Migrasyon, invazyon olmak üzere metastatik hücre davranışlarını artırır (Brackenbury ve diğ., 2008)	Adhezyonu artırır (Jansson ve diğ., 2012).
α alt birim ekspresyonunu aktiviteye bağlı olarak pozitif geri besleme ile düzenler (Brackenbury ve Djamgoz, 2006; Chioni ve diğ., 2010)	Süreç genişletmeyi artırır (Jansson ve diğ., 2012).
	Migrasyonu düzenler (Jansson ve diğ., 2012).
	α alt birim mRNA ifadesini düzenler (Jansson ve diğ., 2012; Chioni ve diğ., 2009)

2.3. VGSC VE KANSER

VGSC'ler birden fazla kanser türünde etkisini göstermesi nedeniyle, geniş bir araştırma alanına sahiptir. Yaklaşık yirmi yıl kadar önce, araştırmacılar VGSC ekspresyonu yüksek olan kanser hücrelerinde hücre hareketliliğinin ve metastatik potansiyelin arttığını gözlemlemiştir. Ayrıca, bu hücrelerin invaziv kapasitesinin ve artan VGSC ekspresyonunun, bir nörotoksin olan TTX ile azaltılabildiği bulunmuştur (Grimes ve diğ., 1995; Laniado ve diğ., 1997). O zamandan bu yana, hem α hem de β alt birimleri birçok kanser hücre hattında ve bazı hasta biyopsilerinde tespit edilmiştir. VGSC α alt birimleri *in vivo* olarak servikal, yumurtalık, meme, kolon tümörlerinde, bazı prostat, akciğer kanserlerinde ekspresse edilmektedir (Fraser ve diğ., 2005; Gao ve diğ., 2010; House ve diğ., 2010; Hernandez-Plata ve diğ., 2012; Patel ve Brackenbury, 2015) (Tablo 2.1).

Çalışmalar, VGSC ekspresyonu ile metastatik potansiyel arasında hem pozitif hem de negatif ilişkileri tespit etmişlerdir. Meme kanseri hücrelerinde $N_{\alpha}1.5$ ekspresyonu, artan nüks ve metastaz riski ile pozitif korelasyon gösterir (Fraser ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2012) ve benzer bir eğilim kolon, prostat ve yumurtalık kanserleri için de tarif edilmiştir. Bununla birlikte, gliomada VGSC α ekspresyonu ile klinik derece arasında ters bir korelasyon vardır ve akciğer kanseri hücre hatlarında korelasyon görülmez (Schrey ve diğ., 2002; Onganer ve Djamgoz 2005; Roger ve diğ., 2007). VGSC α alt birimlerinin ekspresyonunun, migrasyon, invazyon ve metastazı ilerlettiği belirlenmiştir (Brackenbury 2012) (Tablo 2.4).

Pek çok kanser birden fazla α alt birimini ekspresse eder, ancak tüm alt tipler tüm kanserlerde ekspresse edilmez (Tablo 2.1). Çoklu α alt birimlerini ifade eden birçok kanserde, baskın bir α alt birimi tanımlanmıştır. Örneğin, lenfoma ve meme kanseri hücrelerinde, en yüksek oranda ekspresse edilen α alt birimi $N_{\alpha}1.5$ 'tir (gen: SCN5A), (Fraser ve diğ., 2004; Fraser ve diğ., 2005) prostat kanseri hücrelerinde ise, baskın α alt birimi $N_{\alpha}1.7$ 'dir (gen: SCN9A) (Diss ve diğ., 2001).

Bazı kanserlerde, α alt birim mRNA ve protein ekspresyonu, metastatik potansiyel ile ilişkilidir. Örneğin, meme kanserinde neonatal SCN5A ek varyantı, metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde, zayıf metastatik MCF-7 hücrelerine kıyasla ~ 1.800 kat daha yüksek ekspresse

Tablo 2.4: VGSC'ler tarafından düzenlenen metastatik hücre davranışları (Brackenbury, 2012).

Hücresel aktivite	Kanser tipi	Ekspresse olan alt birimler
Aşırı büyüme süreci	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$
Galvanotaksi	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7
Lateral motilite	Meme, mezotelyoma, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$, $\beta 2$
Migrasyon	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7
Endositik membran aktivite	Meme, prostat, küçük hücreli akciğer kanseri	Nav1.5, Nav1.7
Vesikular model	Meme, prostat	Nav1.7
Adezyon	Meme, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$, $\beta 2$
Gen ekspresyonu	Meme, kolon, prostat	Nav1.5, Nav1.7, $\beta 1$
İnvazyon	Meme, rahim ağzı, kolon, lenfoma, melanoma, küçük hücreli olamayan akciğer kanseri, prostat	Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, $\beta 1$, $\beta 2$

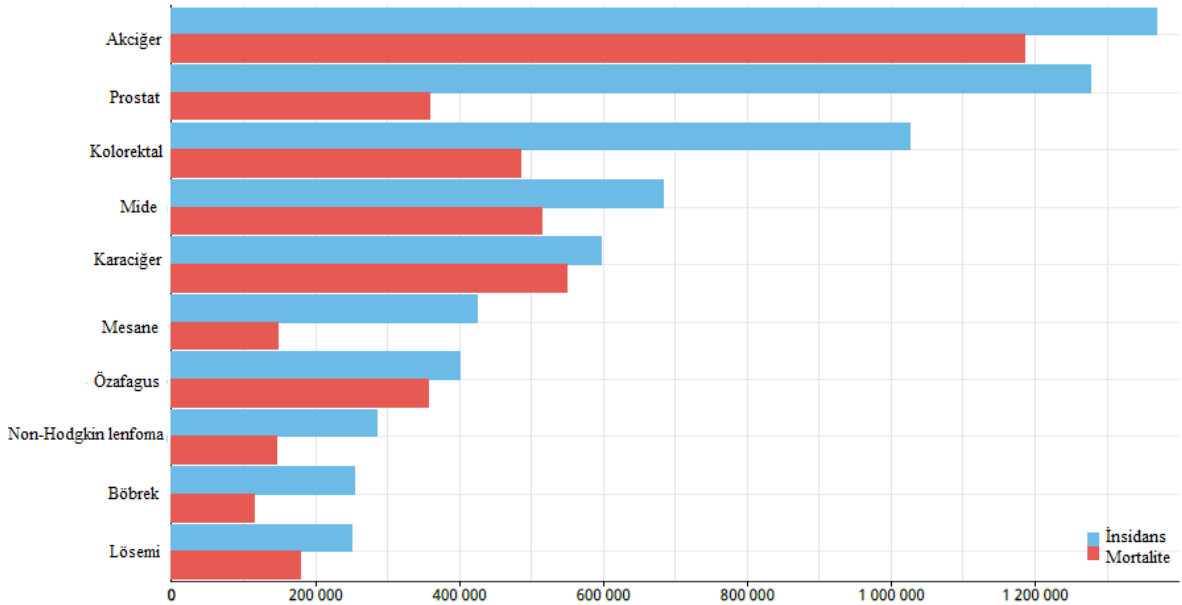
edilir. Na^+ akımları yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde saptanabilmesine karşın zayıf metastatik MCF-7 hücrelerinde izlenmez (Roger ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005). Baskın α alt birimi SCN9A, kanserli olmayan prostat numuneleri ile karşılaştırıldığında prostat kanseri biyopsilerinde bu alt birimin yükseldiği ve kuvvetli metastatik PC-3 ve Mat-LyLu hücrelerinde, zayıf metastatik LNCaP ve AT-2 hücrelerine göre daha fazla ekspresse edildiği saptanmıştır (Diss ve diğ., 2005).

SCN1B ve SCN2B ekspresyonu, prostat kanseri hücrelerinde metastatik potansiyel ile ilişkilidir (Diss ve diğ., 2008; Jansson ve diğ., 2012). $\beta 1$ ekspresyonu daha az invaziv meme kanseri hücre

soyları ile ilişkili bulunmuştur (Chioni ve diğ., 2009). Ancak farklı bir şekilde, bir meme kanseri fare modelinde, $\beta 1$ 'in aşırı ekspresyonunun, tümör büyümesini, metastazı ve anjiyogenezi arttırdığı da belirlenmiştir (Nelson ve diğ., 2014).

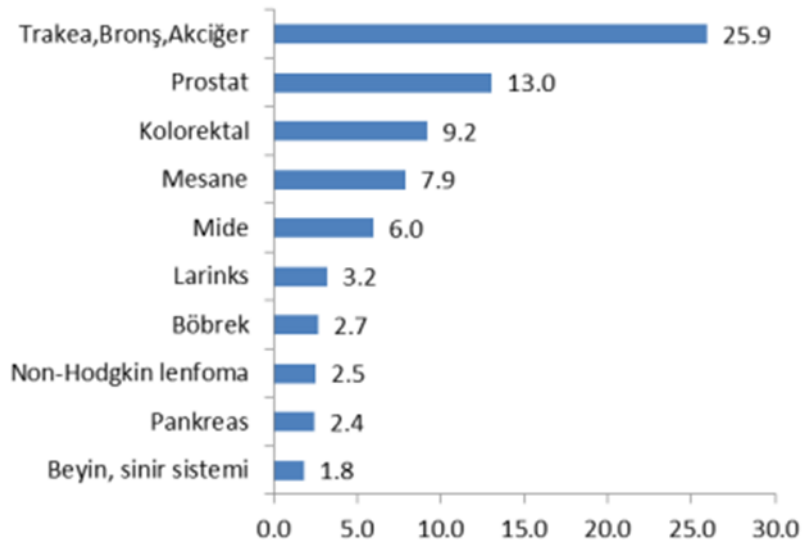
2.4. PROSTAT KANSERİ

Normal şartlar altında, sürekli bölünen hücreler düzenli bir şekilde büyürler, bölünürler ve yaşlanarak ölürlür. Hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptoz arasında bulunan kritik denge bozulursa, hücreler kontrol dışı büyümeye başlar ve kanser gelişimi görülür. Kanser insidansı ve mortalitesi dünya çapında hızla artmaktadır (Şekil 2.3). 2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre, kanser, 172 ülkenin 91'inde, 70 yaşından önceki ilk veya ikinci ölüm nedenidir. Bunlardan prostat kanseri, dünya genelinde görülme oranı bakımından erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir. Dünyada her yaştan erkekte tahmini prostat kanseri görülme sayısı 1,276,106, ölüm sayısı ise, 358,989 olarak hesaplanmıştır (GLOBOCAN 2018). 2040 yılına kadar 2,293,818 yeni vakanın daha görüleceği tahmin edilmesine rağmen, ölüm oranlarında %1,05 gibi daha küçük bir değişiklik beklenmektedir (Ferlay ve diğ., 2019). Bu değişiklik erken teşhis ve kanser ile daha etkili bir tedavinin yapılacağı düşüncesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 2.3: 2018'de dünya çapında erkeklerde insidans ve ölüm oranları (Globocan, 2018)

Türkiye’de ise halk sağlığı genel müdürlüğünün yayınladığı kanser istatistikleri raporuna göre toplamda kanser insidansı 100.000’de 212,6’dır. Ülkemizde tüm kanser insidansı, erkeklerde dünya insidansının üzerinde seyrederken kadınlarda bir miktar daha düşüktür. Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen kanser türü IARC’a üye 24 ülke, AB (28 ülke) ve ABD’de prostat kanseriyken tüm dünyada ve Türkiye’de akciğer kanserinden sonra prostat kanseri %12,9 ile ikinci sırada yer almaktadır (Türkyılmaz ve diğ., 2015).



Şekil 2.4: 50-69 Yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen kanserlerin yüzdeleri dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014).

Ülkeler arasındaki bu farklılıkların sebebi tam olarak belli değildir. Dünyada prostat kanseri insidansındaki bu farklılıklar prostat spesifik antijen (PSA) testine atfedilmektedir (Quinn ve Babb 2002). Örneğin, Avrupa’da, prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanserdir, 2018’de tahmin edilen yaklaşık 450.000 yeni prostat kanseri vakasıyla 2018’deki tüm yeni kanserlerin %24’ünü oluşturmaktadır. ABD’de ise, 2018’de kaydedilen tüm yeni kanser vakalarının %9,5’ini (164,690 yeni prostat kanseri vakası) oluşturan prostat kanseri ikinci en yaygın kanserdir. Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre, ABD ve Avrupa’daki prostat kanseri vakalarının yaklaşık %20-40’ı yaygın PSA testi ile aşırı teşhise bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (Etzioni ve diğ., 2002; Quinn ve Babb 2002; Draisma ve diğ., 2009).

Prostat kanseri erken evrede asemptomatik olabilir ve sıklıkla yavaş bir seyir izler hatta tedavi gerektirmeyebilir. İlerleyen evrelerde sık idrar yapma, idrar yaparken ağrı, idrar yapmada güçlük, idrarda kan görülmesi, pelvis bölgesinde ağrı gibi belirtiler ile ortaya çıkar. İleri evrelerde ise, prostat kanseri yoğunlukla kemik dokusuna metastaz yaptığından kemik ağrıları görülebilir. Pek çok prostat kanseri, normal olarak prostat dokusu ile ekspresse edilen bir glikoprotein olan PSA'nın (> 4 ng/ml) yükselmiş plazmatik seviyeleri ile tespit edilir. Bununla birlikte, prostat kanseri olmayan erkeklerde de çeşitli sebeplerle PSA'nın yüksek olduğu tespit edildiğinden, kanserin varlığını doğrulamak için doku biyopsisi büyük önem kazanmaktadır (Rawla, 2019).

Prostat kanseri tanısıyla pozitif korelasyon gösteren PSA'nın ve diğer biyobelirteçlerin tanımlanması, hastalığın epidemiyolojisinde devrim yaratmıştır. Gerçekten de, PSA testinin ve biyopsilerin başlatılmasından bu yana, ABD'de 1980'lerin sonlarından itibaren prostat kanseri insidansının iki kat arttığı kaydedilmiştir (Jemal ve diğ., 2015).

Prostat kanserinin birçok nedeni olmakla beraber, ana başlıklar; yaş, ırk, genetik faktörler, androjen hormonları ve diyet altında toplanmaktadır.

Yaş:

Prostat kanseri insidansı yaşa bağlı olarak artış gösterir (Ferlay ve diğ., 2019). İnsidans oranı, dünyada 65 yaş üstü erkeklerde yaklaşık %60'tır. 50 yaşın altındaki erkeklerde prostat kanseri görülme oranı oldukça düşüktür. Her ne kadar dünya genelinde 50 yaşın altındaki her 350 erkekten sadece 1 tanesine prostat kanseri teşhisi kalsa da, yaş ile hızla artmakta ve 50 ila 59 yaşları arasındaki her 52 erkekte görülme oranı 1'e yükselmektedir (Perdana ve diğ., 2016).

İrk:

Araştırmalar, Afrikalı-Amerikan erkeklerin dünyadaki en yüksek prostat kanseri insidansına sahip olduğunu ve diğer ırk ve etnik gruplarla karşılaştırıldığında erken yaşta hastalık geliştirme ihtimallerinin de daha yüksek olduğunu göstermiştir (Kheirandish ve diğ., 2002). Bu durum, yalnızca Afrika kökenli Amerikalılar için değil, Avrupa'da yaşayan Karayipliler ve siyah tenli erkeklerin de, prostat kanseri gelişimine daha yatkın bir genetik yapıya sahip oldukları ileri sürülmektedir (Chu ve diğ., 2011). Prostat kanseri insidansının, Afrika kökenli Amerikalılar arasında Afrika'dakilere göre 40 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu farklılıklar; çevresel faktörlerin prostat kanseri etiyolojisinde önemli bir rol oynadığını ve görülme

sıklığındaki değişikliklerin yetersiz tanı, tarama yöntemlerindeki farklılıklar ve sağlık hizmetlerine erişimdeki eşitsizliklerden kaynaklanabileceğini ortaya koymaktadır. Afrikalı-Amerikan erkeklerin sadece prostat kanserindeki mutasyonlara karşı daha hassas olan bazı spesifik genlere sahip olabileceğini değil, aynı zamanda bu mutasyonların daha agresif bir kanser türü ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Rawla, 2019). Bununla birlikte, Oliver (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, Afrikalı-Amerikan erkeklerin prostat kanseri semptomlarının erken teşhis edilebilme ihtimalinin Kafkas erkeklerinden daha düşük olduğunu ileri sürmüştür.

Genetik ve ailesel faktörler:

Birçok çalışma, kalıtsal genetik arka planın, prostat kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu ve hastalık risklerine %5 oranında katkıda bulunduğunu bildirmiştir (Sridhar ve diğ., 2010; Tortajada ve diğ., 2011). Özellikle, bu risk, genetikte “risk” alelleri denilen genlerin kalıtılarak daha yaygın ama az görülen genlerin lokuslarıyla karşı karşıya geldiğinde birkaç kat daha artmaktadır. Bazı prostat kanseri vakalarında retroviral enfeksiyonların tespiti, kronik retroviral enfeksiyonun potansiyel bağlantısını ve bunun sonucu olarak da doku iltihabıyla birlikte kanser başlangıcını göstermiştir (Eeles ve diğ., 2008; Schlaberg ve diğ., 2009).

Diyet:

Prostat kanseriyle diyet bağlantısının araştırıldığı önceki yıllarda, mortalite ile kişi başına tüketilen et, yağ ve süt ürünleri alımı arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğu yapılan çoklu ekolojik çalışmalarla ortaya konmuştur. (Hoell 1974; Armstrong ve Doll, 1975). İlerleyen yıllarda likopen türü flavonoidler, selenyum, kalsiyum, vitamin E, soya, yeşil çay ve omega-3 çoklu-doymamış yağ asitlerini içeren diyetlerin kanser riskini azaltabileceği saptanmıştır (Sonn ve diğ., 2005; Haddad ve diğ., 2006; Berquin ve diğ., 2007; Cheung ve diğ., 2008; Itsiopoulos ve diğ., 2009). Güneş ışığı veya UVB maruz kalma ile prostat kanseri insidansı arasında ise, ters bir ilişki gözlenmiştir (Mullins ve Loeb, 2012; Grant ve Peiris, 2012). Bu durum D vitamini eksikliğinin prostat kanseri riskini arttırabileceğini göstermektedir (Schwart ve Hulka, 1990). Keza obezite, ilerlemiş ve agresif prostat kanseri ile ilişkili olarak bulunmuştur (Greenwald 2004; Demark ve Moyad, 2007).

Androjenler:

Huggins ve Hodges (1941), prostat kanseri hastalarında kastrasyonun yararlarını gözlemlemiş ve prostat kanseri büyümesinin androjenler tarafından yönlendirildiğini ileri sürmüştür. İyi farklılaşmış prostat kanseri hücre hatları ile elde edilen birkaç *in vitro* veri, hücrelerin androjenin yokluğuna yanıt olarak apoptoz geçirdiklerini de göstermiştir (Kyprianou ve diğ., 1990; Webber ve diğ., 1996). Benzer şekilde, hayvan modelleriyle yürütülen *in vivo* çalışmalar, androjenlerin tümörigenezi ve ksenograft büyümesini desteklediğini ve androjen yoksunluğu ile tümör gerilemesinin meydana geldiğini göstermiştir (Bladou ve diğ., 1996; Ahmad ve diğ., 2008).

Prostat kanserinin tedavisi hastalığın seviyesine göre değişiklik göstermektedir. Hastalık başlangıç seviyesinde ise, aktif izleme ve izleyerek bekleme tercih edilmektedir. Sonraki aşamalarda, radikal prostatektomi, radyoterapi, brakiterapi, minimal invaziv tedavi yöntemlerinden biri kullanılmaktadır. Metastatik prostat kanseri ve kastrasyona dirençli prostat kanserinde ise, hormonal tedavinin uygulandığı yöntem izlenmektedir.

