



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**PROSTAT KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE ZOLEDRONİK  
ASİT TEDAVİSİNİN HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİNE  
ETKİSİ**

**Doktora Tezi**

A. Çağ ÇAL

Tıbbi Biyoloji

İzmir  
2020

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PROSTAT KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE  
ZOLEDRONİK ASİT TEDAVİSİNİN HÜCRE ADEZYON  
MOLEKÜLLERİNE ETKİSİ**

A. Çağ ÇAL

Danışman  
Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Adı

İzmir  
2020

## Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Prof.Dr. Cumhuri GÜNDÜZ .....

(Danışman)

**Üye** : Prof.Dr. İbrahim CÜREKLİBATIR .....

**Üye** : Prof.Dr. Zeynep YÜCE .....

**Üye** : Prof.Dr. İlhan ÇELEBİ .....

**Üye** : Doç. Dr. Buket KOSOVA .....

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: .....

## Önsöz

“Neden?” sorusu insan aklının gündemini en fazla işgal eden, bir o kadar da başını dertlere sokan ama daha iyiye ilerleyebilmenin temel çıkış noktasıdır.

Hemen herkes gibi bugüne kadar insan bedenine ilişkin benim de merak ettiğim çok konu oldu, çok soru sordum. Sanıyorum çoğu sorumun yanıtına hatta doğru yanıtına erişebildiğim için hayatımı geliştirerek, zenginleştirerek sürdürdüm. Lakin ne sorularım, ne de bir anlamda arayışlarım hiç bitmedi.

Hal böyle olunca “Profesör” ünvanı aldıktan sonra birçok meslektaşım gibi doktora sürecim başladı. Süreç içerisinde kimi gün öğrenci kimi gün jüri üyesi olarak akademik hayata hizmet ettim.

Ümit ediyorum, gelecek günlerde de “Neden?” sorusu hayatın ve hayatımın bir parçası olmaya devam edecek.

İzmir, 7.07.2020

A. Çağ Çal

## Özet

### Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde

#### Zoledronik Asit Tedavisinin Hücre Adezyon Moleküllerine Etkisi

Prostat kanserinin tanı ve tedavisine yönelik birçok alanda çok fazla ilerleme sağlanabilmesine rağmen hastalık asgaride bazı vakalar için ölümcül olma niteliğini sürdürmektedir. Hastaların ölümden kurtulması için atılan her adım hedefe yaklaşmamızı sağlayabilse de sonuca ulaşmak için alınması gereken yol halen vardır.

Kök hücrelerin varlığının saptanmasıyla birlikte insan sağlığı için önemi ve tedavide nasıl kullanılacağına yönelik çalışmalar da başladı. Kanseri kök hücre kavramı ve gerçeği farklı bir olgudur. Vücut hücrelerinden farklı özellikleri olsa da kanser kök hücrelerinin temel biyolojik kurallara belirli oranda sahip olduğu mutlaka aklıda tutulmalıdır. Bu bakışla, kanser kök hücrelerinin metastaz yapan, tedavi sonrası nükse yol açabilen veya tedaviye direnç geliştiren hücrelere kaynak olması şaşırtıcı değildir.

Kanser tedavilerinde başarının elde edilmesine böylesine çok noktada engel olan bir hücre çeşidinin saptanması ve yok edilmesine yönelik tedavilerin planlanmaya başlanması ise çok doğaldır.

Tez çalışmasında amaç; prostat kanseri kök hücrelerinin zoledronik asit ile tedavisinin metastaz geliştirme sürecinde önemli rolü olan adezyon moleküllerine etkisinin belirlenmesidir.

Zoledronik asit tedavisi DU145 prostat kanser hücreleri arasındaki kanser kök hücrelerine uygulandı.

Akım sitometrisi ile elde edilen sonuçlar, önemli kanser kök hücre yüzey belirteci olan CD44 hücre yoğunluğunda zoledronik asit tedavisi ile önemli düşüşler olduğunu gösterdi. ZOL uygulaması CD44, ITGB1, CD29, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPP1, TGFB1, TGFB1, TIMP2, ADAMTS1, ITGB5 adezyon genlerinde önemli değişimlere yol açtı. En belirgin değişim SPP1’de saptandı.

İn vitro ortamda zoledronik asidin kanser kök hücre adezyon molekülleri üzerine baskılayıcı etki yaratması klinik kullanımda prostat kanseri tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler;** Prostat kanseri; kanser kök hücresi; zoledronik asit; hücre adezyon molekülleri; tedavi.



## Abstract

### **Effect of Zoledronic Acid Treatment on Cell Adhesion Molecules on Prostate Cancer Stem Cells**

Although much progress can be achieved in many areas for the diagnosis and treatment of prostate cancer, the disease remains fatal for some cases. Every step taken to get rid of death can help us to approach the goal, but there is still a way to achieve the outcome.

With the detection of the presence of stem cells, studies on its importance for human health and how it can be used in treatment have started. Cancer stem cell concept and reality is a different phenomenon. It should be kept in mind that cancer stem cells possess a certain proportion of basic biological rules, although they have different features than body cells. From this perspective, it is not surprising that cancer stem cells are the source of cells that metastasize, which may lead to post-treatment relapse or develop resistance to treatment.

Cancer stem cells impede the success of treatments. Therefore, it is natural to start planning treatments for its eradication.

The aim of the thesis; to determine the effect of treatment of prostate cancer stem cells with zoledronic acid on adhesion molecules which play an important role in the development of metastasis.

Zoledronic acid treatment was applied to cancer stem cells which obtained from through DU145 prostate cancer cells.

It was determined the significant decreases in CD44 cell density, which is important cancer stem cell surface marker, with zoledronic acid treatment by flow cytometry. Zoledronic acid treatment was caused to significant changes in the adhesion genes CD44, ITGB1, CD29, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPP1, TGFB1, TGFB1, TIMP2, ADAMTS1, ITGB5. The most significant change was detected in SPP1.

The suppressive effect of zoledronic acid on cancer stem cell adhesion molecules in vitro shows that it can be used in the treatment of prostate cancer in clinical use.

**Keywords;** Prostate cancer; cancer stem cell; zoledronic acid; cell adhesion molecules; treatment.

## İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler .....	VI
Tablolar Dizini.....	VII
Şekiller Dizini .....	VIII
Kısaltma Listesi .....	IX
Giriş .....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	10
1.2. Araştırmanın Sorusu .....	10
1.3. Araştırmanın Hipotezleri .....	11
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	11
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları .....	11
1.6. Araştırmanın Amacı .....	11
Genel Bilgiler .....	12
Gereç ve Yöntem .....	17
Bulgular.....	23
Tartışma .....	42
Sonuç ve Öneriler .....	44
Kaynaklar .....	45
Teşekkür .....	53
Özgeçmiş .....	54

## Tablolar Dizini

Tablo 1: Gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile karşılaştırılmasının yapıldığı gen listesi.

Tablo 2: DU145 KKH ZOL'e karşı DU145 NKKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri.

Tablo 3: DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH'lerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Tablo 4: DU145 KKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Tablo 5: DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Tablo 6: DU145 NKKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Tablo 7: DU145 NKKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Tablo 8: Ekspresyon katsayı düzeyi 2 üzeri olan gen listeleri. Dört farklı hücre grubu birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

## Şekiller Dizini

Şekil 1. Tümör mikroçevresindeki hücrel etkileşimler.

Şekil 2. Bifosfonat bileşiklerin kimyasal yapılarının gösterimi

Şekil 3. Zoledronik asit difosfat farnesil enzimini inhibe eder ve küçük GTPaz olan Ras ve Rho prenilasyonuna müdahale eder (HMG-CoA= 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A).