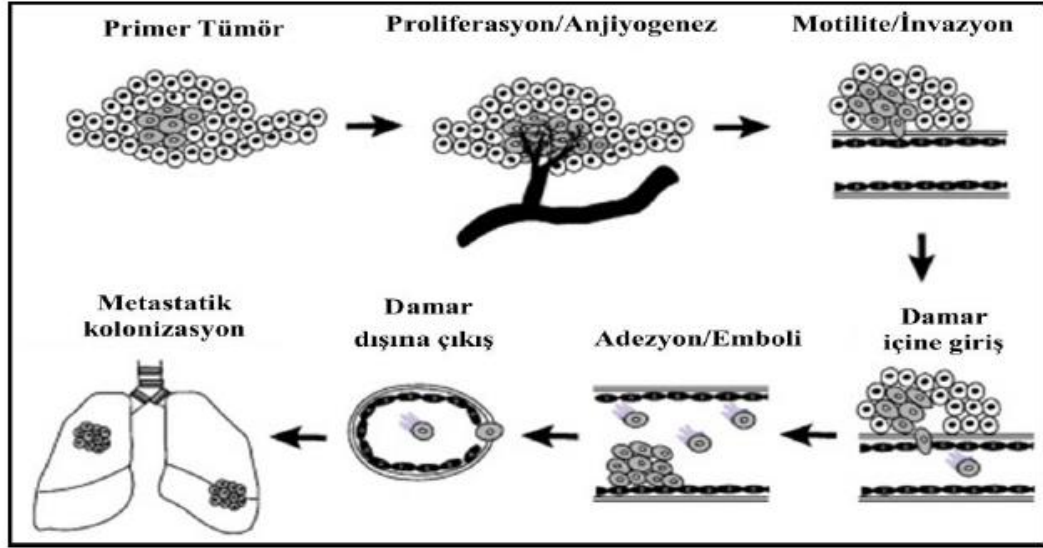
2.5. PROSTAT KANSERİ VE METASTAZ

Metastaz; kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılmasını, aktif bir şekilde migrasyonunu, tümör hücrelerinin kan ve/veya lenf sistemlerine girmesini, daha sonra damarların dışına çıkarak çevre dokulara penetre olmalarını ve sonuçta, bu dokularda çoğalmalarını kapsayan çok basamaklı bir süreçtir (Şekil 2.5). Bir kanser hücrelerinin metastaz yapabilmesi için bazı özellikleri edinmesi gerekir. Bunlar;

- 1) Normal hücrelerde gözlenen hücre-hücre bağlantılarından ayrılmaları
- 2) Proteolitik enzimler üretmeleri
- 3) Göç edici özellikleri kazanmaları yani hareket etmeleri gerekir (Madeja ve diğ., 2005).

Epitel hücre tabakalarının sağlam bir şekilde bir arada bulunmasını sağlayan E-kaderin iki hücrenin birbirine sıkıca yapışmasını gerçekleştiren bir moleküldür. E-kaderinin artan ekspresyonu, istila ve metastazın bir karşıtı olarak gelişmiştir ve ekspresyonunun/ifadesinin azaltılmasının bu fenotipleri güçlendirdiği bilinmektedir. İnsan karsinomlarında E-kaderinin

sıklıkla gözlenen down regülasyonu ve zaman zaman mutasyonel inaktivasyonu, metastaz oluşumuna yol açabilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.5: Kanser hücrelerinde metastatik süreç.

İnvaziv özellik kazanmış prostat kanseri hücrelerinin ekstrasellüler matriks ve bazal membranı yıkabilmeleri, matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerini üretip salgılamaları ile mümkündür. İnvazyona imkan sağlayan MMP ailesi enzimlerinden özellikle MMP2 ve MMP9'un, invazyon yapan kanser hücrelerinde ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Chiang ve Massague, 2008). Prostat kanserli hastalardan alınan örneklerde yapılan immunohistokimyasal çalışmalar MMP9'un prognostik marker potansiyeli taşıyacak düzeyde yüksek oranda ekspresse edildiğini de göstermiştir (Boxler ve diğ., 2010).

Bunların yanı sıra, Malign primer tümör hücrelerinin, apoptotik yollar, büyüme inhibitörleri, telomer kısalması gibi tümör baskılayıcı mekanizmalardan kaçabildikleri de belirlenmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011).

Yüksek mortalite oranı birincil olarak primer tümörün metastazına bağlıdır. Hastalık lokalize evrede iken tanı konulan erkekler için 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %100 iken, metastatik prostat kanseri tanısı alan erkeklerin sadece %28'i 5 yıldan uzun süre hayatta kalmaktadır.

Tümörün metastaz gelişiminden önce erken teşhis ve tedavi edilebilmesi, hastanın sağ kalımını arttırmak bakımından kritik bir öneme sahiptir (Nandana ve Chung, 2014).

1967'den 1995'e kadar 40 yaşın üzerindeki 19.316 erkek ile yapılan rutin otopside, prostat kanseri olan 1.589 (%8,2) hastanın raporları analiz edilmiş, prostat kanserli 1.589 hastanın %35'inde metastaz bulunmuş ve en sık tutulumun kemik (%90), akciğer (%46), karaciğer (%25), plevra (%21) ve adrenal bezler (%13) olduğu belirlenmiştir (Bubendorf ve diğ., 2000). Yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışmaları sonucu Nav1.7 voltaj kapılı sodyum kanalının, AT-2 hücreleri ile kıyaslandığında, yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinde VGSC ekspresyonununun 1000 kat daha fazla olduğu ve Nav1.7'nin bu hücrelerdeki baskın VGSC alt tipi olduğu tespit edilmiştir (Diss ve diğ., 2001).

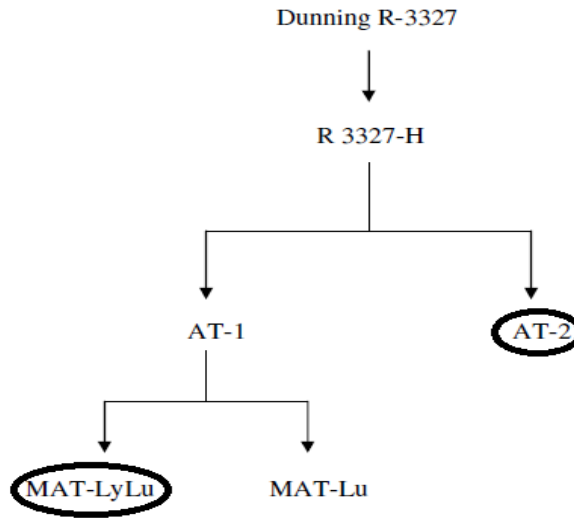
2.6. PROSTAT KANSERİ DENEYSEL MODELLERİ

Kanser hastalığının biyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi için, hücre soylarını içeren *in vitro* ve deney hayvanlarını içeren *in vivo* araştırma modelleri kullanılmaktadır. *In vitro* ve *in vivo* model sistemleri insanlarda meydana gelen kanser hastalığının önlenmesine ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine büyük katkılar sağlamaktadır.

Prostat kanserinde kullanılan *in vivo* deneysel modeller; Dunning, Noble, ACI ve Pollard tümör modelleridir (Pollard, 1980). Bunlardan Dunning modeli en etkili, en önemli olanı ve hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak yetistirilebilen çok sayıda alt hücre soyuna sahip bir prostat kanseri modelidir. Bu model, 1961 yılında W. F. Dunning tarafından, Copenhagen ırkı yaşlı bir erkek sıçanın dorsal prostat epitelinde spontan bir tümör olarak gözlemlenmiş, bu tümörden elde edilen parçalar deri altı olarak Copenhagen ve Copenhagen x Fischer çaprazlamasından meydana gelen sıçanlara nakledilerek *in vivo* olarak yaşatılmıştır (Wenger ve diğ., 1984; Tennat ve diğ., 2000). Orijinal tümörden seri *in vivo* ve *in vitro* pasajlamalar sonucu Parental R-3327 tümörü gelişmiş ve pasajlamalara devam edildiğinde düşük metastaz yeteneğine sahip olmakla birlikte, hızlı büyüyen AT-1 ve AT-2 adı verilen tümörler meydana getirilmiştir (Şekil 2.6). AT-1'in seri pasajlamaları ile yüksek metastatik özelliğe sahip iki farklı hücre soyu oluşmuştur. Bunlar, hem akciğere hem lenf sistemine metastaz yapabilen Mat-LyLu ile sadece akciğere metastaz yapabilen Mat-Lu hücreleridir (Tennat ve diğ., 2000). Bu çalışmada kullanılan yüksek

metastatik Mat-LyLu hücreleri %90'ın üzerinde metastaz kapasitesine sahipken, AT-2 hücreleri %10'un altında metastaz kapasitesine sahiptir (Fraser ve diğ., 1999).

Günümüzde prostat kanserine yönelik *in vitro* çalışmalar; *in vivo* deneysel modellerden kökenlenen hücre soyları veya insan prostat kanser ve metastazlarından elde edilen hücre soyları kullanılarak yürütülmektedir. İnsan prostat kanseri dokularından hücre soyları oluşturma başarısı %1 gibi oldukça düşüktür. Araştırmalara konu olan yaklaşık 10 kadar prostat kanseri hücre soyu bulunmaktadır ve bunların çoğu, androjen reseptörü ekspresyonu veya prostat spesifik antijen salgılanması gibi hastalığın tipik özelliklerini üretmez durumdadır (Fizazi ve Navone, 2005). Araştırmalarda yaygın kullanılanlardan PC3 hücreleri yüksek metastatik, DU145 hücreleri orta derecede metastatik ve LNCaP hücreleri düşük metastatik potansiyele sahiptir (Pulukuri ve diğ., 2005). PC3 hücre soyu, IV. derece insan prostat kanseri kemik metastazından oluşturulmuştur (Kaighn ve diğ., 1979). Fokal adezyon kinazı (FAK) 'ın artan metastatik potansiyele sahip prostat karsinomu hücre hatlarının göçünü düzenlemedeki rolününün araştırıldığı bir çalışmada metastatik olan PC3 ve DU145 hücreleri göç kapasitesi gösterirken, zayıf metastatik LNCaP hücrelerinin göç edebilmesi için bir uyarıcıya ihtiyacı olduğu tespit edilmiştir (Slack ve diğ., 2001). DU145 ve PC3 hücreleri, apoptoza LNCaP hücrelerinden daha dirençlidir (McEleny ve diğ., 2002).



Şekil 2.6: Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin orjini.

2.7. VGSC BLOKERLERİ

Klinikte kanalopatik hastalıklar olarak adlandırılan özellikle epilepsi, anjina pektoris, Long QT sendromu gibi kalp hastalıklarında, nöroprotektif ve lokal anestetik olarak VGSC ekspresyonunu bloke eden ilaçlar kullanılmaktadır. Bunlar; antiepileptikler (lamotrigin, karbamazepin, fenitoin, gabapentin), lokal anestetikler (ropivakain, lidokain), antiaritmikler (meksiletin, ranolazine) ve nöroprotektif (riluzole) ile nörotoksinler (tetrodotoksin) olarak gruplandırılmaktadır. Nörotoksin olan TTX, kuvvetli bir VGSC blokeri olmakla beraber, toksisitesi nedeniyle klinikte değil, pozitif kontrol olarak diğer kanal blokeri ilaçların deneysel çalışmalarında kullanılmaktadır (Koltai, 2015).

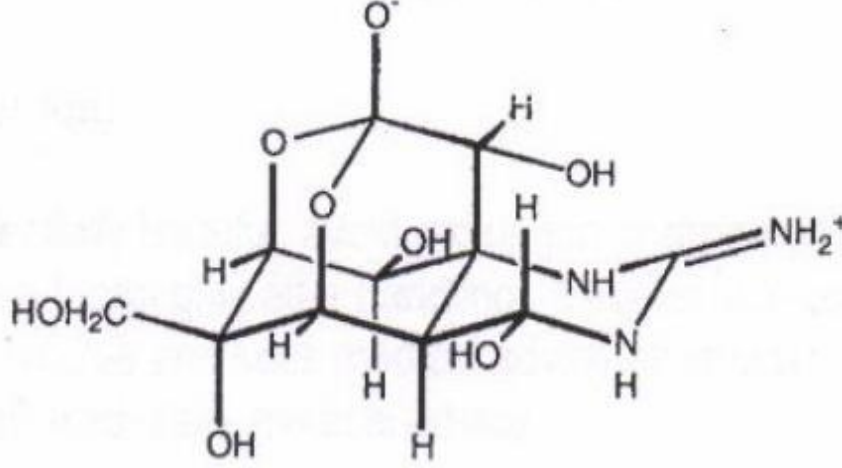
VGSC blokerleri ile TTX Na⁺ kanalında farklı yerlere bağlanmaktadır. VGSC blokerleri hidrofilik özellikteki kanal porunu veya hidrofobik hücre zarını geçerek kanalın içi yüzeyindeki ortak bölgeye bağlanırlar. Bu bölge “lokal anestetik bağlayıcı bölge” olarak adlandırılır (Fozzard ve diğ., 2005; Lipkin ve Fozzard, 2005). Yapılan çalışmalarla VGSC’lerin α alt ünitesinde, TTX’in bağlandığı bölge ve lokal anestetik bağlayıcı bölgenin dışında, en az beş farklı bağlayıcı bölgenin daha olduğu saptanmıştır (Catterall, 2007; Nicholson, 2007).

2.8. TETRODOTOKSİN (TTX)

Moleküler formülü C₁₁H₁₇O₈N₃ olan güçlü bir sodyum kanal blokeri olan TTX, suda çözünen, protein yapılı olması nedeniyle ısıya dirençli bir nörotoksindir (Wu ve diğ., 2005) (Şekil 2.7). İlk olarak 1909 yılında Dr. Yoshizumi Tahora tarafından Tetraodontidae familyasından “puffer fish/ balon balığı” olarak adlandırılan balıkta bulunmuştur (Wu ve diğ., 2005; Bane ve diğ., 2014). Bunun yanı sıra; gastropodlar, semender, yengeçler, kurbağalar, deniz salyangozu, denizyıldızı, mavi halkalı ahtapot, kurdele solucanı ve bakterilerde de bulunabilmektedir.

TTX’in en önemli özelliklerinden biri; voltaj kapılı sodyum kanalı membranının dış yüzeyindeki reseptör bölgesine saniyenin ondan biri sürede bağlanarak kanaldaki sodyum akımını bloke etmesidir (Cestele ve Catterall, 2000; Johnson, 2002). Toksisitesinden dolayı terapötik bir ajan olarak kullanılmayan TTX, VGSC fiziolojisinin incelenmesi deneylerinde pozitif kontrol olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. TTX, VGSC'nin hücre dışı kısmına bağlanır, iyon kanalının işlevini devre dışı bırakır ve organizmada solunum felci yoluyla ölüme neden olan çok zehirli bir etki meydana getirir (Koltai, 2015).

Hücrelerin metastaz yapabilmek üzere kazandığı bazı morfolojik ve fonksiyonel özellikler bulunmaktadır. Hücre hareketi ve metastaz için gerekli olan hücre uzantılarının, TTX uygulanan hücrelerde azaldığı ve hücrelerin daha kompakt bir hal aldığı gözlenmiştir (Fraser ve diğ., 1999).



Şekil 2.7: TTX'in kimyasal formülü.

Hücrelerin lateral hareketini saptamak amacıyla gerçekleştirilen deneylerde 1 μ M TTX'in, Mat-LyLu hücrelerinin lateral motilitesini %47 oranında azalttığı gösterilmiştir (Fraser ve diğ., 2003). Hücre hareketini bu şekilde etkilemesine rağmen, 600 nM, 1 μ M ve 6 μ M konsantrasyonlardaki TTX'in Mat-LyLu hücrelerinin 48. saat hücre çoğalmasını inhibe edici bir etki meydana getirmediği gözlenmiştir (Grimes ve diğ., 1995; Recatala, 1999; Fraser ve diğ., 2000; Fraser ve diğ., 2003). Mat-LyLu hücrelerine 6 μ M TTX uygulamasının ardından morfolojilerinin düşük metastatik AT-2 hücrelerine benzediği ve Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketinin azaldığı saptanmıştır (Fraser ve diğ., 1999; Fraser ve diğ., 2003). İnsan prostat kanser hücreleri olan, yüksek metastatik karakterli PC-3 ve düşük metastatik karakterli LNCaP ile yapılan çalışmalardan da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Laniado ve diğ., 1997).

Mat-LyLu ve AT-2 hücreleriyle yapılan "patch-clamp" çalışmaları yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinde VGSC akımı mevcutken, düşük metastatik AT-2 hücrelerinde fonksiyonel VGSC'lerin bulunmadığını göstermiştir. Bu çerçevede Mat-LyLu hücrelerinde VGSC akımı

bloke edildiğinde hücrelerin invazyon yeteneklerinde anlamlı bir azalma olurken, AT-2 hücrelerinin invazyon özelliklerinde bir etki oluşturmamıştır (Grimes ve diğ., 1995).

In vivo olarak yapılan bir çalışmada, yüksek metastatik Mat-LyLu hücreleri ile oluşturulan dunning model prostat kanserinin metastatik gelişimini engellemek üzere VGSC'lerin TTX ile bloke edilmesi sonucu akciğer metastazlarının %44 oranında azaldığı ve TTX tedavisi alan hayvanların yaşam sürelerinin %22 oranında arttığı gözlenmiştir (Yıldırım ve diğ., 2012).

VGSC aktivitesi; spesifik kanal blokeri TTX veya bir kanal açıcı veratridin ile bir dizi konsantrasyon kullanılarak farmakolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin, elektrik alanı uygulanmasına katoda doğru göç ederek kuvvetle tepki verdiğini göstermiştir. Buna karşılık, zayıf metastatik AT-2 hücrelerinde böyle bir tepki ile karşılaşılmamıştır. TTX, Mat-LyLu hücrelerinin galvanotaktik tepkisini bastırırken, veratridin onu arttırmıştır. Her iki bileşik de düşük metastatik AT-2 hücreleri üzerinde çok az etkiye sahip olmuştur. Bu sonuçlar, özellikle yüksek derecede metastatik hücrelerde meydana gelen fonksiyonel VGSC ekspresyonu ile tutarlı ve aynı zamanda, herhangi bir hücre tipinde, VGSC ile galvanotaksis kontrolünün ilk kez ortaya konmasıdır (Djamgoz ve diğ., 2001).

Kanal ekspresyonu ve aktivitesini düzenleyen mekanizmaları tespit edip, bundan sorumlu olabilecek olası serum faktörlerini belirlemeye yönelik, fetal bovin serumunun (FBS), insülin ve sığır serum albümini içeren serum ajanı (SR-2) ile değiştirilen besiyeri test edilmiştir. İnsan meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinin kullanıldığı çalışmada, lateral hareketlilik, enine göç ve yapışma bakımından, kanalın metastatik hücre davranışlarına katılımının, hücre dışı biyokimyasal koşullara bağlı olduğunu göstermiştir. Normal ortamda (%5 FBS), spesifik VGSC blokeri olan TTX, daha önce de belirtildiği gibi, bu hücre davranışları bloke etmiştir. Buna karşılık, SR-2 ortamında, TTX'in etkisi tersine dönerken, AG1024 ile sinyal veren endojen insülin / insülin benzeri büyüme faktörü reseptörünün bloke edilmesi, TTX'in anormal etkilerini ortadan kaldırmıştır. (Pan ve Djamgoz 2008).

Fonksiyonel voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu normal ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarında da araştırılmıştır. Patch-clamp koşullarında TTX ile inhibe edilebilir sodyum akımlarının ölçümü yapılmıştır. Kanalların TTX tarafından inhibe edilmesi, *in vitro*

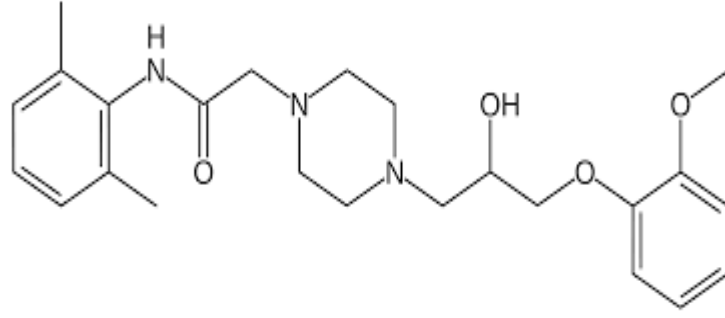
invazyonun %40-50 oranında azaltılmasından sorumlu olduğu ortaya konmuştur (Roger ve diğ., 2007).

Na^+/K^+ -ATPase (NKP), sinyal iletimi için önemli bir iyon taşıyıcısıdır ve hücre zarı üzerinde yer almaktadır. Ekspresyonunun ve aktivitesinin, metastatik olmayan meme kanserine oranla metastatik meme kanserinde arttığı gözlenmiştir. Ouabain ve TTX tedavisi ile, NKP aktivitesini önemli ölçüde inhibe edilmiş ve hücre proliferasyonu, hareketliliği, istilasını önemli ölçüde azaltılmıştır (Khajah ve diğ., 2018).

RT-PCR ile $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.4$ ve $\text{Na}_v1.5$ 'in mRNA ekspresyon seviyeleri, normal ovaryum dokularına kıyasla ovaryum kanseri hücrelerinde anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$ ve $\text{Na}_v1.7$ 'nin mRNA ekspresyon seviyeleri, düşük metastatik ovaryum kanseri hücrelerine (Angline) kıyasla yüksek metastatik yumurtalık kanseri hücrelerinde (Caov-3 ve SKOV-3) anlamlı şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. 30 uM TTX tedavisi, proliferasyonu etkilemezken Caov-3 ve SKOV-3 hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu %50-60 azaltmıştır (Gao ve diğ., 2010)

2.9. RANOLAZİNE (RNL)

Ranolazine, Ranexa/Latixa (N-(2,6-dimetilfenil)-2-[4-[2-hidroksi-3-(2-metoksifenoksi)-propil]-piperazin-1-il] asetamid dihidroklorid) ($\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$) 427,537 g/mol molekül ağırlığına sahiptir (Şekil 2.8). Ranolazine (RNL), 2006 yılında ilk kez FDA tarafından kronik anjina tedavisi için onaylanan antiaritmik ve antianjinal bir ilaçtır (Banon ve diğ., 2014). Diastolik ve sistolik kalp yetmezliği veya iskemi esnasında RNL'in iyon kanallarının (Na^+) çalışmasını ve Na^+ 'ı arttırdığı, pozitif feedback yolu ile de Ca^{+2} artışı sonucu kalpte oluşan ağrı, kasılma, fonksiyon bozuklukları üzerine ilacın terapötik bir etki gösterdiği saptanmıştır (Sossalla ve diğ., 2008). RNL, Na^+ iyon kanallarını bloke ederek kalpteki diastolik fonksiyonları iyileştirmekte ve iskemi sonrasındaki bozuklukları azaltmaktadır (Filardi, 2011).



Şekil 2.8: Ranolazine'in kimyasal formülü.

RNL'in birçok hedef üzerinde geniş bir farmakolojik profil gösterdiğini ve kalp hücreleri üzerinde karmaşık elektrofizyolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Antzelevitch ve diğ., 2004). Ayrıca, RNL'in, nöronlardaki $Na_v1.7$ ile kas hücrelerindeki $Na_v1.4$ VGSC'leri engelleyebileceği gösterilmiştir (Wang ve diğ., 2008). RNL'in en güçlü etkilerinden biri, ısrarlı akım olan $INa(P)$ 'in seçici inhibisyonudur (Antzelevitch ve diğ., 2004; Undrovinas ve diğ., 2006; Fredj ve diğ., 2006). Fredj ve diğ., (2006), $Na_v1.5$ 'i aşırı ekspresse eden HEK 293 hücrelerinde, RNL'nin, $INa(P)$ geçici akımdan ($INa(T)$)10 kat daha fazla kuvvetle önemli ölçüde bloke ettiğini göstermiştir. Kronik kalp yetmezliği olan köpek ventriküler miyositlerinde, RNL'in geçici $INa(T)$ 'a oranla $INa(P)$ 'yi seçici olarak 38 kat daha fazla inhibe ettiği bildirilmiştir (Undrovinas ve diğ., 2006). Son zamanlarda Huang ve diğ., (2010), RNL'in, mutant $Na_v1.1$ 'in $INa(P)$ 'sini (Long QT sendromu tip 3 ile ilişkili) geçici akıma kıyasla 16 kat daha yüksek potansiyel ile inhibe ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla, RNL'in, lidokain gibi, diğer VGSC blokerlerine kıyasla daha etkili bir $INa(P)$ engelleyici olduğu da bildirilmiştir (Burashninov ve diğ., 2007).

Kardiyak iyon akımı üzerindeki etkisini özellikle $INa(P)$ üzerinde gösteren RNL'nin, IC_{50} değerinin $5,9 \mu M$ olduğu saptanmıştır (Antzelevitch ve diğ., 2004). RNL'in benzer bir etkisi, $Na_v1.4$ 'ü ekspresse eden insan embriyonik böbrek 293T hücreleri üzerinde de gözlenmiş ve IC_{50} değerleri $2,4 \mu M$ $INa(P)$ ve $225,4 \mu M$ $INa(T)$ olduğu tespit edilmiştir (Wang ve diğ., 2008). RNL ile Na^+ akımının bloke edilebildiği aynı zamanda insan $Nav1.7$ ve sıçan $Nav1.8$ kanalları için de ortaya konmuştur (Rajamani ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2008). RNL, kalp kasında geç sodyum akımını inhibe ederek, bir sodyum kanal inhibitörü olarak çalışmakta ve CYP3A enzimi tarafından metabolize edilmektedir (Koltai, 2015).

Dişi ve erkek sıçanlarda farmakokinetiği incelenmiş, dişi sıçanlardaki RNL plazma konsantrasyonlarının, erkek sıçanlardakinden anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, RNL farmakokinetiğinde sıçanlar için cinsiyet farkının varlığını göstermiştir (Liu ve diğ., 2003).

RNL *in vivo* olarak da araştırılmış ve 30 mg / kg, olarak günde iki kez RNL alan APC (Min / +) farelerde tümörlerin sayısını arttırdığı, tümörlerin daha invaziv hale geldiği ve bunun da yağ asidi oksidasyonundan, kullanılan yüksek RNL konsantrasyonundan (10- 30 mg / kg, 20- 60 µM'ye karşılık gelen) ya da hayvan modelinin yapısından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. (Suckow ve diğ., 2004). Ancak, bu çalışmada kullanılan RNL'in, insanlar için önerilen maksimum dozdan çok daha yüksek olduğunu da (günde iki kez 500-1000 mg) belirtmek gerekir (Chaitman, 2006).

Na_v1.5 ekspresyonu yüksek olan MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde RNL etkilerini araştıran Driffort ve diğ., (2014), yüksek metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerini kullanarak yaptığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmasında RNL'nin meme kanseri hücrelerinin invazyonunu azalttığını göstermiştir. Ayrıca RNL, Na_v1.5'in embriyonik / neonatal izoformunun (genellikle insan meme kanseri hücrelerinde bulunan aktif izoform) aktivitesini de etkili bir şekilde azaltmış ancak hücrenin canlılığını değiştirmemiştir. Ayrıca MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin pro-invaziv morfolojisini azaltmıştır. Toksik olmayan dozlardaki RNL tedavisinin; nude farelere kuyruk veninden enjekte edilen MDA-MB-231 meme hücreleri ile oluşturulan tümörünün metastatik kolonizasyonunda da önemli bir azalma sağladığını göstermiştir.

Yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin Copenhagen ırkı erkek sıçanlara deri altı inokülasyonu ile prostat tümörü oluşturulan sıçanların, ısrarlı akım inhibitörü olarak Na⁺ akımını bloke eden RNL ile tedavi edilmesi sonucunda; tümürlü hayvanların primer tümör, akciğerdeki metastaz sayısı, çaplarının değerlendirilmesi ile metastaz boyutu ve sağ kalımları araştırılmıştır. 2,5 µM ve 5 µM RNL'nin, 0,1-1 mm çapa sahip akciğer metastazlarının sayısında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %54,6 ve %57,27 oranında inhibisyon meydana getirdiği, 10 µM RNL ise, çapı 0,1-1 mm olan metastazların sayısında, bir stimülasyon oluşturduğu saptanmıştır. Bunun yanında, 22 günlük deney sürecinde kontrol grubunda 50. günde tüm hayvanlar öldüğü halde, RNL grubunda bir sıçanın sağkalımı, 114. güne kadar ulaşabilmiştir (Karagöz, 2015).

Dunning model prostat kanserli Copenhagen sıçanlara sistemik olarak verilen RNL'nin primer tümörlerin ve metastazların gelişimi üzerindeki etkisi test edilmiştir. RNL (2.5 ve 5 μ M), akciğer metastaz sayısını %63'e kadar azaltırken primer tümörünezi etkilememiştir. Ayrıca primer tümör ile metastazlardaki hücrelerin VGSC ekspresyonları da incelenmiş ve $Na_v1.7$ ekspresyonu yapan hücre sayısı RNL tedavisi alan hayvanların metastazlarında azalırken, $Na_v1.7$ ekspresyon şiddeti/seviyesi yükselmiştir. İnsan prostat dokusu mikrodizilerinde, VGSC protein ekspresyonu, kanserli ve kanserli olmayan dokularda anlamlı şekilde daha yüksek bulunduğu saptanmıştır (Bugan ve diğ., 2019).

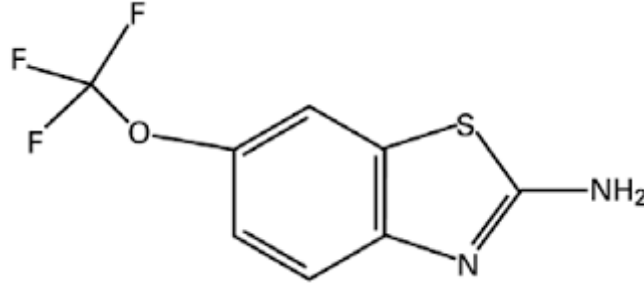
Literatürde prostat kanseri üzerine RNL+RİL kombinasyonunun etkilerine dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak prostat kanseri hücre modellerinden LNCaP ve 22Rv1 üzerinde enzalutamide ile RNL, etomoxir, ve perheksilin kombinasyonlarının değerlendirildiği *in vivo* bir çalışma bulunmaktadır. Enzalutamide dirençli hücrelerde ve fare TRAMPC1 hücrelerinde dahil olmak üzere kombinasyonların güçlü bir inhibe edici etkisi gözlemlenmiştir. Nude farelerde 22Rv1 ksenografları oluşturulmuş ve 3 hafta boyunca, enzalutamide, RNL veya kombinasyonu (enzalutamide+RNL) ile tedavi edilmiştir. Kombinasyon etkilerini en üst düzeye çıkarmak ve toksisiteyi en aza indirmek için düşük dozda ilaç kullanılmıştır. Tek başına RNL tedavisi, enzalutamide uygulamasına benzer bir tümör büyümesi göstermesine karşın enzalutamide+RNL kombinasyonu ile sistemik bir tedavi sonucu tümör büyümesinin azaldığı tespit edilmiştir (Flaig ve diğ., 2017).

MDA-MB-231 kullanıldığı bir araştırmada ise, propranolol (2.5 ve 25 μ M) ve RNL (5 μ M) ve bunların kombinasyonunun lateral motiliteyi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, propranolol (25 μ M) ve RNL (5 μ M) ve bunların kombinasyonu invazyonu da inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu deneyler, tümör ilerlemesini daha iyi temsil eden hipoksik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Propranolol, bu hücrelerde ekspresse edilen baskın VGSC alt tipi olan $nNav1.5$ protein ekspresyonunu da önemli ölçüde azaltmıştır (Lee ve diğ., 2019).

2.10. RİLÜZOLE (RİL)

İlk olarak 1963'te Rusça bir yayında yeni bir kimyasal bir bileşik olarak bildirilen Riluzole'un (2-amino 6-trifluoromethoxy-benzothiazole) 1985'te Rhone Poulenc'teki bilim adamları tarafından kemirgen ve babunlarda antikonvülzan etki gösterdiği ortaya konmuştur (Mizoule ve diğ.,1985) (Şekil 2.9). Daha sonra nöroprotektif ajan olarak kullanımı üzerine yoğun

araştırmalar yapılmıştır. Klinik alışmalar, RİL'in, hem üst hem alt motor nöronların dejenere olduğu hızlı ilerleyen ve ölümcül bir hastalık olan amyotrofik lateral sklerozlu (ALS) hastaların ömrünü uzattığını göstermiştir (Bensimon ve diğ, 1994; Lacomblez ve diğ., 1996). ALS tedavisi için 1996'da FDA tarafından kullanımı onaylanan ilk ve tek ilaç olan RİL, birçok ölkede ve son on yıldır da ölkemizde ALS tedavisinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan birkaç alışma, RİL'in duygudurum ve anksiyete bozukluklarında (Mathew ve diğ., 2005; Pittenger ve diğ., 2008) ve obsesif-kompulsif bozuklukta (Coric ve diğ., 2005) klinik olarak kullanılabileceğini göstermiştir. RİL; VGSC blokeri (Song ve diğ 1997; Beltran-Parrazal ve Charles, 2003; Wang ve diğ 2008) olmasının yanı sıra, voltaj kapılı kalsiyum kanalı (VGCC) blokeri, glutamat / Nmetil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti ve glutamat taşıyıcı aktivatörüdür (Bellingham, 2011). RİL hidrofobiktir ve bu nedenle deneylerde dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünerek kullanılmaktadır. RİL'in, insanlarda 10 µM'ye kadar olan konsantrasyonlarda zararlı olmadığı gösterilmiştir (Le Liboux ve diğ., 1999; Weiss ve diğ., 2010).



şekil 2.9: Riluzole'ün kimyasal formölü.

Bilinen bir glutamaterjik nörotransmisyon inhibitörü olarak RİL, antikonvülsan, anksiyolitik, anestezik, sedatif ve anti-iskemik özelliklere sahip güçlü bir nöroprotektif ajandır (Aggarwal ve Cudkowicz, 2008). RİL, en az dört mekanizma yoluyla uyarıcı amino asit nörotransmisyonu üzerine etki eder, bunlardan en önemli olanı, glutamaterjik sinir terminalleri üzerinde VGSC kanallarının etkisizleştirilmesinden kaynaklanan glutamat salınımının bir inhibisyonudur (Ajroud-Driss ve diğ., 2007). RİL, Na⁺ kanallarını bloke eder, spesifik hedefi, voltaj kapılı sodyum kanalı α alt birimi olan Na_v1.6'dır (Knox ve diğ., 2010). Ayrıca, RİL ısrarlı Na⁺

akımlarını %46 oranında antagonize edebilir ve doğal motor nöronal uyarılabilirliğini azaltarak nöroprotektif etki gösterir (Donovan ve diğ., 2011).

RİL, orta derecede güçlü, GRM1 (metabotropik glutamat reseptörü) antagonistidir, ancak GRM1 ekspresse eden hücreler tarafından çok güçlü bir glutamat salınımı inhibitörüdür. GRM1 blokasyonunun ALS ilerlemesinin yavaşlamasına neden olduğu bilinmemektedir, ancak nöronal hücrelerde RİL'in bağlanması üzerine GRM1 yoluyla sinyallemenin inhibisyonu belgelenmiştir. Son zamanlarda RİL'in, GRM1 sinyallemesinin merkezi bir bileşeni olan protein kinaz C inhibitörü olduğu ileri sürülmüştür (Noh ve diğ., 2000).

RİL'in, VGSC aktivitesini bloke ettiği ve GRM1'i inhibe ederek kanser kemoterapisine bağlı bazı yan etkileri azalttığı belirlenmiştir (Busserolles ve diğ., 2013). Namkoong ve diğ., (2007), GRM1-pozitif insan melanom hücrelerinin RİL ile tedavisinin, glutamat salınımını azalttığını, hücre proliferasyonunu baskıladığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. GRM1 ekspresse eden insan melanom hücrelerinin RİL ile tedavisi, hücre proliferasyonunun inhibisyonunun yanı sıra, hücre dışı glutamat seviyelerinin de azalmasına yol açmaktadır. İnsan melanom hücre ksenograftlarının RİL ile 18 gün boyunca tedavisi sonucu, kontrollere kıyasla tümör büyümesi %50 oranında inhibe edilmiştir. Bu veriler, insan melanomunda glutamat sinyallemesinin önemini göstermekte ve glutamat sinyallemesinin inhibisyonunun melanom tedavisi için yeni bir hedef olabileceği anlamına gelmektedir.

RİL'in, glutamaterjik sinyalizasyon üzerindeki inhibe edici etkisinden yola çıkılarak RİL'in üçlü negatif meme kanserinin (TNBC) büyümesini inhibe ettiği ve bu etkide GRM1 rol oynadığı gösterilmiştir. TNBC ve ER + hücrelerinde RİL'in antitümör özellikleri hücre proliferasyonu ve invazyonu ile yumuşak agarda koloni oluşturma yöntemi kullanılarak araştırılmış ve RİL aktivitesi GRM1 seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. Deneyler, GRM1 veya shGRM1 ekspresse eden Lentiviral vektörler kullanarak, genin susturulduğu veya fazla ekspresse edildiği hücrelerde tekrarlanmıştır. RİL, hem TNBC hem de ER + hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve koloni oluşumunu inhibe etmiştir. TNBC hücrelerinde hem hücre proliferasyonu hem de invazyon deneylerinde; GRM1 ekspresyonu ile RİL yanıtları arasında bir ilişki gözlenmiştir (Speyer ve diğ., 2016).

RİL, kültüre edilmiş nöronlarda, beyinden alınan kesitlerde ve *in vivo* olarak kortikostal sinir nöronlarından glutamik asit salınımını engeller. Bu etkilerin kısmen, G-proteinine bağlı bir

sinyal iletim işleminin aktivasyonunun yanı sıra, glutamaterjik sinir terminalleri üzerindeki gerilime bağlı sodyum kanallarının etkisizleştirilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. RİL ayrıca glutamik asidin N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin rekabete dayanmayan blokajı yoluyla bazı sinaptik etkilerini de bloke eder. *In vitro* olarak RİL, kültürlenmiş nöronları anoksik hasardan, glutamik asit alım inhibitörlerinin toksik etkilerinden ve amyotrofik lateral sklerozlu hastaların BOS (Beyin omurilik sıvısı) 'undaki toksik faktörden korumaktadır (Doble, 1996).

Wu ve diğ., (2009) NG108-15 nöronal hücreler ve *in vivo* nöroendokrin hücrelerde, RİL'in geçici akım üzerinde tercihli olarak $INa_{(P)}$ 'yi ve Weiss ve diğ. (2010) ise sıçan miyositlerinde RİL'in $INa_{(P)}$ 'yi TTX'ten daha etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Sisplatin dirençli hücrelerin (CR), yüksek ROS (Reaktif oksijen türleri) seviyelerine sahip olduğu ve metabolik yeniden programlamaya maruz kaldıklarını keşfedilmiştir. RİL tedavisi, çoklu mekanizmalar ile ROS'u daha da arttırmıştır. Bulunan kilit mekanizma, RİL'in LDHA (laktat dehidrojenaz-A) ve NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotit) seviyelerini baskılamasıdır. Riluzol ayrıca sistin / glutamat pompasını bloke eder. Bu iki mekanizma ROS seviyelerini yükseltmek için birlikte çalışır ve CR hücrelerinde hücre ölümüne yol açar. Akciğer kanserli hastalarda RİL'in sisplatin direncine karşı bir antitümör ajan olarak kullanılmasının mümkün olabileceği ve araştırılması gerektiği vurgulanmıştır (Wangpaichitr ve diğ., 2017).

İnsan metastatik meme kanserinde neonatal $Na_v1.5$ ($nNa_v1.5$) ekspresyonunun klinik potansiyeli de dahil olmak üzere araştırılmıştır. $INa_{(P)}$ blokerleri olan RNL ve RİL ile 24 saatlik tedavi; hipoksi altında hücrelerin, lateral hareketliliğini, transvers migrasyonu ve matrigel invazyonunu azaltmıştır. Hücre canlılığı ve proliferasyonunu etkilemeyen konsantrasyonlarda, RNL ve RİL'in metastatik hücre davranışlarını baskılanmasındaki etkileri genellikle normoksiye oranla hipoksi altında daha fazla olmuştur. Ayrıca RNL ve RİL, VGSC- $\beta 1$ mRNA ekspresyonunu da arttırmıştır (Mokhtar, 2011)

Metastatik hücre davranışlarının hipoksiye duyarlı olacağı ve ısrarlı akım için seçici olanlar dahil olmak üzere VGSC blokerleri tarafından inhibe edilebileceği ve VGSC aktivitesinin hücre içi Ca^{+2} sinyalini kontrol edeceği hipotezlerini test etmek için de deneyler yapılmıştır. Yüksek metastatik Mat-LyLu ve zayıf metastatik AT-2 sıçan prostat kanseri hücreleri ve benzer insan

prostat kanseri hücre soyları (PC-3M ve LnCaP, sırasıyla) kullanılmıştır. Mat-LyLu hücreleri üzerinde yapılan deneyler, hipoksinin prostat kanserinde ifade edilen baskın VGSC a-alt birimi olan $Na_v1.7$ 'nin mRNA ekspresyonunu arttırdığını; bununla birlikte, hem plazma zarı hem de hücre içi VGSC protein seviyelerini düşürdüğünü tespit etmiştir. Hücresel proliferasyonda, matrigel invazyonunda veya lateral motilitede bir değişiklik olmamış, bunun yanında transvers migrasyon önemli ölçüde artmıştır. VGSC blokerleri RNL, RİL, lidokain ve prokain 24. saatte $Na_v1.7$ mRNA'yı ve toplam VGSC protein seviyelerini düşürmüştür ve hem normokside hem de hipoksideki Matrigel invazyonunu bastırmıştır. PC-3M hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} (“ Ca^{+2} salınımları”) kendiliğinden, geçici yükselme göstermiştir (Rizaner, 2010).

Sodyum kanal blokeri olan RİL, dört insan prostat kanseri hücre hattının (PC3, DU145, LNCaP ve MDA-PCA-2B) *in vitro* proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. VGSC-bloke edicilerden, flunarizine ($IC_{50} = 2 \mu g / ml$) ve RİL ($IC_{50} = 10-30 \mu g / ml$) dört hücre hattının hepsinde doza bağlı büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Bu araştırmayla VGSC'lerin prostat kanseri tedavisinde hedef olarak kullanabileceği ortaya konulmuştur (Abdul ve Hoosein, 2002).

Parihar ve diğ. (2003), PC-3 ve LNCaP hücrelerinin çoğalmasında konsantrasyona bağlı ($EC_{50} = 2 \mu M$) artışlarla uyarıldığını bulmuştur. Ancak bu etkinin, orta iletkenlik Ca^{+2} ile aktive edilmiş K^+ kanalları yoluyla olduğu ileri sürülmüştür. Akamatsu ve diğ. (2009), RİL'in ($10-50 \mu M$) LNCaP ve C4-2 prostat kanseri hücre hatlarında endoplazmik retikulum stres yoluyla DNA sentezinin ve apoptotik hücre ölümünün inhibisyonu indüklediğini göstermiştir.