Şekil 4: Hücre grupları karşılaştırılmasında anlamlı çıkan genlerin grafiksel gösterimi.

Şekil 5: DU 145 KKH kontrol ve ZOL grubunda CD44 protein ekspresyonu. Hücreler akış sitometrisi ile analiz edildi ve CD44 pozitif hücre oranları karşılaştırıldı.

Şekil 6: DU 145 NKKH kontrol ve ZOL grubunda CD44 protein ekspresyonu. Hücreler akış sitometrisi ile analiz edildi ve CD44 pozitif hücre oranları karşılaştırıldı.

Şekil 7: DU145 KKH'lerinin SPP1 immünofloresan boyaması

Şekil 8: ZOL maruziyeti sonrası DU145 KKH'lerinin SPP1 immünofloresan boyaması

Şekil 9: DU145 NKKH'lerinin SPP1 immünofloresan boyaması

Şekil 10: ZOL maruziyeti sonrası DU145 NKKH'lerinin SPP1 immünofloresan boyaması

## Kısaltma Listesi

Zoledronik asit	: ZOL
Kanser Kök Hücresi	: KKH
Prostat Kanseri Kök Hücresi	: PKKH
Bifosfonatlar	: BP' lar
Tümör Başlatıcı Hücre	: T-IC
Matris Metalloproteinaz 9	: MMP-9
Miyelom kemik iliği stromal hücrelerde	: BMSCs
Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri	: KDPK
Tümör Nekroz Faktör	: TNF
Circulating Endothelial Precursor Cells	: CEPC

## Giriş

Toplumun yaşlanması ürolojik kanserlerin görülme sıklığında bir artışa yol açsa da prostat kanserinden ölüm oranları giderek azalmaktadır (Rebecca 2018). Prostat kanseri hastalarında sırasıyla 10 yıllık ve 15 yıllık yaşam beklentisi 2005 yılında %92 ve %61 düzeyinde (<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2005f4pwsecuredpdf.pdf>. Published 2005) iken 2015 yılı istatistiklerine 5 yıl için %100, 10 yıl için %99 ve 15 yıl için %94 oranlarına erişmiştir (American Cancer Society 2015). Prostat kanserine bağlı ölüm oranındaki azalma; tanının daha erken evrede konulması, etkin tedavi seçeneklerinin klinik kullanıma alınması ile açıklanabilir. Bununla birlikte; prostat kanseri cerrahi, radyoterapi, androjen baskılama tedavisi, kemoterapi, hatta radyofarmasötik uygulamalardaki gelişmelere rağmen halen bireyin ölümüne neden olabilecek bir hastalıktır. Tedavi uygulamalarına rağmen prostat kanserinin öldürücü etkisinin kontrol altına alınmamasını açıklamak için malign hastalıkların genel özelliklerine bakmak yol gösterici olabilir.

Geleneksel kanser tedavi yöntemleri etkilerini hızlı çoğalan neoplastik hücrelere yönelik gösterdikleri için yavaş proliferen olan kanser kök hücreleri uygulanan tedavilere dirençli kalarak canlılıklarını sürdürebilirler. Yine normal hücreler üzerine nonspesifik toksik etki gösteren kanser cerrahisi, hormonal tedaviler, antianjiyogenik uygulamalar ve immunoterapi yöntemleri kanser kök hücrelerini hedeflemekte yetersiz kaldıkları sürece etkili olamayacaklardır.

Böylece, tümör dokusu içerisinde az miktarda da olsa yer alan kanser kök hücreleri kanser hücrelerine dönüşebilir ve tümörün tekrarlamasına, tedavilere karşı direnç kazanmasına hatta metastaz yapmasına neden olabilir.

Kanser kök hücrelerinin tümör oluşturmaya başlatma gücü ile hastalığın metastazlarla rekürens göstermesi ve tedavilere direnç (kemorezistans, immunorezistans ve radyoterapi rezistansı) yaratabilme yeteneğine ilişkin bulgular her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle, kanser kök hücrelerinin yok edilmesi hastalığın nüks etmesine engel olarak tam tedavi oranları ve yaşam süresinde artışa zemin oluşturabilir (Alison 2008).

Kanserin farklı fenotipik ve fonksiyonel özellikleri olan heterojen hücre grubunda gelişmesi de tedavilerin etkinlik ve sonuçlarını etkileyebilir (Alison 2008). Bununla birlikte, tümörü oluşturan kitlede çok az sayıda hücre tümör oluşturmaya eğilim yaratacak kendisini yenileme eğilimine sahiptir. Bu hücreler için kanser kök hücresi,

kanser kök-benzeri hücre (cancer stem-like cell) veya tümör başlatan hücreler (tumor initiating cells) isimleri kullanılmaktadır. Kanser kök hücre teorisi olarak bilinen bu fenomene göre tümör kitlesi kök hücre niteliklerine sahip kanser hücresi alt grubu tarafından şekillendirilmektedir (Gil 2008). Kanser kök hücresi (KKH) / tümör başlatıcı hücrenin (T-IC) kanser hücresi alt grubunu oluşturduğunun saptanması günümüzde kullanılan tedavilere yanıt alınamamasının gerekçelerini izah etmekte kullanılabilecek bir araçtır.

Kanser hücreleri KKH / T-IC grubunun tepede yer alacağı hiyerarşik bir düzen içerisinde konumlanırlar (Lau 2017, Nguyen 2012). Kanser kök hücrelerinin normal kök hücreden mutasyonla veya bu hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyen genetik programın deregülasyonu ile oluştuğuna ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. Oluşan mutasyonlar sonrasında sağlıklı fenotipe sahip kök hücreler yapısal olarak aktiflenmiş hale dönüşürler.

Kendisini yenileme, tümör formasyonu oluşturabilme ve heterojen tümör kitlesini oluşturacak ek farklılaşmış progeni üretmek gibi özellikler normal kök hücrelerle kanser kök hücreleri arasındaki benzer niteliklerdir. Bunlara ek olarak, kanser kök hücrelerinin tümörün metastaz yapabilmesi, tedavilere direnç gösterebilmesi ve rekürensi gibi özellikler taşıdığına ilişkin bulgular vardır (Ayla 2019). Bu tespitler sonrasında kanser kök hücrelerinin yok edilmesine yönelik tedavi arayışları daha fazla ilgi çeker hale geldi.

Teoride kök / progenitör hücreler tümörjenik mutasyonların tek doğal hedefidirler, çünkü bu hücreler uzun yaşam süresine sahiplerdir; normal hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu ile ilgili iç düzenleyici mekanizmaların engellenmesine zemin oluşturacak yeterli sayıda mutasyonun gelişebilmesi kapasitesi de bulunmaktadır (Lau 2017, Borah 2015, Kim 2011).

Sağlıklı bir organda kök hücre nişinde yer alan kök hücreler, canlılıklarının idamesinin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan mikroçevreye ve salgılanan parakrin faktörler veya doğrudan hücre-hücre etkileşimiyle hücre yenilenmesiyle diferansiyasyonunu sağlayan yolları bulunur. Kanser kök hücreleri de kanser kök hücre nişi niteliğini gösterirler. Tümöre özgü mikroçevre perivasküler hücreler, hipoksik bölgeler ve ekstrasellüler matriksle uyumludur. Çevresel faktörler Wnt/ $\beta$ -catenin, Notch ve Hedgehog yollarının kendini yenileme etkisini değiştirerek kanser kök hücreleri üzerine etki ederler. Embriyonik kök hücre kendini yenilemesiyle ilişkili temel

transkripsiyon düzenleyicilerinin (NANOG, OCT-4 ve SOX-2 gibi) engellenmesi de tümör mikroçevresince idame ettirilir (Borah 2015, Kim 2011).