Uzun ve diğ. (2017), Mat-LyLu hücrelerine RIL uygulaması ile, kontrol ve deney gruplarında ($1, 3$ ve $5 \mu M$) hücre çoğalmasının etkilenmediğini gösterirken, 10 ve $20 \mu M$ gibi daha yüksek RIL konsantrasyonlarında hücre çoğalmasının önemli ölçüde inhibe ettiğini belirtmiştir. Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketinin ise, RİL ($1, 3$ ve $5 \mu M$) ile kontrol gruplarına göre azalttığı gözlenmiştir.

Yaygın olarak TNBC tedavisinde kullanılan bir kemoterapötik ajan olan paklitaksel ile RİL arasındaki potansiyel sinerjizm, TNBC proliferasyonunda, hücre siklusunu durdurmada ve apoptozu düzenlemede araştırılmıştır. Hem TNBC hücre hatlarında hem de TNBC ksenograft modelinde paklitaksel ve RİL'in hücre büyümesi ve apoptoz üzerine güçlü bir sinerjik etkisi gösterilmiştir. Paklitaksel ve RİL'in kombine uygulanması ile TNBC hücrelerinin, büyüme

inhibisyonu, sadece paklitaksel tedavisi alan hücelere kıyasla önemli ölçüde arttırılmıştır. Daha dirençli hücre soylarında (MDA-MB-231, SUM149 ve SUM229) en güçlü sinerjik etki gözlenmiştir (Speyer ve diğ., 2017).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada farklı metastatik karakterlere sahip Dunning model sıçan prostat kanseri hücre soyları yüksek metastatik Mat-LyLu ve düşük metastatik AT-2 ile çalışılmıştır. *In vitro* koşullarda yetiştirilen hücreler için RPMI-1640 medyumunu kullanılmış olup Mat-LyLu ve AT-2 hücreleri %1 FBS (Fetal Bovine Serum) (Bügan ve diğ., 2016) içeren medyum içerisinde %5 CO₂ ve 37 °C 'deki inkübatörde yetiştirilmiştir.

3.2. FARMAKOLOJİK AJANLARIN HAZIRLANMASI

3.2.1. RNL

Antianjinal özellikteki RNL, üretici firma (Sigma) tarafından önerilen şekilde, steril saf suda çözünerek 100 mM'lık stok solüsyonlar elde edilmiştir. Stok solüsyonlar küçük hacimlere bölünerek -21 °C'de saklanmıştır. Kullanımdan önce normal medyumla seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. RİL

Nöroprotektif RİL, üretici firma (Sigma) tarafından önerilen şekilde, DMSO içinde çözünerek 25 mM'lık stok solüsyonlar elde edilmiştir. Stok solüsyonlar küçük hacimlere bölünerek -21 °C'de saklanmıştır. Kullanımdan önce normal medyumla seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2.3. Tetrodotoksin (TTX)

Spesifik VGSC blokeri olan TTX, hücrelerin lateral hareketi üzerindeki bilinen baskılayıcı etkisi sebebiyle motilite deneylerinde pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır (Yıldırım ve diğ., 2012). Toz halindeki 1 mg TTX, steril saf suda çözülerek 1 mM'lık stok solüsyon elde edilmiştir. Stok solüsyonlar küçük hacimlere bölünerek -21 °C'de saklanmıştır. Kullanımdan önce normal medyumla seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3 TOKSİSİTE

Değerlendirilecek olan farmakolojik ajanlardan RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonlarının yüksek dozlarının, sıçan prostat kanseri hücre soylarından Mat-LyLu ve AT-2 hücreleri üzerinde toksik etkisinin bulunup bulunmadığını saptamak üzere, “Tripan mavisi metodu” kullanılarak canlı ölü hücre sayımı yapılmış ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan hücreler ve değerlendirilen parametrelere ait şema.

Parametreler & Hücreler		Kontrol	K-DMSO	TTX	RNL (μ M)		RİL (μ M)		RNL + RİL (μ M)	
					2,5	5	2,5	5	2,5 + 2,5	5 + 5
Toksisite	Mat-LyLu	√	√	--	--	√	--	√	--	√
	AT-2	√	√	--	--	√	--	√	--	√
Hücre Poliferasyonu	Mat-LyLu	√	√	--	√	√	√	√	√	√
	AT-2	√	√	--	√	√	√	√	√	√
Migrasyon	Mat-LyLu	√	√	√	√	√	√	√	√	--

Bu amaçla 35mm’lik petrilere hücreler 3×10^4 olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin ekiminden sonraki 24. saat ve 48. saatte hücreler mikroskopta incelenmiş kontrol grubundaki hücrelere normal medyum, deney gruplarındaki hücrelere ise, sırasıyla 5 μ M RNL, 5 μ M RİL ve 5 μ M RNL+5 μ M RİL konsantrasyonları uygulanmıştır. K-DMSO grubundaki DMSO konsantrasyonu deneylerde kullanılan en yüksek RİL konsantrasyonunun içerdiği DMSO miktarı (%0,2) esas alınarak hesaplanmıştır. Hücrelerin ekiminden 72 saat sonra deney medyumları çıkartılarak, hücreler 0,2 ml tripan mavisi ve 0,8 ml normal medyum ile 10 dakika etüvde bekletilmiştir. Etüvden çıkartıldıktan sonra petrilere içindeki boya içeren medyum atılarak yerine normal medyum konulmuştur. İnvert mikroskopta x40 büyütmele objektifle her petride 40 farklı alandaki canlı ve ölü hücrelerin sayımı yapılmıştır. Deneyler, Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin her ikisi için de, en az üç tekrar olmak üzere gerçekleştirilmiştir.

3.4. HÜCRE PROLİFERASYONU

Hücre sayısı ile absorbands arası ilişkisinin ve doğru denkleminin ortaya konulduğu büyüme eğrisine ilişkin deneyler Mat-LyLu ve AT-2 hücre soyları için ayrı ayrı yapılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 2×10^4 , 4×10^4 , 6×10^4 , 8×10^4 , 10×10^4 hücre ekilerek 24 saat etüvde bekletilmiştir. Bu uygulama işleminden sonra 24. ve 48. saatte ölçüm yapılması için her bir kuyucuktaki medyum atılarak yerine 100 μ l 3 - (4,5-Dimetiltiazol-2yl) – 2,5 – Difenil tetrazolyum bromid (MTT) solüsyonu konulmuştur. 4 saat etüvde, alimünyum folyo içinde ışık görmeyecek şekilde bekletilmiştir. Bekletilme sürecinin sonunda kuyucuklardaki MTT solüsyonu atılarak yerine 200 μ l DMSO ve 25 μ l glisin tamponu eklenmiştir. Mosmann (1983)'ın kolorimetrik MTT spektrofotometre yöntemi kullanılarak mikropleyt okuyucuda her bir kuyucuğun absorbands değeri 570 nm'de saptanmıştır. Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin ikisi için de en az üç kuyucuk kullanılarak en az üç tekrar olmak üzere deneyler gerçekleştirilmiştir.

Farmakolojik ajanlardan RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonlarının toksik olmadığı belirlenen dozlarının Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin proliferasyonları üzerindeki etkisi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu pleytlerin her bir kuyucuğuna 5×10^4 hücre ekilerek 24 saat etüvde bekletilmiştir. Sürecin sonunda kontrol grubuna normal medyum diğer gruplara ise; 2,5 μ M RNL, 5 μ M RNL, 2,5 μ M RİL, 5 μ M RİL ve 2,5 μ M RNL+2,5 μ M RİL, 5 μ M RNL+5 μ M RİL konsantrasyonları olacak şekilde deney medyumları eklenmiştir. Bu uygulama işleminden sonraki işlemler yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grupları 1 kabul edilerek deney grupları ile karşılaştırılmış ve istatistik analizleri yapılmıştır. Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin her ikisi için de en az üç kuyucuk kullanılarak ve en az üç tekrar olmak üzere deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.5. HÜCRE HAREKETİ (MİGRASYON= MOTİLİTE)

Hücrelerin metastaza gidişinde etkin rol alan lateral hücre hareketini saptamak amacıyla deneyler, sadece yüksek metastatik Mat-LyLu hücreleri ile yapılmıştır. Deneylerde kontrol grubunun yanı sıra, VGSC blokeri olan ve pozitif kontrol olarak kullanılan TTX ile deney grupları; 2,5 μ M RNL, 5 μ M RNL, 2,5 μ M RİL, 5 μ M RİL ve 2,5 μ M RNL+ 2,5 μ M RİL şeklinde oluşturulmuştur. Her grup için 35 mm'lik petriyelerin alt tarafına birbirine paralel 3 adet kırmızı ve bu çizgilere dik 15 adet siyah çizgi çizilmiştir. Daha sonra her bir petriye 16×10^4 Mat-LyLu hücresi ekilmiştir. Hücrelerin ekiminden 24 saat sonra steril pipet ucuyla kırmızı

çizgiler üzerinde yara açılmıştır. Açılan yara genişlikleri invert mikroskopta ölçülerek 0. Saat (W_0) olarak kaydedilmiştir. Ölçümler sonrasında kontrol gruplarına normal medyum, TTX grubuna TTX içeren medyum ile deney gruplarına yukarıda belirtilen ve hücre proliferasyonunu etkilemeyen dozlarda RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonlarını içeren deney medyumları eklenmiştir. Her bir yara bölgesi (W_t) 24. ve 48. saatlerde invert mikroskopta tekrar ölçülmüş, medyumları değiştirilmiştir. Elde edilen değerler aşağıdaki formülde yerine konularak, motilite indeksi hesaplanmıştır.

$$MI \text{ (Motilite İndeksi)} = 1 - (W_t / W_0) \quad (3.1)$$

3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

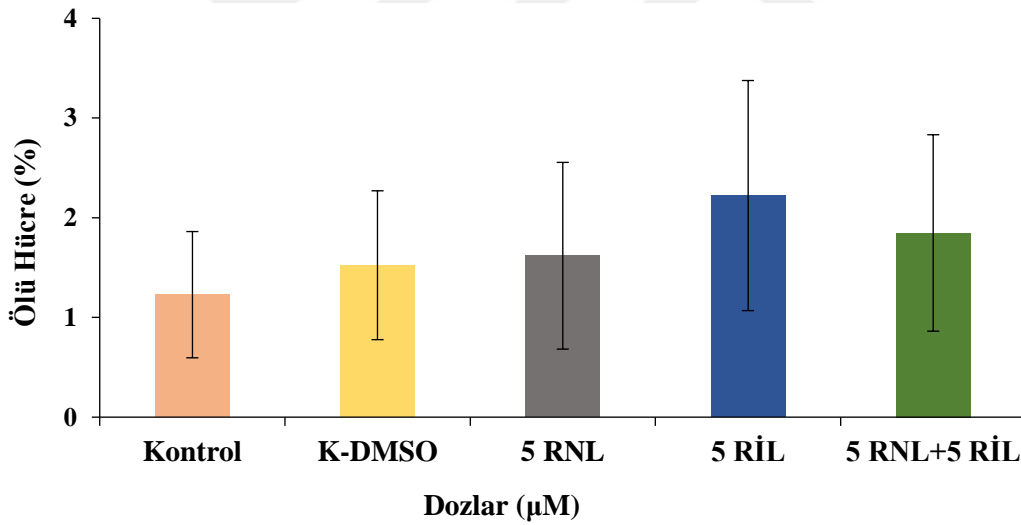
Kontrol ve deney gruplarından elde edilen veriler, grupların aritmetik ortalaması ve her bir ortalama değer için standart hatası ($\pm SE$) şeklinde verilmiştir. Kontrol, RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı student t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Zar 1999). Çalışmada anlamlı fark $P < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada farklı konsantrasyonlardaki RNL ve RİL'in ayrı ayrı ve kombinasyonları olmak üzere Mat-LyLu ve AT-2 hücre soyları üzerinde toksik etkisinin bulunup bulunmadığı incelenmiştir. Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerine uygulanan RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonunun hücre proliferasyonuna etkisi hem 24.saat hem de 48.saat olmak üzere MTT yöntemi ile araştırılmış ve yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin metastaza gidişinde rol oynayan lateral hücre hareketi/motilite üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

4.1. TOKSİSİTE

Farmakolojik ajanlar olan RNL ve RİL'in ayrı ayrı ve kombinasyonları şeklinde olmak üzere yüksek metastatik Mat-LyLu ve düşük metastatik AT-2 hücre soyları üzerinde toksik etkisinin bulunup bulunmadığı tripan mavisi yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.1).

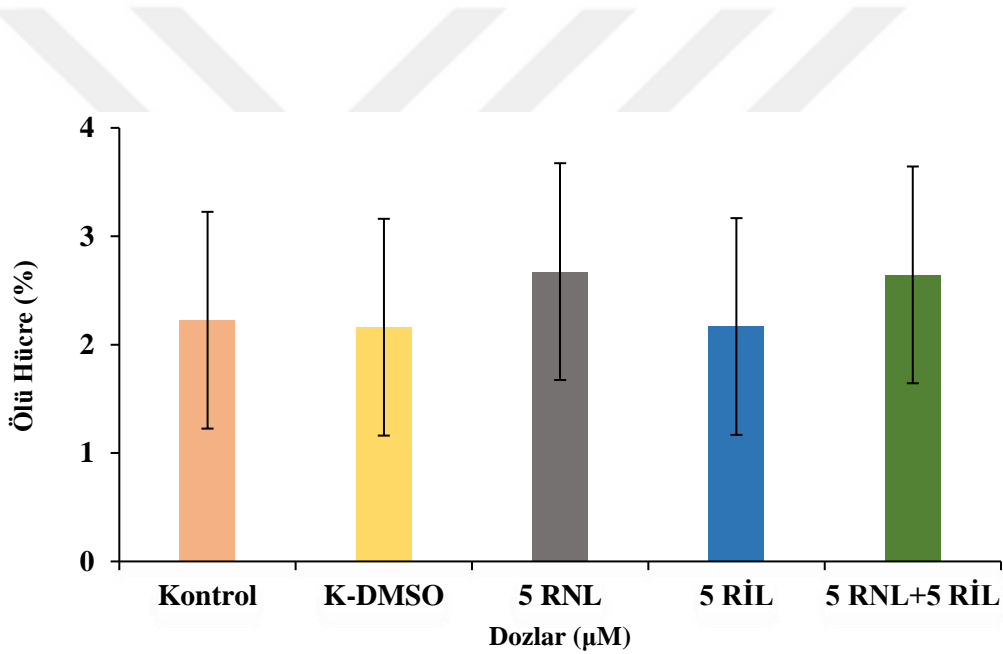


Şekil 4.1: Mat-LyLu hücrelerine RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonu uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdesi (\pm SE).

Mat-LyLu hücreleri ile yapılan deneylerde saptanan ölü hücre yüzdelere göre, kontrol grubu ile en yüksek RİL için kullanılan DMSO dozuna (%0,2) göre hazırlanan K-DMSO grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Kullanılan en yüksek farmakolojik ajan dozları olan 5 µM RNL ve 5 µM RİL dozlarında toksik bir etki meydana gelmediği belirlenmiştir. Kombinasyon grubu olan 5 µM RNL +5 µM RİL grubunun ölü hücre yüzdeleri de diğer

gruplarla benzerlik göstermektedir. Mat-LyLu hücre soyu üzerinde RNL ve RİL'in ayrı ayrı ve kombinasyon şeklinde uygulanmasının toksik bir etki göstermediği ($P>0,05$) saptanmıştır.

AT-2 hücreleri ile yapılan deneylerde de kontrol grubu ile en yüksek RİL konsantrasyonunda kullanılan DMSO miktarını (%0,2) içeren K-DMSO grubu arasında ölü hücre yüzdeleri paralellik göstermektedir (Şekil 4.2). 5 μM RNL ve 5 μM RİL uygulanması sonucunda ölü hücre yüzdeleri kontrol grubu ile benzerdir. 5 μM RNL +5 μM RİL'in kombine olarak uygulanması sonucu, AT-2 hücrelerinin ölü hücre yüzdesi de kontrol gruplarına benzer olup istatistik bakımdan, ilaçların tek başına veya kombinasyon halinde toksik bir etkisinin bulunmadığı ($P>0,05$) saptanmıştır.



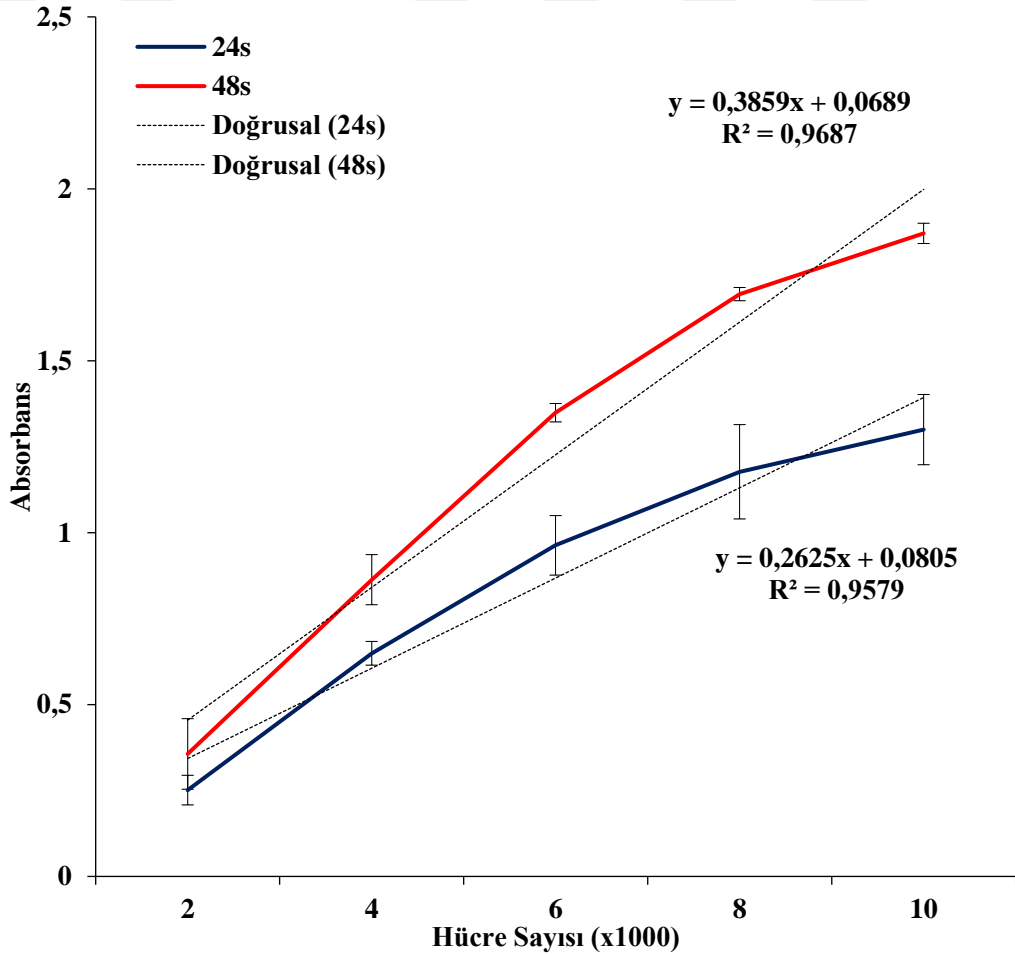
Şekil 4.2: AT-2 hücrelerine RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonu uygulanması ile elde edilen ölü hücre yüzdesi ($\pm\text{SE}$).