Ekstrasellüler matriks hücre proliferasyonu ve canlılığın sürdürülmesinde hayati önemde olduğu için hücrenin ekstrasellüler matrikse tutunması esansiyeldir ve ekstrasellüler matriksten ayrılma apoptozisi indükleyebilir. Anoikis ekstrasellüler matrikse bağlantıdaki yetersizlik sonucu hücre ölümünün tetiklenmesi olarak tanımlanabilir. Hücre yenilenmesinin genelde çok yüksek olduğu epitelial hücrelerde bu düzenleyici mekanizma özellikle önemlidir (Malagobadan 2015). Kanser hücrelerinin metastatik davranış gösterebilmeleri için anoikise direnç kritik önem taşımaktadır. Kanser hücrelerinin sferik şekli başlatabilmeleri için dediferensiye oldukları gösterilmiş olsa da anoikis direnci sferik formasyon gerektirmesi buna örnektir (Weiswald 2013, Hindupur 2014).

### **Kanser Patogenezi Adezyon Moleküllerinin Rolü**

Kanser patogenezi normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşüm süreci olarak belirtilir ve moleküler olarak kanser hücrelerinin incelenmesi ile birlikte bu sürecin aydınlatılmasının olası olduğu düşünülmektedir (Bukhtoyarov 2015).

Prostat kanser patogenezi diğer kanser türlerinde olduğu gibi adezyon moleküllerinin patogeneziadaki rolü önemlidir. Örneğin kolon, meme, akciğer, metastatik melanom ve prostat kanseri gibi birçok kanser türünde hastalarda artan osteopontin (SPP1-OPN) seviyeleri bildirilmiştir (Chiodoni 2010, Danzaki 2016, Kluger 2011).

SPP1, hücre çoğalması ve sağkalımı, ilaç direnci mekanizmalarında görev alan, metastaz ve köklülük davranışlarını etkileyen çok işlevli bir sitokindir. İnsan karsinomlarında SPP1'nin geniş bir dağılımı vardır. Tüm bölgeler göz önüne alındığında, SPP1 ekspresyonu, tümör evreleri ile anlamlı şekilde ilişkilidir (Coppola 2004). Bu sitokin, hücre-matriks etkileşimlerini kolaylaştıran ve tümörün ilerlemesini teşvik eden, kollajen olmayan, sialik asit bakımından zengin, kemokin benzeri, matriselüler bir fosfoglikoproteindir. SPP1, tümör gelişimi ve metastazında birden fazla basamağı etkilemekle birlikte, çoklu integrinler ve CD44 ile etki ettiği ve EGFR ve HGF reseptöründen gelen sinyaller ile sinerjik etki oluşturduğu bilinmektedir. SPP1, Akt, Raf / MEK / ERK sinyalleşmesinin düzenlenmesi, ILK / PI3K / GSK-3 $\beta$  (Robertson 2010) ve RAN GTPaz / c-Met / PI3 kinazı içeren çoklu sinyal iletim olaylarını etkiler (Kurisetty 2008, Yuen 2012).

Çoklu ilaç direnci kemoterapi başarısızlığının önemli bir nedenidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, ilaç direncinin sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve tümör mikro-ortamındaki hücre adezyon faktörleri gibi çözünebilir faktörler tarafından hızlı bir şekilde indüklenebileceğini göstermektedir (Shevde 2014). Çoklu ilaca direnç mezenkimal hücrelerin bir özelliğidir ve tipik olarak epitelyal kanser hücrelerinin epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sonrası elde edilir (Li 2013). SPP1'in Twist, Slug, Snail, N-kaderin, Vimentin ve MMP9 gibi mezenkimal işaretleyicilerin ekspresyonunu arttırmada fonksiyonel bir rolü olduğu, hatta epitel fenotipi destekleyen Keratin 8/18 ve E kaderin kaybıyla birlikte bunun desteklendiği belirtilmiştir (Das 2013).

İnsan akciğer kanseri hücrelerinde, SPP1 susturulması kanser hücresi invazyonunu ve metastazı baskılar ve ayrıca otofajiyi indükler (Sun 2013). Rahim ağzı kanseri hücrelerinde SPP1 insan papilloma virüsü (HPV) işleminde görev alan ve hücre dışı kanser hücresi hareketliliğini arttıran hücre dışı bir proteaz olan NF- $\kappa$ B'ye bağlı furin ekspresyonunu başlatan CD44 aracılı p38 fosforilasyonunu düzenler (Kumar 2010).

Prostat kanseri araştırmaları, plazmada bulunan SPP1'in kemoterapi sonrası tedavi yanıtını öngörmeye PSA kadar iyi olduğu, ancak lokalize prostat kanseri içinde artan tümör yükünün biyobelirteçleri olarak yararlı olmadığını göstermiştir.

CD44, hücre sinyalleşmesini de düzenleyen bir hücre adezyon glikoproteinidir. Düzensiz CD44 ekspresyonu, prostat kanseri (PKa) dahil olmak üzere çoğu insan kanserini karakterize eder.

Pgp-1, Ly-24, Hermes, lenfosit hedef reseptörü, H-CAM ve HUTCH-1 olarak da bilinen CD44, hücre-hücre ve hücre-matris yapışmasında ve hücre sinyalleşmesinde rol oynayan tek geçişli bir transmembran glikoproteinidir. N-terminal alanı, toplam CD44'ün ana ligand hiyalürin (Underhill 1992) ve ayrıca SPP1 (Weber 1996) kollajen, laminin (Ishii 1993) ve fibronektin (Jalkanen 1992) gibi hücre dışı matris proteinlerine bağlanmasına aracılık eder. Karboksil sitoplazmik alan, aktin hücre iskeletine (Marhaba 2003) ve ezrin (Legg 2002) ve ankirine bağlanır (Lokeshwars 1991). Bu durum CD44'ün sadece hücre göç fonksiyonlarında değil, aynı zamanda sinyal iletimi de önemli olduğunu göstermektedir (Marhaba 2003).

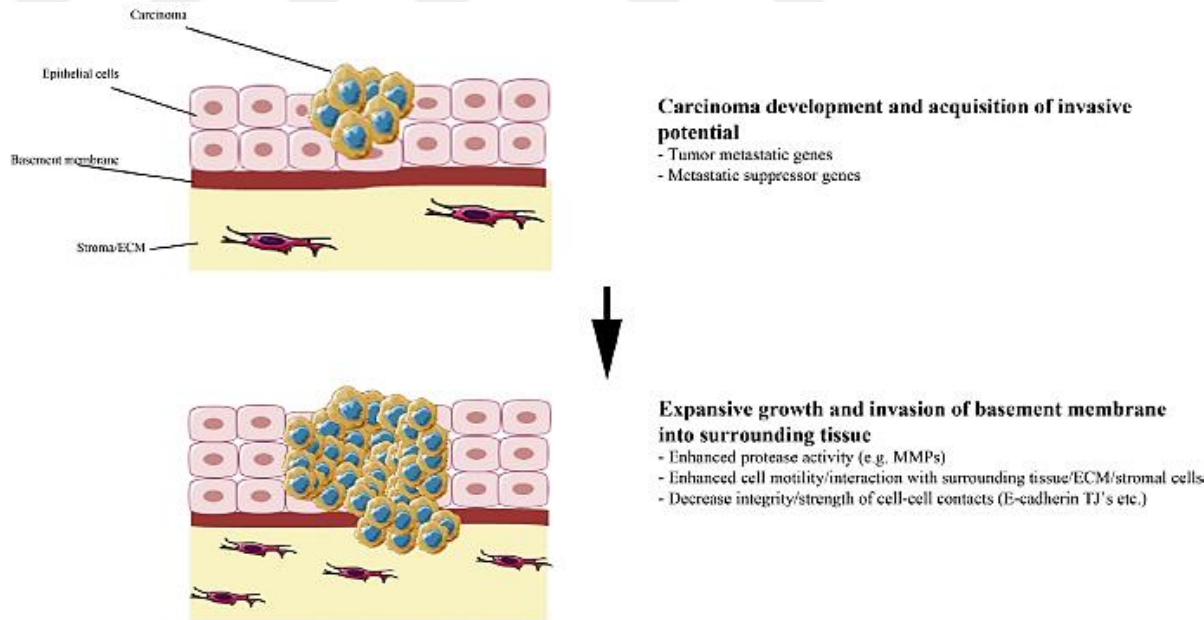
Benign prostattaki kök hücre belirteci olan CD44 bazal hücrelerin bir göstergesidir (Iczkowski 2010, Kallakury 1996). Hem protein hem de mRNA çalışmaları, bazal hücrelerde ve orta derecede benign asinilerdeki lümen hücrelerinde baskın CD44 ekspresyonu gözlenmiştir (Iczkowski 2010, Noordzij 1997, Omara-Opyene 2004).