4.2. HÜCRE ÇOĞALMASI

Farmakolojik ajanların etkilerine geçilmeden önce, Dunning model prostat kanseri hücre soylarının büyüme eğrileri çizilerek korelasyonları incelenmiş ve RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonlarının, yüksek metastatik Mat-LyLu ile düşük metastatik AT-2 hücrelerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

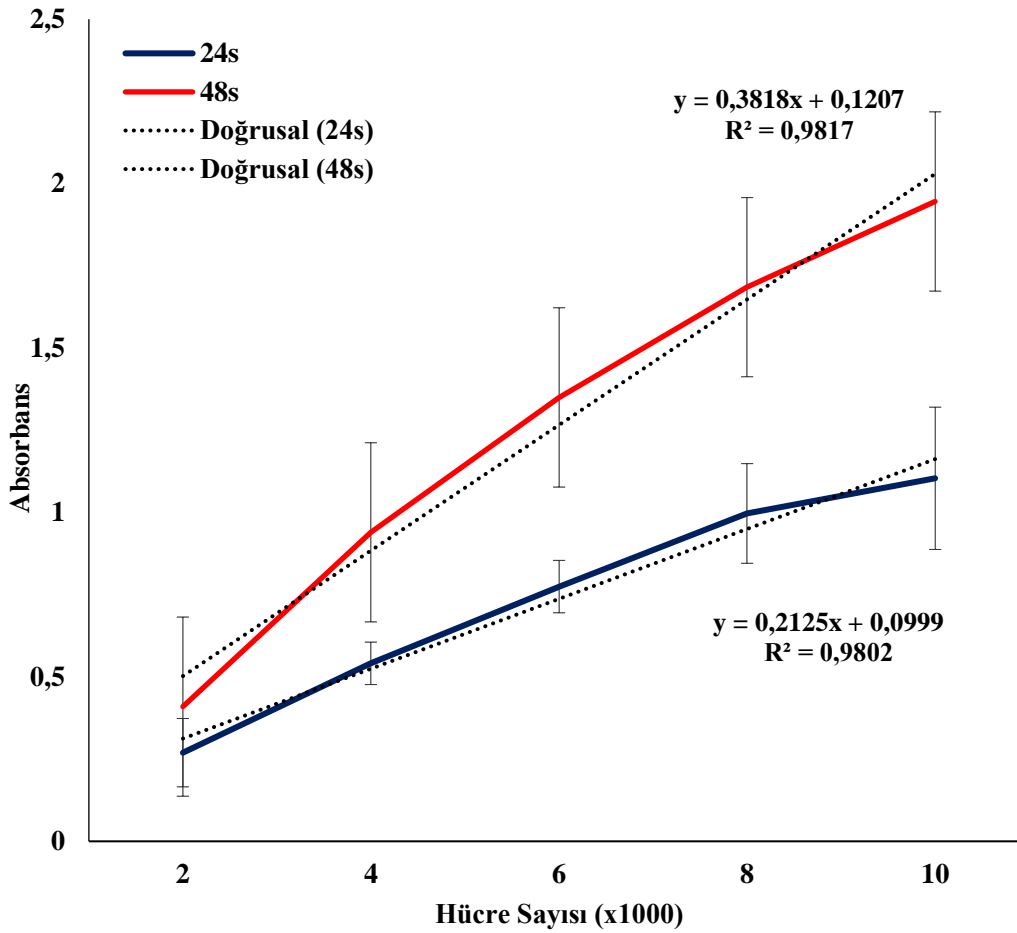
4.2.1. Hücrelerin Büyümesi ve Korelasyonu

Farmakolojik ajanların etkilerinin araştırılmasından önce, farklı sayılardaki Mat-LyLu hücreleri ile absorbans arasındaki ilişki, 24. saatte ve 48. saatte saptanmış, büyüme eğrisi çizilerek doğru denklemi elde edilmiştir (Şekil 4.3). Şekil 4.3’de verilen her iki büyüme eğrisi incelendiğinde, 24. ve 48. saatlerde, Mat-LyLu hücre sayısının artışına paralel olarak absorbansın da arttığı görülmektedir. Dolayısıyla hücreler araştırılan sürelerde eksponansiyel bir büyüme göstermekte ve yaklaşık 10000 hücre seviyelerinde plato fazına girmeye başlamaktadır. Hücre sayısı ile doğru denklemi arasındaki yüksek korelasyon R^2 değerlerinden de izlenmektedir.



Şekil 4.3: Mat-LyLu hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbans arasındaki ilişki ve doğru denklemi ile korelasyonu.

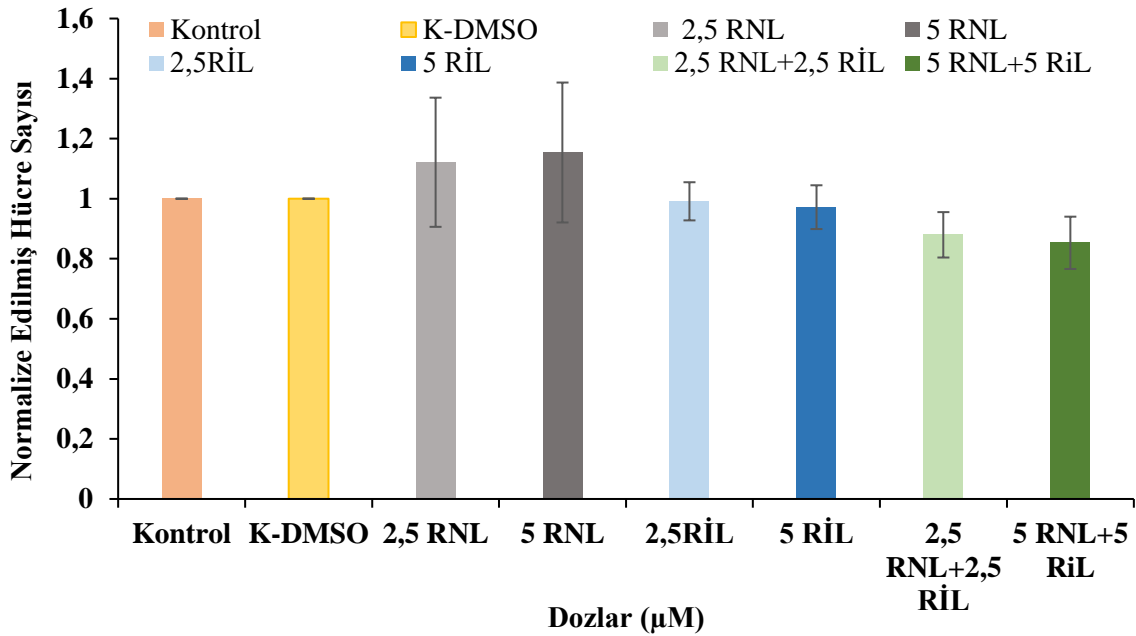
Düşük metastatik AT-2 hücrelerinin, 24. ve 48. saatlerdeki hücre sayısı ile absorbands arasındaki ilişkisi dayanarak ait büyüme eğrileri elde edilmiştir Şekil 4.4 verilmiştir. Her iki büyüme eğrisi incelendiğinde, 24. ve 48. saatlerde, absorbandsın hücre sayısı ile doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmektedir. Mat-LyLu hücrelerine benzer şekilde, AT-2 hücreleri de, söz konusu sürelerde önce eksponansiyel bir büyüme göstermekte ve yaklaşık 10000 hücre sayısı civarında, plato fazına girmeye başladığı izlenmektedir. Hücre sayısı ile doğru denklemi arasında yüksek korelasyon bulunduğu R^2 değerlerinden belirlenmektedir.



Şekil 4.4: AT-2 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerde hücre sayısı ile absorbands arasındaki ilişki ve doğru denklemi ile korelasyonu.

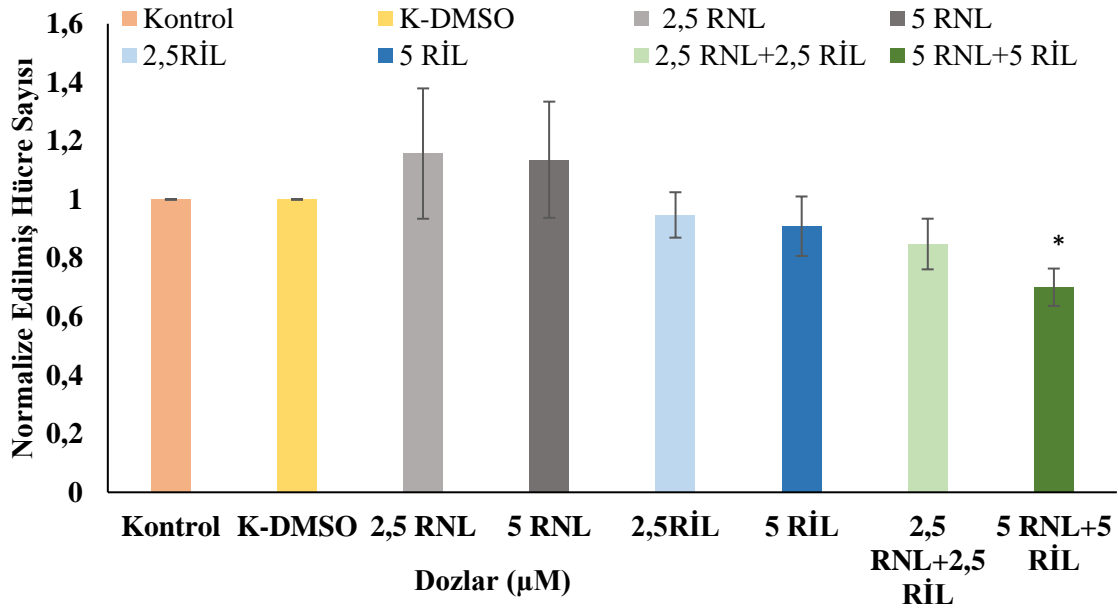
4.2.2. Hücre Proliferasyonu

Dunning model sıçan prostat kanseri yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 μ M RNL, 5 μ M RNL, 2,5 μ M RİL, 5 μ M RİL ve bu ilaçların 2,5 μ M RNL+2,5 μ M RİL, 5 μ M RNL+5 μ M RİL kombinasyonlarının uygulanması sonucunda 24. saatte elde edilen hücre sayıları Şekil 4.5’de verilmiştir. Farmakolojik ajanlardan RİL, DMSO’da çözündüğü için, kontrol grubunun yanı sıra ikinci kontrol grubu olarak kullanılan K-DMSO grubundaki Mat-LyLu hücre sayılarının kontrol grubu ile benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.5). DMSO nun, Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonları üzerinde bir etki göstermediği belirlendiğinden, deney gruplarından elde edilen sonuçlar, kontrol grubu sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.5’de görüldüğü gibi, Mat-LyLu hücrelerine 24 saat süreyle iki farklı konsantrasyonda uygulanan RNL ve RİL, hücrelerin proliferasyonları üzerinde anlamlı bir etki ($P>0,05$) oluşturmamıştır. RNL ve RİL kombinasyonunun iki farklı konsantrasyonda 2,5+2,5 μ M ve 5+5 μ M RİL olarak uygulanması sonucunda 24. saatte Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonlarında doz artışına paralel bir azalma görülmekle beraber, bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($P>0,05$).



Şekil 4.5: Mat-LyLu hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL’in kombine olarak 24 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları (\pm SE).

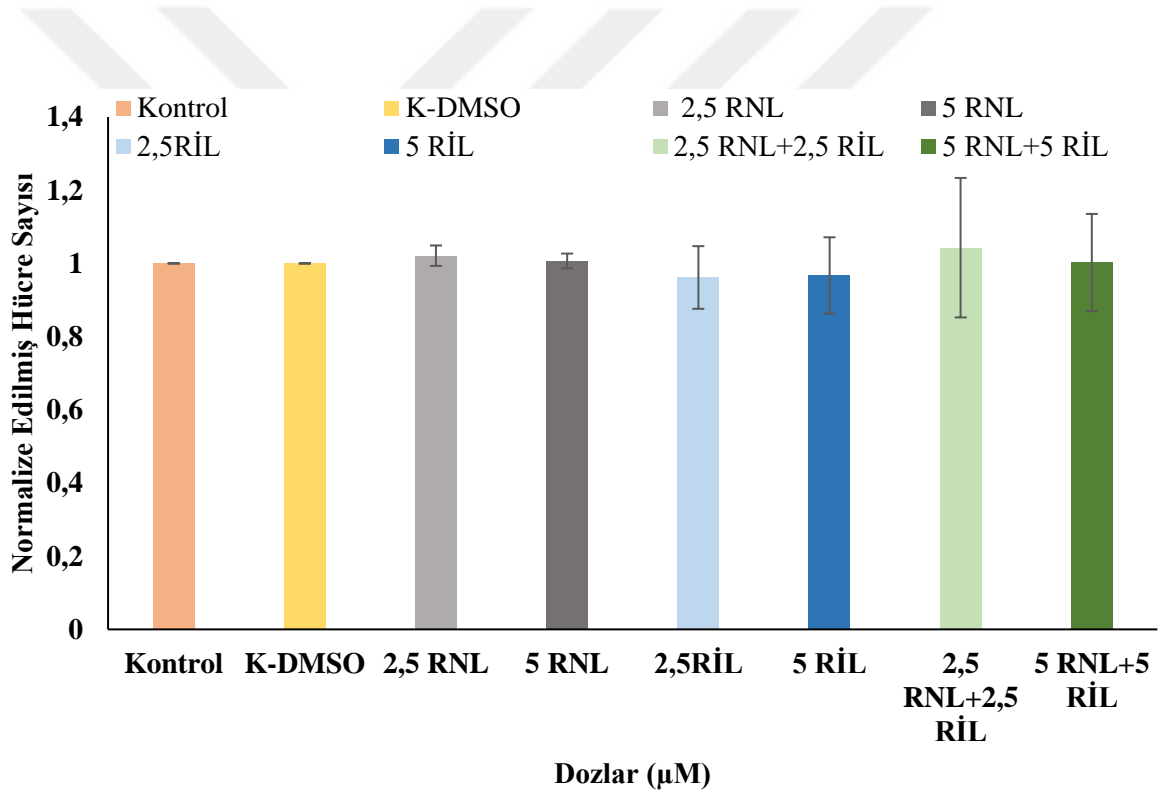
Yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerine 48 saat süreyle 2,5 μ M RNL, 5 μ M RNL, 2,5 μ M RİL, 5 μ M RİL ve bu ilaçların 2,5+2,5 μ M, 5+5 μ M olarak uygulanan RNL+RİL kombinasyonları, hücrelerine uygulanması sonucunda elde edilen hücre sayıları Şekil 4.6'da verilmiştir. RİL için çözücü olarak kullanılan DMSO, 48. saatte de hücre proliferasyonu üzerinde bir değişim meydana getirmemiş ve deney gruplarına ait veriler, kontrol grubu sonuçları ile kıyaslanmıştır. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, Mat-LyLu hücrelerine 48 saat süreyle iki farklı konsantrasyonda uygulanan RNL, hücrelerin proliferasyonları üzerinde anlamlı bir etki ($P>0,05$) meydana getirmemiştir. 2,5 μ M ve 5 μ M konsantrasyonda tek başına uygulanan RİL, Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonları üzerinde bir azalmaya yol açmakla beraber, bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı olmadığı ($P>0,05$) belirlenmiştir. RNL ve RİL'in hücreler kombine olarak (2,5+2,5 ve 5+5 μ M) uygulandığında 48. saatte Mat-LyLu hücre proliferasyonunda doz artışına bağlı olarak bir azalma görüldüğü saptanmıştır. İstatistik değerlendirmeler 5+5 μ M olarak uygulanan RNL+RİL'in Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe ettiğini ($P<0,05$) göstermiştir.



Şekil 4.6: Mat-LyLu hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL'in kombine olarak 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları (\pm SE). (* $P<0,05$).

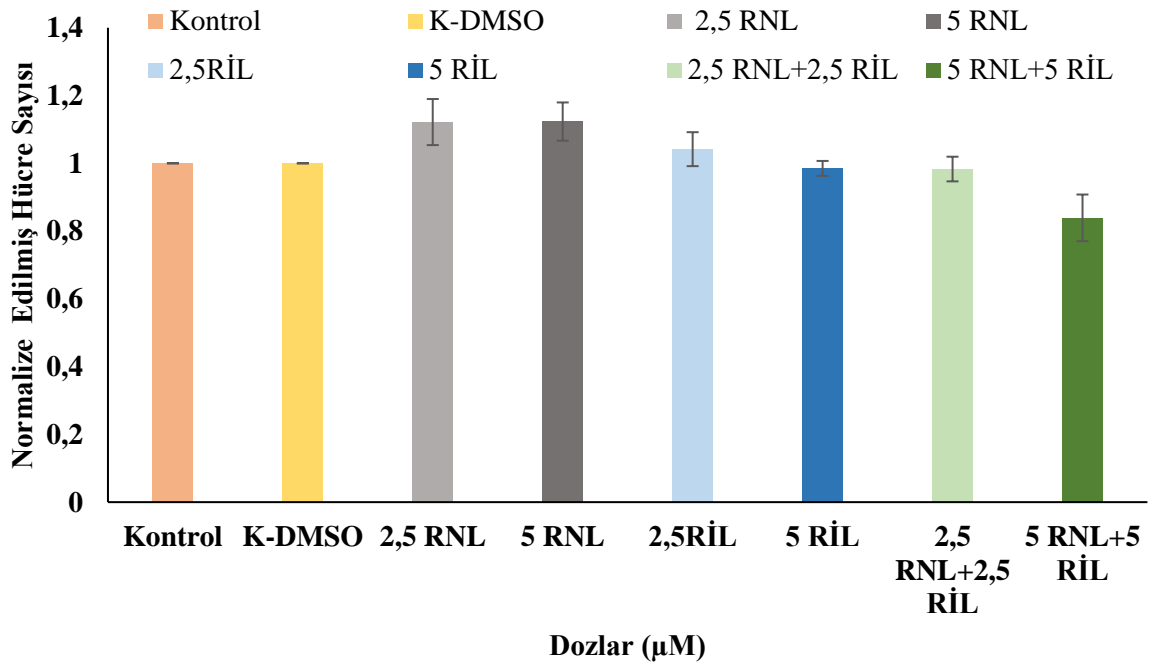
Düşük metastatik karakterli sıçan prostat kanseri hücre soyu, AT-2 hücrelerine 2,5 μ M RNL, 5 μ M RNL, 2,5 μ M RİL, 5 μ M RİL ile bu ilaçların 2,5+2,5 μ M, 5+5 μ M kombinasyonlarının 24. saat süre ile uygulanması sonucunda saptanan hücre sayıları Şekil 4.7’de verilmiştir. Mat-LyLu hücrelerinde olduğu gibi, burda da kontrol ve K-DMSO gruplarından elde edilen değerler arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiş ve istatistik değerlendirilmelerde, kontrol grubu sonuçları kullanılmıştır. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi, AT-2 hücrelerine 24 saat süreyle iki farklı konsantrasyonda uygulanan RNL ve RİL hücrelerin proliferasyonları üzerinde anlamlı bir etki ($P>0,05$) meydana getirmemiştir.

RNL ve RİL kombine olarak kullanıldığında (2,5 +2,5 μ M ve 5 +5 μ M) ise 24. saatte hücrelerin proliferasyonları üzerinde istatistik bakımdan bir fark bulunmadığını ($P>0,05$) göstermiştir.



Şekil 4.7: AT-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL’in kombine olarak 24 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları (\pm SE).

AT-2 hücrelerine 48 saat süreyle 2,5 μ M RNL, 5 μ M RNL, 2,5 μ M RİL, 5 μ M RİL ve bu ilaçların 2,5 μ M RNL+2,5 μ M RİL, 5 μ M RNL+5 μ M RİL kombinasyonlarının uygulanması sonucunda, hücrelerin proliferasyonları üzerinde anlamlı bir etki ($P>0,05$) oluşturmamıştır (Şekil 4.8). Farmakolojik ajanların kombine olarak (2,5+2,5 μ M, 5+5 μ M) uygulanması ile 48. saatte AT-2 hücrelerinin proliferasyonunun doza bağlı olarak azalma gösterdiği saptanmakla beraber, bu azalmanın istatistik bakımdan anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$).



Şekil 4.8: AT-2 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda RNL, RİL ve RNL+RİL'in kombine olarak 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen normalize edilmiş hücre sayıları (\pm SE).

4.3. MİGRASYON (MOTİLİTE)

RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonunun sıçan prostat kanseri yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketi yani motilitesi üzerindeki etkilerini belirlemek üzere, hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermediği saptanan konsantrasyonlardaki ajanlar Mat-LyLu hücre soyuna 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar 3.1 numaralı formülde yerine konularak hücrelerin motilite indeksi hesaplanmıştır.