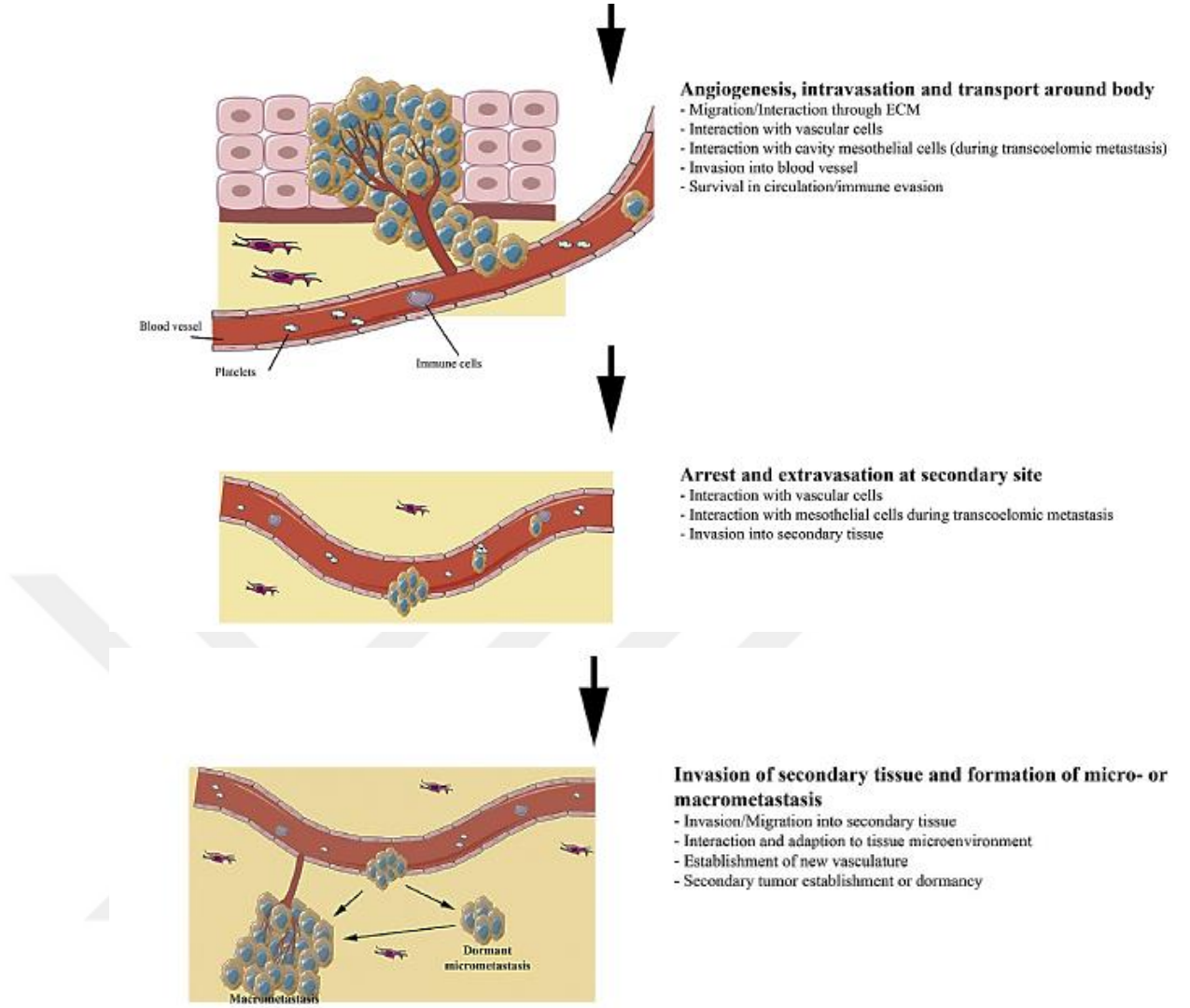
Bununla birlikte prostat kanseri hem CD44 down regülasyonunu hem de artan, anormal değişken izoformlara yol açan düzensiz ekspresyon gösterir.