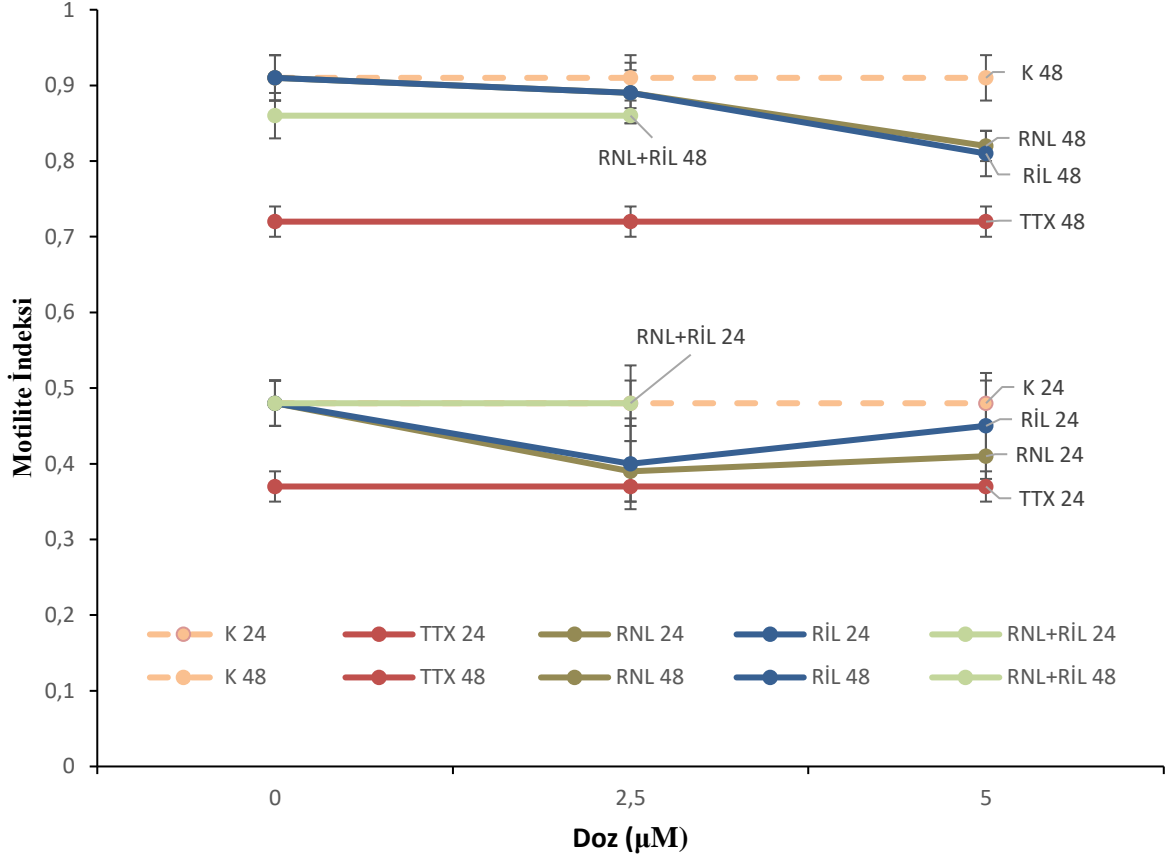
Yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin lateral motilitesi üzerine RNL, RİL ve RNL+RİL'in kombine olarak uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiş ve Şekil 4.9'da grafiği çizilmiştir.

Tablo 4.1: Mat-LyLu hücrelerine TTX, RNL, RİL ve RNL+RİL uygulanması ile elde edilen motilite indeksi ve % değişim değerleri(\pm SE). *:($P<0,05$)

	Motilite İndeksi (Mol)		Motilite İndeksindeki Değişim (%)	
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
Kontrol	0,48 \pm 0,03	0,91 \pm 0,03	–	–
K-DMSO	0,47 \pm 0,02	0,89 \pm 0,03	2,08 (↓)	2,2 (↓)
TTX (1 μM)	0,37 \pm 0,02	0,72 \pm 0,02	22,92 (↓)*	20,88 (↓)*
RNL (2,5 μM)	0,39 \pm 0,04	0,89 \pm 0,03	18,75 (↓)*	2,2 (↓)*
RİL (2,5 μM)	0,4 \pm 0,06	0,89 \pm 0,04	16,67 (↓)	2,2 (↓)*
RNL (5 μM)	0,41 \pm 0,04	0,82 \pm 0,02	14,58 (↓)*	9,89 (↓)*
RİL (5 μM)	0,45 \pm 0,07	0,81 \pm 0,03	6,25 (↓)*	10,99 (↓)*
RNL+RİL (2,5+2,5 μM)	0,48 \pm 0,05	0,86 \pm 0,01	0 (↓)	5,49 (↓)*

Kontrol grubunda 24. saatte 0,48 \pm 0,03 olarak belirlenen motilite indeksi 48. saatte 0,91 \pm 0,03 olarak saptanmıştır. K-DMSO grubu verileri, kontrol grubu sonuçları ile her iki saatte de benzerdir ve aralarında istatistik bakımından bir farklılık bulunmamaktadır. Dolayısıyla, motilite indeksine ait deney grubu verileri kontrol grubu verileri ile karşılaştırılmıştır. VGSC blokeri olan ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan TTX uygulanması ile hücrelerin motilite indeksi, 24. saatte 0,37 \pm 0,02, ile %22,92 baskılanırken deney grubu olan 2,5 μ M ve 5 μ M RNL uygulanan hücrelerde sırasıyla 0,39 \pm 0,04 ve 0,41 \pm 0,04 olmuştur. RNL'nin tek başına hücrelerin motilite indeksinde meydana getirdiği etki sırasıyla %18,75 ile %14,58'dir. Hem TTX hem de uygulanan bu iki RNL dozunun, kontrol grubundan istatistik bakımından anlamlı bir fark ($P>0,05$) gösterdiği saptanmıştır. 2,5 μ M ve 5 μ M RİL uygulanan hücrelerde motilite indeksleri 24. saatte 0,4 \pm 0,06 ve 0,45 \pm 0,07 olarak bulunmuştur. 2,5 μ M RİL kontrol grubuna oranla 24.saatte dikkati çekecek bir oranda azalma göstermekle beraber, bu fark anlam taşımazken ($P>0,05$), 5 μ M RİL, hücreler üzerinde %6,25 oranında anlamlı bir ($P<0,05$) inhibisyon meydana getirmiştir. RNL ve RİL 2,5+ 2,5 μ M olarak kombine şekilde

uygulandığında Mat-LyLu hücrelerinin 24. saatteki motilite indeksinin ($0,48 \pm 0,05$) kontrol grubu ile paralel olduğu görülmektedir. (Şekil 4.9)



Şekil 4.9: RNL, RİL ve RNL+RİL'in, Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketi üzerine etkisi.

Tablo 4.1 ve Şekil 4.9'dan RNL RİL ve RNL+RİL kombinasyonunun 48 saat süre ile Mat-LyLu hücrelerine uygulanması sonucunda kontrol ile K-DMSO gruplarının motilite indeks değerlerinin benzer olduğu ve aralarında bir farkın bulunmadığı saptanmıştır. Pozitif kontrol olan TTX hücrelerin motilitesini %20,88 baskılarken 2,5 µM RNL ve RİL %2,2 ile aynı oranda anlamlı ($P < 0,05$) bir etki meydana getirmiştir. RNL ve RİL'in tek başlarına 5 µM olarak Mat-LyLu hücrelerine uygulanması sonucunda 48. saatte hücrelerin motilite indeksleri sırasıyla %9,89 ve %10,99 azalmıştır ($P < 0,05$). RNL+RİL'in 2,5+2,5 µM olarak uygulanması sonucu hücrelerin motilite indeksinde anlamlı bir azalma ($P < 0,05$) meydana gelmiştir (Tablo 4.1 ve Şekil 4.9).

Sonuçlar değerlendirildiğinde; Mat-LyLu hücrelerine RNL, RİL ve RNL+RİL kombinasyonu uygulanması sonucu, 24 saatte 2,5 μ M RİL hariç diğer ajanların, 48 saatte ise ajanların tek başına veya kombine olarak motilite indeksi üzerinde farklı oranlarda anlamlı bir inhibe edici etki meydana getirdiği belirlenmekle beraber bu etkilerin VGSC blokeri olan TTX'in oranına ulaşamadığı görülmüştür. RNL ve RİL'in tek başına uygulanması yerine RNL+RİL kombinasyonu şeklinde uygulanması sonucu, Mat-LyLu hücrelerinin motilite indeksi üzerinde az da olsa, daha fazla bir inhibisyon meydana gelmiş ve ilaçların kombine kullanımının sinerjistik bir etki oluşturabileceği belirlenmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

VGSC'lerin metastaz üzerindeki kuvvetlendirici etkisinin bilinmesi ve bu kanalların bloklanması ile metastaz sürecinin baskılanabileceği hipotezinden yola çıkılarak bu çalışmada, iki kanal blokeri ilaç olan RNL ve RİL'in ayrı ayrı ve RNL+RİL kombinasyonu şeklinde Dunning model prostat kanseri hücrelerinin hem proliferasyonu hem de metastaza gidişinde rol oynayan lateral hareketi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada tek başına ve kombine etkileri araştırılan farmakolojik ajanlardan RNL, klinikte anjina pectoris tedavisinde kullanılırken, RİL, ALS hastalığındaki standart tedavi protokolünü oluşturmaktadır. Bu ilaçların etki mekanizmaları incelendiğinde VGSC'leri bloke ettikleri ve bu etkilerini normoksik ortama oranla, hipoksik ortamda daha kuvvetli bir şekilde gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca VGSC aktivitesi ile ortaya çıkan membran akımlarından $INa(T)$ 'dan çok, ısrarlı akım olarak da adlandırılan $INa(P)$ inhibisyonunda etkili olduğu görülmektedir (Belardinelli ve diğ., 2006; Song ve diğ., 2006; Saint, 2008; Weiss ve diğ.,2010; Djamgoz ve Onkal, 2013).

Etkisi değerlendirilen RNL ve RİL'in ayrı ayrı ve kombine olarak Dunning model prostat kanseri yüksek metastatik Mat-LyLu ve düşük metastatik AT-2 hücre soyları üzerinde $5 \mu M$ ve $5+5 \mu M$ dozlarının toksik bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.

Yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin hücre proliferasyonuna etkisi değerlendirilen $2,5 \mu M$ ve $5 \mu M$ RNL, $2,5 \mu M$ ve $5 \mu M$ RİL ile $2,5+2,5 \mu M$ ve $5+5 \mu M$ RNL+RİL kombinasyonlarından sadece $5+5 \mu M$ RNL+RİL kombinasyonunun hücrelerin proliferasyonları üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiği saptanmıştır. Ancak incelenen bu RNL ve RİL konsantrasyonlarının düşük metastatik AT-2 hücrelerinin proliferasyonları üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı görülmüştür.

Literatürde Mat-LyLu ve AT-2 hücrelerinin hücre proliferasyonuna RNL ve RİL'in etkilerinin ayrı ayrı araştırıldığı birkaç çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir *in vitro* çalışmada, RNL'in toksik olmayan $10 \mu M$ ve $25 \mu M$ konsantrasyonları Mat-LyLu hücrelerinin hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir (Altun ve diğ., 2014).

Benzer şekilde; Mat-LyLu hücrelerine 1, 3 ve 5 μM dozlarında RİL uygulanması sonucu 48 saatte elde edilen veriler, hücre çoğalmasının bu dozlardaki RİL'den etkilenmediğini göstermiştir. Bununla birlikte, 10 ve 20 μM gibi daha yüksek RİL konsantrasyonları ile hücre çoğalmasının önemli ölçüde azaldığı da belirtilmiştir (Uzun ve diğ., 2017).

Abdul ve Hosein, (2002), VGSC blokerlerinden flunarizine ve RİL'in, dört insan prostat kanseri hücrelerinin (PC3, DU145, LNCaP ve MDA-PCA-2B) *in vitro* olarak hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. VGSC blokerlerinden olan flunarizine ($\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{g} / \text{ml}$) ve RİL ($\text{IC}_{50} = 10\text{-}30 \mu\text{g} / \text{ml}$), dört hücre hattının hepsinde de doza bağlı olarak büyüme inhibisyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Ancak burada kullanılan RİL dozlarının oldukça yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

RİL'in, prostat kanseri hücre hatlarından LNCaP ve C4-2 hücrelerinin proliferasyonu, apoptoz ve apoptotik yol üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Akamatsu ve diğ., (2009), DNA sentezi seviyelerinin, 48 saat boyunca 10 veya 50 μM RİL ile muamele edilen LNCaP ve C4-2 hücre soylarında doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığını, 10 μM RİL ile hücre canlılığının, LNCaP'de %63 ve C4-2'de %66 olduğunu saptamıştır. PC-3 ve LNCaP hücrelerinin çoğalmasında konsantrasyona bağlı ($\text{EC}_{50} = 2 \mu\text{M}$) artışlarla uyarıldığı bulunmuş ve bu etkinin, orta iletkenlik Ca^{+2} ile aktive edilmiş K^{+} kanalları yoluyla olduğu ileri sürülmüştür (Parihar ve diğ., 2003). Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücreleriyle elde ettiğimiz bu sonuçlar, yukarıdaki hem sıçan hem de, insan prostat kanseri hücreleri kullanılarak elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Prostat kanserinin yanı sıra, benzer özellikleri bulunan meme kanseri soylarından yüksek metastatik TNBC hücrelerinin proliferasyonunun RİL ile inhibe olduğu ve GRM1'in TNBC hücre büyümesini ve ilerlemesini düzenlemede rol oynadığı gösterilmiştir. TNBC ve ER + hücrelerde RİL'in antitümör özellikleri hücre proliferasyonu yönünden araştırılmış ve RİL aktivitesi ile GRM1 seviyeleri karşılaştırılmıştır. RİL'in, hem TNBC hem de, ER + hücrelerde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Speyer ve diğ., 2016).

RİL ile tedavi edilen melanositlerde GRM1'in artan ifadesinin, melanomun başlangıcında kritik bir rol oynadığı tespit edilmiş ve GRM1 ekspresse eden insan melanom hücreleri ile insan melanom hücre ksenograflarının 18 gün boyunca, hücre dışı glutamat seviyelerinin azalmasına yol açtığı gibi, hücre proliferasyonunun baskılanmasını sağladığı da saptanmıştır. Ayrıca

kontrol hayvanlarına kıyasla, tümör büyümesinin %50 oranında inhibe edilmesine yol açmıştır (Namkoong ve diğ., 2007).

Prostat kanserinde RNL ve RİL'in kombine olarak kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamakla beraber, RİL ile paklitaksel hem ayrı ayrı hem de kombine şekilde TNBC hücrelerine uygulanmış ve hücre proliferasyonu, hücre siklusu ve apoptoza olan etkileri araştırılmıştır. Speyer ve diğ., (2017), hem TNBC hücrelerinde hem de *in vivo* TNBC ksenograft modelinde hücre büyümesi ve apoptoz üzerinde RİL+paklitaksel birlikteliğinin sinerjistik bir etki gösterdiğini ifade etmiştir. Sadece paklitaksel tedavisine nazaran kombine tedavinin hücre proliferasyonunu inhibe etmede daha etkili olduğu ileri sürülmüştür.

Prostat kanseri hücre modellerinden LNCaP ve 22Rv1 üzerinde enzalutamide ile RNL, etomoxir ve perheksilin kombinasyonlarının değerlendirildiği *in vivo* bir çalışmada enzalutamide dirençli hücrelerde ve fare TRAMPC1 hücrelerinde dahil olmak üzere kombinasyonların güçlü bir inhibe edici etkisi gözlemlenmiştir. Nude farelerde 22Rv1 ksenograftları oluşturulmuş ve 3 hafta boyunca, enzalutamide, RNL veya kombinasyonu (enzalütamide+RNL) ile tedavi edilmişlerdir. Tek başına RNL tedavisi ile enzalütamide uygulamasına benzer bir tümör büyümesi görülmesine karşın enzalütamide+RNL kombinasyonu ile sistemik bir tedavi sonucu tümör büyümesinin azaldığı tespit edilmiştir (Flaig ve diğ., 2017).

Hücrelerin metastaza gidişinde rol alan lateral hareket/motiliteyi değerlendirmek amacıyla Mat-LyLu hücreleriyle yapılan migrasyon deneylerinde pozitif kontrol sodyum kanal blokeri TTX dahil olmak üzere, hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen 2,5 μM ve 5 μM RNL, 2,5 μM ve 5 μM RİL ile 2,5+ 2,5 μM RNL+RİL kombinasyonları uygulanmış ve yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketinin inhibe olduğu saptanmıştır. İlaçların tek başına veya kombinasyon şeklinde uygulanmasının motilite indeksi üzerinde farklı oranlarda anlamlı bir inhibe edici etki meydana getirdiği belirlenmekle beraber bu etkilerin; kuvvetli VGSC blokeri olan TTX'in oranına ulaşamadığı görülmüştür.

Literatürde farklı hücre soyları üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada yüksek metastatik Mat-LyLu ve zayıf metastatik AT-2 sıçan prostat kanseri hücreleri ile benzer olarak insan prostat kanseri hücre soyları (sırasıyla PC-3M ve LnCaP) kullanılmıştır. VGSC blokerleri olan RNL ve RİL ile ayrı ayrı muamele edilmeleri VGSC'lerden $\text{Na}_v1.7$ mRNA'yı ve toplam VGSC

protein seviyelerini düşürmüştür ayrıca, hem normokside hem de hipoksideki matrigel invazyonu baskılamıştır. Bu çalışma ile VGSC blokerlerinin klinik olarak antimetastatik ajanlar olarak hizmet edebileceği ileri sürülmüştür (Rizaner, 2010).

Altun ve diğ., (2014), Mat-LyLu hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen 1 μM ve 5 μM konsantrasyondaki RNL'in migrasyon indeksini inhibe ederek, hücrelerin lateral hareketini baskıladığını göstermiştir.

Mat-LyLu hücrelerine 1, 3 ve 5 μM dozlarında RİL uygulaması ile hücrelerin lateral hareketliliğinin inhibe olduğu gösterilmiştir. Hücrelerin metastaza gidişinde rol oynayan lateral hareketliliği ile ilgili bu sonuçlar metastaz üzerinde RİL'in etkili olabileceğini ortaya koymuştur (Uzun ve diğ., 2017). Çalışmamızda da Mat-LyLu hücrelerine benzer dozlarda RİL uygulaması gerçekleştirilerek lateral hareket inhibe edilmiş dolayısıyla bu çalışmalarla paralellik göstermiştir.

Prostat kanseri ile benzer özellikler taşıyan meme kanseri hücrelerinden, MDA-MB-231'in RNL (1- 100 μM) tedavisinden sonra, hücrelerin lateral hareketini doza bağlı olarak ~%52'ye kadar azalttığı tespit edilmiştir. 10 μM RNL, lateral motilite, dikey hareketlilik ve matrigel invazyonu azaltmak için yeterli olmuştur. Bu sonuçlar, RNL ile MDA-MB-231 metastatik kanser hücrelerinin hareketinin VGSC'lerden $n\text{Na}_v1.5$ aktivite ve ifadesinin down regülasyonu yoluyla baskıladığını göstermiştir. Ayrıca, RNL'nin hücre proliferasyonu üzerinde etkisinin bulunmaması, metastatik kanser hücre hareketinin RNL tarafından baskılanmasının temel olarak VGSC yoluyla olduğunu ortaya koymuştur (Mokhtar, 2011). Aynı çalışmada 1 μM 'den daha yüksek konsantrasyondaki RİL, hücrelerin migrasyon ve invazyonunu, sırasıyla ~ %20 ve ~ %66 oranında inhibe etmiştir.

RNL'in *in vitro* ortamda hücre hareketi üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada %2 oksijen içeren akut hipoksik ortamda yetiştirilen MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinin artan invazyonunu hem TTX (10 μM) hem de, RNL (300 μM)'nin tamamen baskıladığı ve bu baskılamanın hücre proliferasyonunu etkilemeden Na^+ kanallarını bloke ederek gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Djamgoz ve Onkal, 2013).

Yüksek konsantrasyondaki (25 μM) RİL'in, melanom hücrelerinin göçünü, invazyonunu ve koloni oluşumunu önemli derecede inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak, kullanılan terapötik olmayan doz, hücre çoğalmasını da inhibe etmiştir (Le ve diğ., 2010).

In vivo bir çalışmada; yüksek metastatik Mat-LyLu hücreleri inoküle edilerek oluşturulan Dunning model prostat kanserli sıçanların RNL (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) ile tedavi edilmesi sonucunda; primer tümör, akciğer metastaz sayısı ve boyutu üzerindeki etkisi ile sağ kalımı araştırılmıştır (Karagöz, 2015). Kullanılan tüm dozlarda RNL'nin primer tümör üzerinde anlamlı bir etki meydana getirmediği saptanırken 5 μ M RNL'nin metastaz sayısını %46,56 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. 2,5 μ M ve 5 μ M RNL'nin 0,1-1 mm çapa sahip metastaz sayısını yaklaşık %55 oranında inhibe ederken, 10 μ M RNL'nin stimülasyona neden olduğu ve 5 μ M RNL'nin, prostat kanserli sıçanların sağ kalımını arttırdığı ortaya konmuştur.

Yapılan bir başka *in vivo* çalışmada Mat-LyLu hücrelerinin Kopenhagen sıçanların deri altına inoküle edilmesini takiben oluşan primer tümörlerin ve metastazların gelişimi üzerinde RNL'in etkisi araştırılmıştır. RNL (2,5 ve 5 μ M), primer tümörögenezi etkilemezken, akciğer metastaz sayısını %63'e kadar azalttığı saptanmıştır (Bugan ve diğ., 2019).

Benzer özelliklerdeki meme kanserinde bulunan VGSC, Nav1.5 kanalları üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak RNL'in etkisi araştırılmıştır (Driffort ve diğ.,2014). RNL'in (50 μ M) meme kanseri hücrelerinde Nav1.5 akımını inhibe ettiği ve *in vitro* olarak hücrelerin invazyonunu azalttığı gösterilmiştir. *In vivo* olarak ise, RNL (50 mg / kg / gün) enjeksiyonu, Nav1.5 ekspresse eden insan meme kanserinin oluşturduğu akciğer kolonizasyonunu yani metastazı önemli ölçüde azaltmıştır.

Bu çalışmalardan farklı olarak *in vivo* bir çalışmada, RNL'in (30 mg / kg, günde iki kez), spontan ince bağırsak tümörigenez modeli olan APC (Min⁺) farelerde tümörlerin sayısını arttırdığı, tümörlerin daha invaziv hale geldiği belirlenmiş ve bunun da yağ asidi oksidasyonundan meydana geldiği ileri sürülmüştür (Suckow ve diğ., 2004).

Evre III ve IV melanomalı hastalarda 0 faz RİL uygulaması yapılmıştır. Hastalara 14 gün boyunca günde 200 mg oral RİL tedavisinin, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağı sinyalinin baskılanması ve tümörlerin invazyonu ile sonuçlandığı, hastaların %34'ünde rapor edilmiştir. Ayrıca fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) / AKT yolu ile sinyalinin baskılandığı ve tedavi sonrası bazı tümör örneklerinde apoptotik hücre sayısında bir artış bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, oral olarak RİL'in, tek başına veya diğer bileşiklerle kombinasyon halinde, melanomalı hastalar için etkili bir terapi olabileceği varsayımına neden olmuştur (Yip ve diğ., 2009).

TNBC ve ER + hücrelerinde RİL'in antitümör özellikleri invazyon yönünden de araştırılmış ve RİL aktivitesi ile GRM1 seviyeleri karşılaştırılmıştır. RİL, hem TNBC hem de ER + hücrelerinde invazyonu inhibe etmiştir (Speyer ve diğ., 2016).

MDA-MB-231 hücrelerinin kullanıldığı, tümörlerde var olan hipoksik hücreleri daha iyi temsil etmesi bakımından hipoksik koşullar altında gerçekleştirilen bir araştırmada propranolol (2.5 ve 25 μ M) ve RNL (5 μ M) ile bunların kombinasyonunun lateral motiliteyi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, propranolol (25 μ M) ve RNL (5 μ M) ile bunların kombinasyonunun invazyonu da inhibe ettiği gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2019). Hücrelerin lateral hareketi üzerine elde ettiğimiz sonuçlar, literatürdekilerle uyum içerisindedir.

Sonuç olarak, sodyum kanal blokeri olan ve etkinliğini hipoksik ortamda daha fazla gösteren RNL ile RİL'in toksik olmayan dozlarının Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin, kombine kullanım (RNL+RİL) şeklinde ilk kez *in vitro* olarak araştırıldığı bu çalışmada; 5+5 μ M RNL+RİL kombinasyonu yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir. Proliferasyonu etkilemeyen konsantrasyonlardaki 2,5 ve 5 μ M RNL, 2,5 ve 5 μ M RİL ile 2,5+2,5 μ M RNL+RİL yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin lateral hareketi üzerinde inhibisyon meydana getirmiştir. Ancak normoksik koşullarda yürütülen bu çalışmada lateral hareket üzerinde görülen inhibisyon VGSC blokeri olan TTX'in seviyesine ulaşamamıştır.

Antimetastatik tedavi için umut verici olan bu *in vitro* sonuçlar doğrultusunda sinerjistik etki gösteren, RNL+RİL tedavisinin farklı doz ve kombinasyonlarının; *in vitro* olarak özellikle hipoksik ortamda ve *in vivo* olarak ise, deneysel modellerde detaylı olarak araştırılmasına gerek duyulduğunu belirtmek gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdul, M., Hoosein, N., 2001, Inhibition by anticonvulsants of prostate-specific antigen and interleukin-6 secretion by human prostate cancer cells, *Anticancer research*, 21(3B), 2045-2048.
- Abdul, M., Hoosein, N., 2002, Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity, *Anticancer research*, 22(3), 1727-1730.
- Aggarwal, S., Cudkowicz, M., 2008, ALS drug development: reflections from the past and a way forward, *Neurotherapeutics*, 5(4), 516-527.
- Ahmad, I., Sansom, O. J., Leung, H. Y., 2008, Advances in mouse models of prostate cancer, *Expert reviews in molecular medicine*, 10.
- Ajrourd-Driss, S., Saeed, M., Khan, H., Siddique, N., Hung, W. Y., Sufit, R., Lukas, T. J., 2007, Riluzole metabolism and CYP1A1/2 polymorphisms in patients with ALS, *Amyotrophic lateral sclerosis*, 8(5), 305-309.
- Akamatsu, K., Shibata, M. A., Ito, Y., Sohma, Y., Azuma, H., Otsuki, Y., 2009, Riluzole induces apoptotic cell death in human prostate cancer cells via endoplasmic reticulum stress, *Anticancer research*, 29(6), 2195-2204.
- Altun, S., Djamgoz, M.B.A., 2008, *Na⁺ kanalını bloke eden ajanların anormal karakterli siçan prostat hücreleri üzerindeki etkisinin in vivo olarak araştırılması*, TUBITAK Proje Raporu, Proje No:104T031.
- Altun, S., Kaya, H., Gümüşhan, H., 2014, *İn vivo siçan prostat kanseri hücreleri ve voltaj kapılı sodyum kanal ekspresyonu: Metastatik potansiyelin değerlendirilmesinde yeni stratejiler ve moleküler yaklaşımlar*, TUBITAK Proje Raporu, Proje No:110T890.
- Andavan G. S.B and Lemmens-Gruber R, 2011, Voltage-Gated Sodium Channels: Mutations, Channelopathies and Targets, *Current medicinal chemistry*, 18, 377 – 397.
- Antzelevitch, C., Belardinelli, L., Zygmunt, A. C., Burashnikov, A., Di Diego J. M., Fish, J. M., Cordeiro, J. M. Thomas, G., 2004, Electrophysiological Effects of Ranolazine, a Novel Antianginal Agent With Antiarrhythmic Properties, *Circulation*, 110, 904-910.
- Armstrong, B., Doll, R., 1975, Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices, *International journal of cancer*, 15(4), 617-631.
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O’Riordan, A., Furey, A., 2014, Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection, *Toxins (Basel)*, 6 (2), 693-755.

- Banon, D., Filion, K. B., Budlovsky, T., Franck, C., Eisenberg, M. J., 2014, The usefulness of ranolazine for the treatment of refractory chronic stable angina pectoris as determined from a systematic review of randomized controlled trials, *The American journal of cardiology*, 113(6), 1075-1082.
- Barneoud, P., Mazadier, M., Miquet, J. M., Parmentier, S., Dubedat, P., Doble, A., Boireau, A., 1996, Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat, *Neuroscience*, 74(4), 971-983.
- Belardinelli, L., Shryock, J. C., & Fraser, H., 2006, Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine, *Heart*, 92(suppl 4), iv6-iv14.
- Bellingham, M. C., 2011, A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS Neuroscience & therapeutics*, 17(1), 4-31.
- Beltran-Parrazal, L., Charles, A., 2003, Riluzole inhibits spontaneous Ca²⁺ signaling in neuroendocrine cells by activation of K⁺ channels and inhibition of Na⁺ channels, *British journal of pharmacology*, 140(5), 881-888.
- Beneski DA, Catterall WA., 1980, Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*, 77(1), 639-43.
- Bennet, E.S., Smith, B.A., Harper, J.M., 2004, Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells, *Pflügers archiv : European journal of physiology*, 447, 908-914.
- Berger JC., Vander-Griend D., Stadler WM., Rinker-Schaeffer C., 2004, Metastasis suppressor genes: signal transduction, cross-talk and the potential for modulating the behavior of metastatic cells, *Anticancer drugs* 15, 559-568.
- Berquin, I.M., Min, Y., Wu, R., Wu, J., Perry, D., Clgne, J. M., Thomas, M. J., Thornburg, T., Kulik, G., Smith, A., Edwards, I. J., D'agostgno, R., Zhang, H., Wu, H., Kang, J. X., Chen, Y. Q., 2007, Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids, *The journal of clinical investigation*, 117(7), 1866-75.
- Bladou, F., Vessella, R. L., Buhler, K. R., Ellis, W. J., True, L. D., Lange, P. H., 1996, Cell proliferation and apoptosis during prostatic tumor xenograft involution and regrowth after castration, *International journal of cancer*, 67(6), 785-790.
- Boxler, S., Djonov, V., Kessler, T.M., Hlushchuk, R., Bachmann, L.M., Held, U., Markwalder, R., Thalmann, G.N., 2010, Matrix metalloproteinases and angiogenic factors: predictors of survival after radical prostatectomy for clinically organ-confined prostate cancer?, *The American journal of pathology*, 177 (5), 2216-24.

- Brackenbury, W. J., Djamgoz, M. B., 2006, Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line, *The Journal of physiology*, 573(2), 343-356.
- Brackenbury, W. J., Isom, L. L., 2008, Voltage-gated Na⁺ channels: Potential for β subunits as therapeutic targets, *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(9), 1191-1203.
- Brackenbury, W. J., Isom, L. L., 2011, Na⁺ channel β subunits: overachievers of the ion channel family, *Frontiers in pharmacology*, 2, 53.
- Brackenbury, W. J., 2012, Voltage-gated sodium channels and metastatic disease, *Channels*, 6(5), 352-361.
- Brackenbury, W. J., Davis, T. H., Chen, C., Slat, E. A., Detrow, M. J., Dickendesher, T. L., Isom, L. L., 2008, Voltage-gated Na⁺ channel β 1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo, *Journal of neuroscience*, 28(12), 3246-3256.
- Brackenbury, W. J., Djamgoz, M. B., Isom, L. L., 2008, An emerging role for voltage-gated Na⁺ channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers, *The neuroscientist*, 14(6), 571-583.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A., 2018, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bubendorf, L., Schopfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J., 2000, Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients, *Human pathology*, 5, 578-583.
- Bugan, I., Karagoz, Z., Altun, S., Djamgoz, M. B., 2016, Gabapentin, an Analgesic Used Against Cancer-Associated Neuropathic Pain: Effects on Prostate Cancer Progression in an In Vivo Rat Model. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 118(3), 200-207.
- Bugan, I., Kucuk, S., Karagoz, Z., Fraser, S. P., Kaya, H., Dodson, A., Djamgoz, M. B., 2019, Anti-metastatic effect of ranolazine in an in vivo rat model of prostate cancer, and expression of voltage-gated sodium channel protein in human prostate, *Prostate cancer and prostatic diseases*.
- Burashinov, A., Di Diego, J. M., Zygmunt, A. C., Belardinelli, L. Antzelevitch, C., 2007, Atrium-selective sodium channel block as a strategy for suppression of atrial fibrillation: differences in sodium channel inactivation between atria and ventricles and the role of ranolazine, *Circulation*, 116, 1449-1457.
- Busserolles, J., Alloui, A., Lazdunski, M., Eschalier, A., 2013, Use of riluzole to treat or prevent the adverse effects of antineoplastic agents, *US Patent*, 64775, A1.

- Cameron, I. L., Smith, N. K. R., Pool, T. B., Sparks, R. L., 1980, Intracellular concentration of sodium and other elements as related to mitogenesis and oncogenesis in vivo, *Cancer research*, 40(5), 1493-1500.
- Catterall, W. A., 2012, Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology, *The Journal of physiology*, 590(11), 2577-2589.
- Catterall, W.A., 2000, From ionic currents to molecular review mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels, *Neuron*, 26, 13–25.
- Catterall, W.A., Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F., Konoki, K., Scheuer, T., 2007, Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins, *Toxicon*, 49, 124–141.
- Cestele, S., Catterall, W.A., 2000, Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels, *Biochimie*, 82, (9-10), 883-892.
- Chaitman, B. R., 2006, Ranolazine for the treatment of chronic angina and potential use in other cardiovascular conditions, *Circulation*, 113(20), 2462-2472.
- Cheung, E., Wadhera, P., Dorff, T., Pinski, J., 2008, Diet and prostate cancer risk reduction, *Expert review of anticancer therapy*, 8(1), 43-50.
- Chiang, A.C., Massagué, J., 2008, Molecular basis of metastasis, *The New england journal of medicine*, 25;359 (26), 2814-23.
- Chioni, A. M., Brackenbury, W. J., Calhoun, J. D., Isom, L. L., Djamgoz, M. B., 2009, A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: Voltage-gated Na⁺ channel β 1 subunit, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(5), 1216-1227.
- Chioni, A. M., Shao, D., Grose, R., Djamgoz, M. B., 2010, Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(2), 346-358.
- Chu, L. W., Ritchey, J., Devesa, S. S., Quraishi, S. M., Zhang, H., Hsing, A. W., 2011, Prostate cancer incidence rates in Africa, *Prostate cancer*, 2011.
- D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer., *Cell*, 100(1), 57-70.
- Demark-Wahnefried, W., 2007, Dietary intervention in the management of prostate cancer, *Current opinion in urology*, 17(3), 168.
- Diss JK, Fraser SP., Djamgoz MB., 2004, Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects, *European biophysics journal: EBJ*, 33, 180-193.

- Diss, J. K. J., Stewart, D., Pani, F., Foster, C. S., Walker, M. M., Patel, A., Djamgoz, M. B. A., 2005, A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo, *Prostate cancer and prostatic diseases*, 8(3), 266.
- Diss, J. K., Archer, S. N., Hirano, J., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B., 2001, Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines, *The prostate*, 48(3), 165-178.
- Djamgoz, M. B., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S. P., Korohoda, W., 2001, Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na⁺ channel activity, *Journal of cell science*, 114(14), 2697-2705.
- Djamgoz, M.B.A., Onkal, R., 2013, Persistent current blockers of voltage-gated sodium channels: a clinical opportunity for controlling metastatic disease, *Recent patents anticancer drug discovery*, 1;8(1), 66-84.
- Doble, A., 1996, The pharmacology and mechanism of action of riluzole, *Neurology*, 47, 233-241.
- Donovan, B. T., Bakshi, T., Galbraith, S. E., Nixon, C. J., Payne, L. A., Martens, S. F., 2011, Utility of frozen cell lines in medium throughput electrophysiology screening of hERG and NaV1. 5 blockade, *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 64(3), 269-276.
- Draisma, G., Etzioni, R., Tsodikov, A., Mariotto, A., Wever, E., Gulati, R., De Koning, H., 2009, Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context, *Journal of the national cancer institute*, 101(6), 374-383.
- Driffort, V., Gillet, L., Bon, E., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Joulin, V., Bougnoux, P., 2014, Ranolazine inhibits Na V 1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization, *Molecular cancer*, 13(1), 264.
- Edwards, B. K., Brown, M. L., Wingo, P. A., Howe, H. L., Ward, E., Ries, L. A., Friedman, C., 2005, Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2002, featuring population-based trends in cancer treatment, *Journal of the national cancer institute*, 97(19), 1407-1427.
- Eeles, R. A., Kote-Jarai, Z., Giles, G. G., Al Olama, A. A., Guy, M., Jugurnauth, S. K., Field, H. I., 2008, Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility, *Nature genetics*, 40(3), 316.
- Etzioni, R., Penson, D. F., Legler, J. M., Di Tommaso, D., Boer, R., Gann, P. H., Feuer, E. J., 2002, Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from US prostate cancer incidence trends, *Journal of the national cancer institute*, 94(13), 981-990.

- Fairhurst, C., Watt, I., Martin, F., Bland, M., Brackenbury, W. J., 2014, Exposure to sodium channel-inhibiting drugs and cancer survival: protocol for a cohort study using the QResearch primary care database, *BMJ open*, 4(11), e006604.
- Fairhurst, C., Watt, I., Martin, F., Bland, M., Brackenbury, W. J., 2015, Sodium channel-inhibiting drugs and survival of breast, colon and prostate cancer: a population-based study, *Scientific reports*, 5, 16758.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Bray, F., 2019, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods, *International journal of cancer*, 144(8), 1941-1953.
- Ferris-i-Tortajada, J., Garcia-i-Castell, J., Berbel-Tornero, O., Ortega-Garcia, J. A., 2011, Constitutional risk factors in prostate cancer, *Actas urológicas españolas (English Edition)*, 35(5), 282-288.
- Filardi, P.P., 2011, Ranolazine a new drug with a class action, *Eleven international symposium heart failure & co.*
- Fink-Puches, R., Helige, C., Kerl, H., Smolle, J., Tritthart, H. A., 1993, Inhibition of melanoma cell directional migration in vitro via different cellular targets, *Experimental dermatology*, 2(1), 17-24.
- Fizazi, K., Navone, N. M., 2005, Preclinical models of prostate cancer, *Bulletin du cancer*, 92(2), 129-141.
- Flaig, T. W., Salzmann-Sullivan, M., Su, L. J., Zhang, Z., Joshi, M., Gijón, M. A., La Rosa, F. G., 2017, Lipid catabolism inhibition sensitizes prostate cancer cells to antiandrogen blockade, *Oncotarget*, 8(34), 56051.
- Fozzard, H.A., Lee, P.J., Lipkind, G.M., 2005, Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels, *Current pharmaceutical design*, 11, 2671-2686.
- Fraser, H., Belardinelli, L., Wang, L., Light, P. E., McVeigh, J. J., Clanachan, A. S., 2006, Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 41(6), 1031-1038.
- Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Brackenbury, W. J., 2005, Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis, *Clinical cancer research*, 11(15), 5381-5389.
- Fraser, S. P., Diss, J. K., Lloyd, L. J., Pani, F., Chioni, A. M., George, A. J., Djamgoz, M. B., 2004, T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity, *FEBS letters*, 569(1-3), 191-194.

- Fraser, S. P., Peters, A., Fleming-Jones, S., Mukhey, D., Djamgoz, M. B. A., 2014, Resveratrol: Inhibitory effects on metastatic cell behaviors and voltage-gated Na⁺ channel activity in rat prostate cancer in vitro, *Nutrition and cancer*, 66(6), 1047-1058.
- Fraser, S. P., Salvador, V., Manning, E. A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Djamgoz, M. B. A., 2003, Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility, *Journal of cellular physiology*, 195(3), 479-487.
- Fraser, S.P., Grimes, J.A., Djamgoz, M.B., 2000, Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines, *Prostate*, 44, (1), 61-76.
- Fredj, S., Sampson, K. J., Liu, H., Kass, R. S., 2006, Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action, *British journal of pharmacology*, 148, 16-24.
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., Wang, Z., 2010, Expression of voltage-gated sodium channel α subunit in human ovarian cancer, *Oncology reports*, 23(5), 1293-1299.
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Noda, M., 2000, Nomenclature of voltage-gated sodium channels, *Neuron*, 28(2), 365-368.
- Goldin, A.L., 2003, Mechanisms of sodium channel inactivation, *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 284–290.
- Grant, W. B., Peiris, A. N., 2012, Differences in vitamin D status may account for unexplained disparities in cancer survival rates between African and white Americans, *Dermato-endocrinology*, 4(2), 85-94.
- Greenwald, P., 2004, Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future, *The journal of nutrition*, 134(12), 3507-3512.
- Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., Djamgoz, M.B., 1995, Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro, *FEBS Letters*, 369, (2-3), 290-294.
- Haddad, A. Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S. J., Fleshner, N. E., Klotz, L. H., 2006, Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines, *Prostate cancer and prostatic diseases*, 9, 68-76.
- Hanahan D., Weinberg RA., 2000, The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-74.

Hille B., 1971, The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve, *The journal of general physiology*, 58(6), 599-619.

Hille B., 1972, The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve, *The journal of general physiology*, 59(6), 637-58.

Hille B., 1975, Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model, *The journal of general physiology*, 66(5), 535-60.

Hille B., 1977, Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction, *The journal of general physiology*, 69(4), 497-515.

Hille, B., 2001, Ion channels of excitable membranes, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Hodgkin AL, Huxley AF., 1952a, A quantitative description of memce current and its application to conduction and excitation in nerve, *The journal of physiology*, 117(4), 500-44.

Hodgkin AL, Huxley AF., 1952b, Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo, *The journal of physiology*, 116(4), 449-72.

Hodgkin AL, Huxley AF., 1952c, The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo, *The journal of physiology*, 116(4), 473-96.

Hodgkin AL, Huxley AF., 1952d, The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo, *The journal of physiology*, 116(4), 497-506.

Hofmann-Wellenhof, R., Fink-Puches, R., Smolle, J., Helige, C., Tritthart, H. A., Kerl, H., 1995, Correlation of melanoma cell motility and invasion in vitro, *Melanoma research*, 5(5), 311-319.

House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, Stuart JM., Lee NH., 2010, Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion, *Cancer research*, 70, 6957-6967.

Howell, M. A., 1974, Factor analysis of international cancer mortality data and per capita food consumption, *British journal of cancer*, 29(4), 328.

<https://www.cusabio.com/c-20803.html>, [Ziyaret Tarihi: 07.07.2019].

<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/epidemiology-prostate-cancer-europe>, [Ziyaret Tarihi: 07.07.2019].

<http://gco.iarc.fr>, [Ziyaret Tarihi: 07.07.2019].

https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, [Ziyaret Tarihi: 07.07.2019].

<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>, [Ziyaret Tarihi: 07.07.2019].

Huang, H. Y., Jiang, Z. F., Li, Q. X., Liu, J. Y., Wang, T., Zhang, R., Zhao, J., Xu, Y. M., Bao, W., Zhang, Y., Jia, L. T., Yang, A. G., 2010, Inhibition of human breast cancer cell invasion by siRNA against urokinase-type plasminogen activator, *Cancer investigation*, 28(7), 689-97.

Huggins, C., Hodges, C. V., 2002, Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate, *The journal of urology*, 167 (2), 948-951.

Itsiopoulos, C., Hodge, A., Kaimakamis, M., 2009, Can the Mediterranean diet prevent prostate cancer?, *Molecular nutrition & food research*, 53(2), 227-39.

Jansson, K. H., Lynch, J. E., Lepori-Bui, N., Czymbek, K. J., Duncan, R. L., Sikes, R. A., 2012, Overexpression of the VSSC-associated CAM, beta-2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior, *The prostate*, 72(10), 1080-1092.

Jemal, A., Fedewa, S. A., Ma, J., Siegel, R., Lin, C. C., Brawley, O., Ward, E. M., 2015, Prostate cancer incidence and PSA testing patterns in relation to USPSTF screening recommendations, *Jama*, 314(19), 2054-2061.

Johnson, J., 2002, Tetrodotoxin, <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/ttx/ttx.htm>, [Ziyaret Tarihi: 07.07.2019].

Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., Jones, L. W., 1979, Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), *Investigative urology*, 17(1), 16-23.

Kandel, E.R., 2013, Principles of neural science, fifth edition, McGrawHill, New York.

Karagöz, Z., 2015, *Ranolazine'in dunning modeli sıçan prostat kanseri üzerindeki rolü: primer tümör ve metastazlar*, Yüksek lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Karp, G., 2009, Cell and Molecular Biology-Concepts and Experiments, John Wiley & Sons, USA.

Kaufmann, S. G., Westenbroek, R. E., Zechner, C., Maass, A. H., Bischoff, S., Muck, J., Maier, S. K., 2010, Functional protein expression of multiple sodium channel α - and β -subunit isoforms in neonatal cardiomyocytes, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(1), 261-269.

Khajah, M. A., Mathew, P. M., Luqmani, Y. A., 2018, Na⁺/K⁺ ATPase activity promotes invasion of endocrine resistant breast cancer cells, *PloS one*, 13(3), e0193779.

Kheirandish, P., Chingwundoh, F., 2011, Ethnic differences in prostate cancer, *British journal of cancer*, 105(4), 481.

- Kiskin, N. I., Chizhnikov, I. V., Tsyndrenko, A. Y., Krishtal, O. A., Tegtmeier, F., 1993, R56865 and flunarizine as Na⁺-channel blockers in isolated Purkinje neurons of rat cerebellum, *Neuroscience*, 54(3), 575-585.
- Knox, C., Law, V., Jewison, T., Liu, P., Ly, S., Frolkis, A., Djoumbou, Y., 2010, DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs, *Nucleic acids research*, 39(1), 1035-1041.
- Koltai, T., 2015, Voltage-gated sodium channel as a target for metastatic risk reduction with re-purposed drugs, *F1000Research*, 4.
- Kostrouchova, M., Kostrouch, Z., Kostrouchova, M., 2007, Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways, *Folia biologica-Praha*, 53(2), 37.
- Kruger, L. C., Isom, L. L., 2016, Voltage-gated Na⁺ channels: not just for conduction, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(6), 029264.
- Kyprianou, N., English, H. F., Isaacs, J. T., 1990, Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation, *Cancer research*, 50(12), 3748-3753.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P., Powe, L., Durrleman, S., Meininger, V., 1996, A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS, *Neurology*, 47, 242-250.
- Laniado, M.E., Lalani, E.N., Fraser, S.P., Grimes, J.A., Bhangal, G., Djamgoz, M.B.A., 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), 1213-1221.
- Le, M. N., Chan, J. L. K., Rosenberg, S. A., Nabatian, A. S., Merrigan, K. T., Cohen-Solal, K. A., Goydos, J. S., 2010, The glutamate release inhibitor Riluzole decreases migration, invasion, and proliferation of melanoma cells, *Journal of investigative dermatology*, 130(9), 2240-2249.
- Lee, A., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B., 2019, Propranolol inhibits neonatal Nav1.5 activity and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells: Effects of combination with ranolazine, *Journal of cellular physiology*.
- Lipkind, G.M., Fozzard, H.A., 2005, Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels, *Molecular pharmacology*, 68, 1611-1622.37 1413.
- Liu, X. D., Xie, L., Liang, Y., Li, L., Lu, T., 2003, Gender difference in ranolazine pharmacokinetics in rats, *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 28(2), 119-123.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Darnell, J., 2003, *Molecular Cell Biology*, fifth edition, WH Freeman.

- Madeja, Z., Miekus, K., Czernik, M., Sroka, J., Czyz, J., 2005, Contact stimulation of prostate cancer cell migration: The role of gap junctional coupling and migration stimulated by heterotypic cell-to-cell contacts of Dunning rat prostate cancer cells, *Biology of the cell*, 97(12), 893-903.
- Maltsev VA., Undrovinas AI., 2006, A multi-modal composition of the late Na⁺ current in human ventricular cardiomyocytes, *Cardiovascular research*, 69, 116-127.
- Mao, W., Zhang, J., Korner, H., Jiang, Y., Ying, S., 2019, The emerging role of voltage-gated sodium channels in tumour biology, *Frontiers in oncology*, 9, 124.
- Mathew, S. J., Amiel, J. M., Coplan, J. D., Fitterling, H. A., Sackeim, H. A., Gorman, J. M., 2005, Open-label trial of riluzole in generalized anxiety disorder, *American journal of psychiatry*, 162(12), 2379-2381.
- Matsuki, N. O. R. I. O., Quandt, F. N., Ten Eick, R. E., Yeh, J. Z., 1984, Characterization of the block of sodium channels by phenytoin in mouse neuroblastoma cells, *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 228(2), 523-530.
- McEleny, K. R., Watson, R. W. G., Coffey, R. N., O'Neill, A. J., Fitzpatrick, J. M., 2002, Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines, *The prostate*, 51(2), 133-140.
- Michaelis, M., Doerr, H. W., Cinatl, J., 2007, Valproic acid as anti-cancer drug, *Current pharmaceutical design*, 13(33), 3378-3393.
- Mizoule, J., Meldrum, B., Mazadier, M., Croucher, M., Ollat, C., Uzan, A., Le Fur, G., 1985, 2-Amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission—I: anticonvulsant properties, *Neuropharmacology*, 24(8), 767-773.
- Mokhtar, N. F., 2011, *Pharmacological studies of voltage-gated sodium channel expression in human breast cancer cells: Control of metastatic cell behaviours*, PhD degree, Imperial College London, Division of Cell and Molecular Biology.
- Mullins, J. K., Loeb, S., 2012, March, Environmental exposures and prostate cancer, In *urologic oncology: seminars and original investigations*, 30, 216-219.
- Namkoong, J., Shin, S. S., Lee, H. J., Marín, Y. E., Wall, B. A., Goydos, J. S., Chen, S., 2007, Metabotropic glutamate receptor 1 and glutamate signaling in human melanoma, *Cancer research*, 67(5), 2298-2305.
- Nakajima, T., Kubato, N., Tsutsumi, T., Oguri, A., Imuta, H., JO, T., Oonuma, H., Soma, M., Megura, K., Takano, H., Nagase, T., Nagata, T., 2009, Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells, *British journal of pharmacology*, 156(3), 420-431.
- Nandana, S., Chung, L.W., 2014, Prostate cancer progression and metastasis: potential regulatory pathways for therapeutic targeting, *American journal of clinical and experimental urology*, 2 (2), 92-101.

- Nelson, M., Millican-Slater, R., Forrest, L. C., Brackenbury, W. J., 2014, The sodium channel $\beta 1$ subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis, *International journal of cancer*, 135(10), 2338-2351.
- Nicholson, G.M., 2007, Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels, *Toxicon*, 49, 490–512.
- Noh, K. M., Hwang, J. Y., Shin, H. C., Koh, J. Y., 2000, A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C, *Neurobiology of disease*, 7(4), 375-383.
- Ogata N., Ohishi Y., 2002, Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na^+ channels, *Japanese journal of pharmacology*, 88, 365-377.
- Oliver, J. S., 2007, Attitudes and beliefs about prostate cancer and screening among rural African American men, *Journal of cultural diversity*, 14(2).
- Onganer, P., Djamgoz, M.B.A., 2007, Epidermal growth factor potentiates *in vitro* metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel, *Molecular cancer*, 6:76.
- Onkal, R., Djamgoz, M. B., 2009, Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1. 5 in breast cancer, *European journal of pharmacology*, 625(1-3), 206-219.
- Pan, H., Djamgoz, M. B., 2008, Biochemical constitution of extracellular medium is critical for control of human breast cancer MDA-MB-231 cell motility, *Journal of membrane biology*, 223(1), 27-36.
- Pantel K, Brakenhoff RH., 2004, Dissecting the metastatic cascade, *Nature reviews cancer*, 4, 448-56.
- Parihar, A. S., Coghlan, M. J., Gopalakrishnan, M., Shieh, C. C., 2003, Effects of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation, *European journal of pharmacology*, 471(3), 157-164.
- Patel, F., Brackenbury, W. J., 2015, Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer, *The International journal of developmental biology*, 59, 357.
- Perdana, N. R., Mochtar, C. A., Umbas, R., Hamid, A. R., 2016, The risk factors of prostate cancer and its prevention: a literature review, *Acta medica Indonesiana*, 48(3), 228-38.
- Pittenger, C., Coric, V., Banasr, M., Bloch, M., Krystal, J. H., Sanacora, G., 2008, Riluzole in the treatment of mood and anxiety disorders, *CNS drugs*, 22(9), 761-786.

- Pollard, M., 1980, Animal models for prostate cancer, *Prostate*, 1(2), 207-13.
- Pulukuri, S. M., Gondi, C. S., Lakka, S. S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., Rao, J. S., 2005, RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo, *Journal of biological chemistry*, 280(43), 36529-36540.
- Purut, E., Altun, S., 2017, The Role of Lidocaine in the Dunning Model Rat Prostate Cancer Cells: Cell Kinetics and Motility, *Multidisciplinary digital publishing institute proceedings*, 1(10), 1069.
- Quinn, M., Babb, P., 2002, Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons, *BJU international*, 90(2), 162-173.
- Rajamani S, Shryock JC., Belardinelli L., 2008, Block of tetrodotoxin-sensitive, Na(V)1.7 and tetrodotoxin-resistant, Na(V)1.8, Na⁺ channels by ranolazine, *Channels (Austin)* 2, 449-460.
- Rawla, P., 2019, Epidemiology of Prostate Cancer, *World journal of oncology*, 10(2), 63.
- Recatala, V.S., 1999, *A study on the contribution of voltage-gated Na⁺ channel activity to rodent prostate cancer cell migration in vitro*, PhD degree, Imperial College of Science, Technology and Medicine, Department of Biology.
- Rizaner, N., 2010, *Studies of ionic mechanisms in model cell lines of prostate cancer*, PhD degree, Imperial College London, Division of Cell and Molecular Biology
- Roger, S., Besson, P., Le Guennec, J. Y., 2003, Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line, *Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes*, 1616(2), 107-111.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P. I., Iochmann, S., Le Guennec, J. Y., 2007, Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(4), 774-786.
- Saint, DA., Ju, Y.K., Gage, P.W., 1992, A persistent sodium current in rat ventricular myocytes, *The journal of physiology*, 453, 219–231.
- Saint, D. A., 2008, The cardiac persistent sodium current: an appealing therapeutic target?, *British journal of pharmacology*, 153(6), 1133-1142.
- Schlaberg, R., Choe, D. J., Brown, K. R., Thaker, H. M., Singh, I. R., 2009, XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors, *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(38), 16351-16356.

- Schwartz, G. G., Hulka, B. S., Is Vitamin, D., 1990, deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis), *Anticancer research*, 10, 1307-1311.
- Schwinghammer, T. L., Howrie, D. L., 1983, Phenytoin-induced lymphadenopathy, *Drug intelligence & clinical pharmacy*, 17(6), 460-462.
- Schwirzke M, Schiemann S, Gnirke AU., Weidle UH., 1999, New genes potentially involved in breast cancer metastasis, *Anticancer research*, 19, 1801-1814.
- Sezzi, M. L., De, G. L., Materazzi, M., Bellelli, L., 1985, Effects of a calcium-antagonist (flunarizine) on cancer cell movement and phagocytosis, *Anticancer research*, 5(3), 265-271.
- Shen, H., Zhou, Q., Pan, X., Li, Z., Wu, J., Yan, N., 2017, Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution, *Science*, 355(6328).
- Slack, J. K., Adams, R. B., Rovin, J. D., Bissonette, E. A., Stoker, C. E., Parsons, J. T., 2001, Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells, *Oncogene*, 20(10), 1152.
- Sokolov, M. V., Henrich-Noack, P., Raynoschek, C., Franzén, B., Larsson, O., Main, M., Dabrowski, M., 2018, Co-expression of β Subunits with the Voltage-Gated Sodium Channel Na V 1.7: the Importance of Subunit Association and Phosphorylation and Their Effects on Channel Pharmacology and Biophysics, *Journal of molecular neuroscience*, 65(2), 154-166.
- Song, Y., Shryock, J. C., Wagner, S., Maier, L. S., & Belardinelli, L., 2006, Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction, *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318(1), 214-222.
- Sonn, G. A., Aronson, W., Litwgn, M. S., 2005, Impact of diet on prostate cancer: a review, *Prostate cancer and prostatic diseases*, 8, 304-310.
- Sossalla, S., Wagner, S., Rasenack, EC., Ruff, H., Weber, SL., Schöndube, FA., Tirilomis, T., Tenderich, G., Hasenfuss, G., Belardinelli, L., Maier, LS., 2008, Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts-role of late sodium current and intracellular ion accumulation, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 45, 32-43.
- Speyer, C. L., Nassar, M. A., Hachem, A. H., Bukhsh, M. A., Jafry, W. S., Khansa, R. M., Gorski, D. H., 2016, Riluzole mediates anti-tumor properties in breast cancer cells independent of metabotropic glutamate receptor-1, *Breast cancer research and treatment*, 157(2), 217-228.
- Speyer, C. L., Bukhsh, M. A., Jafry, W. S., Sexton, R. E., Bandyopadhyay, S., Gorski, D. H., 2017, Riluzole synergizes with paclitaxel to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 166(2), 407-419.

- Sporn MB., 1996, The war on cancer, *Lancet* 347, 1377-81.
- Sridhar G., Masho SW., Adera T., Ramakrishnan V., Roberts JD., 2010, Association between family history of prostate cancer, *JMH*, 7, 45-54.
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA., 1993, Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis, *Annual review of cell biology*, 9, 541-73.
- Stettner, M., Krämer, G., Strauss, A., Kvitkina, T., Ohle, S., Kieseier, B. C., Thelen, P., 2012, Long-term antiepileptic treatment with histone deacetylase inhibitors may reduce the risk of prostate cancer, *European journal of cancer prevention*, 21(1), 55-64.
- Suckow, M. A., Gutierrez, L. S., Risatti, C. A., Wolter, W. R., Taylor, R. E., Pollard, M., Paoni, N. F., 2004, The anti-ischemia agent ranolazine promotes the development of intestinal tumors in APC (Min/+) mice, *Cancer letters*, 209(2), 165-169.
- Teichmann, M., Kretschy, N., Kopf, S., Jarukamjorn, K., Atanasov, A. G., Viola, K., Dirsch, V. M., 2014, Inhibition of tumour spheroid-induced prometastatic intravasation gates in the lymph endothelial cell barrier by carbamazepine: drug testing in a 3D model, *Archives of toxicology*, 88(3), 691-699.
- Tennant, T.R., Kim, H., Sokoloff, M., Rinker-Schaeffer, C.W., 2000, The Dunning model, *The prostate*, 43, 295-302.
- Türkyılmaz, M., Hacıkamiloğlu, E., Baran Deniz, E., Boztaş, G., Dündar, S., Kavak Ergün, A., 2018, *Türkiye kanser istatistikleri 2015*, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Ulbricht, W., 2005, Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation, *Physiological reviews*, 85(4), 1271-1301.
- Undrovinas, A. I., Benardinelli, L., Undrovinas, N. A., Sabbah, H. N., 2006, Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current, *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 17, 169-177.
- Urbani A, Belluzzi O., 2000, Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons, *The European journal of neuroscience*, 12(10):3567-74.
- Uzun, S., Altun, S., Bugan, İ., 2017, 9P Anti-metastatic effect of riluzole on Mat-LyLu rat prostate cancer cell line, *Annals of oncology*, 28.
- Vaidya KS., Welch DR., 2007, Metastasis suppressors and their roles in breast carcinoma, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 12, 175-190.

- Wang, G. K., Calderon, J. Wang, S-Y., 2007, State- and use-dependent block of muscle Nav1.4 and neuronal Nav1.7 voltage-gated Na⁺ channel isoforms by ranolazine, *Molecular pharmacology*, 73, 940-948.
- Wang, Y. J., Lin, M. W., Lin, A. A., Wu, S. N., 2008, Riluzole-induced block of voltage-gated Na⁺ current and activation of BKCa channels in cultured differentiated human skeletal muscle cells, *Life sciences*, 82(1-2), 11-20.
- Wangpaichitr, M., Wu, C., Li, Y. Y., Nguyen, D. J., Kandemir, H., Shah, S., Savaraj, N., 2017, Exploiting ROS and metabolic differences to kill cisplatin resistant lung cancer, *Oncotarget*, 8(30), 49275.
- Webber, M. M., Bello, D., Quader, S., 1996, Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications part I, Cell markers and immortalized nontumorigenic cell lines, *The prostate*, 29(6), 386-394.
- Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM., Van't Veer LJ., 2005, Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer, *Cancer research*, 65, 9155-9158.
- Weiss, S., Benoist, D., White, E., Teng, W., & Saint, D. A., 2010, Riluzole protects against cardiac ischaemia and reperfusion damage via block of the persistent sodium current, *British journal of pharmacology*, 160(5), 1072-1082.
- Weiss, S. M., Saint, D. A., 2010, The persistent sodium current blocker riluzole is antiarrhythmic and anti-ischaemic in a pig model of acute myocardial infarction, *PLoS one*, 5(11), 14103.
- Wenger, A.S., Mickey, D.D., Hall, M., Silverman, L.M., Mickey, G.H., Fried, F.A., 1984, In vitro characterization of Mat LyLu: a dunning rat prostate adenocarcinoma tumor subline, *The journal of urology*, 131(6), 1232-6.
- Willow, M., Gonoï, T., Catterall, W. L., 1985, Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Molecular pharmacology*, 27(5), 549-558.
- Wu, Z., Yang, Y., Xie, L., Xia, G., Hu, J., Wang, S., Zhang, R., 2005, Toxicity and distribution of tetrodotoxin-producing bacteria in puffer fish *Fugu rubripes* collected from the Bohai Sea of China, *Toxicon*, 46, (4), 471-476.
- Yang, M., Kozminski, D. J., Wold, L. A., Modak, R., Calhoun, J. D., Isom, L. L., Brackenbury, W. J., 2012, Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na^v 1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 134(2), 603-615.
- Ye, Q., Yan, L. Y., Xue, L. J., Wang, Q., Zhou, Z. K., Xiao, H., Wan, Q., 2011, Flunarizine blocks voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ currents in cultured rat cortical neurons: A possible locus of action in the prevention of migraine, *Neuroscience letters*, 487(3), 394-399.

- Yıldırım, S., 2007, *Tetrodotoksin'in sıçan prostat kanseri üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yıldırım, Ş., 2011, *Sıçan prostat kanseri modelinde metastatik potansiyelin değerlendirilmesi: Voltaj kapılı sodyum kanal ekspresyonunun rolü*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yıldırım, S., Altun, S., Gumushan, H., Patel, A., Djamgoz, M.B., 2012, Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo, *Cancer letters*, 323 (1), 58-61.
- Yip, D., Le, M. N., Chan, J. L. K., Lee, J. H., Mehnert, J. A., Yudd, A., Goydos, J. S., 2009, A phase 0 trial of riluzole in patients with resectable stage III and IV melanoma, *Clinical cancer research*, 15(11), 3896-3902.
- Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A., 2005, Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily, *Pharmacological reviews*, 57,387–395.
- Zar, J.H., 1999, *Biostatistical Analysis*, 4th ed., Prentice Hall International Inc., New Jersey.
- Zona C, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G., 1998, Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons, *Neuroscience*, 85(3), 931-8.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ceyda Önen
Doğum Yeri	Fatih
Doğum Tarihi	25.05.1988
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	5558682641
E-Posta Adresi	ceyda.onen@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	24.06.2010

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Genel Biyoloji Programı

Makale ve Bildiriler
Onen, C., Bugan, I., Altun, S., Djamgoz, M.B.A., 2018, Ranolazine and Riluzole Combination in Prostate Cancer Proliferation, <i>International Congress on Biological and Medical Sciences</i> , 31 October-03 November 2018, Nigde Omer Halisdemir University, Nigde.