### **Adezyon Molekülleri Üzerine Zoledronik Asit Etkisi**

Epitelden türeyen kanserlerde, hücre-hücre tutunması primer tümör kitlesinin korunmasında anahtar faktörlerdir. Hücre-hücre yapılarındaki anormallikler, primer tümörün ayrışmasına ve kanser hücrelerinin sekonder bölgelere yayılmasına yol açmaktadır. Hücreler arasındaki bu tutunmanın korunmasında rol oynayan kilit yapılar aderen bağlantılar, sıkı bağlantılar (TJ-Tight junction) ve gap bağlantıdır (GJ- Gap junction).

En güçlü ve en çok çalışılan adezyon düzenleyici maddelerden biri, kaderin protein ailesinin bir üyesi olan E-kadherindir. E-kadherin, hücre-hücre yapısının korunmasında rol almakla birlikte normal epitelde hücre-hücre teması inhibisyonunda yer alan p27kip1 ve p57kip2'nin hücre regülasyon regülatörlerinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Kanser hücrelerinde E-kadherin kaybından dolayı bu regülasyon bozulur. Bu nedenle, hücre-hücre tutunmasının azalmasını, kanser hücrelerinin metastatik yayılma potansiyelinin artmasını, aynı zamanda temas inhibisyonu kaybıyla kontrolsüz hücre büyümesini teşvik etmektedir (Jiang 2015) (Şekil 1).





Şekil 1. Tümör mikroçevresindeki hücrel etkileşimler.

ZOL, anjiyogenezde etkin olan integrin ve kaderin gibi adezyon moleküllerinin modülasyonu ile hücrel göçü inhibe edici etki göstermektedir. Bifosfanatların antitümör etkisi yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla belirlenmiştir. *In vitro* olarak en etkili bifosfanat ZOL olarak belirlenmiştir. Bu olguyu açıklamak için vaskülarizasyon, adezyon, invazyon ve apoptoz aktivasyonu gibi çeşitli hücrel mekanizmaların inhibisyonuna bakılmaktadır. Bu olgular arasında bifosfanatların antitümör aktivitesinin en belirgin etkisinin anjiyogenez inhibisyonu olabileceğini son çalışmalar göstermektedir. Giraud ve ark. bir farenin rahim ağzı kanser modelinde ZOL'ün anjiyogenik tedavisi için bir matris metalloproteinaz 9 (MMP-9) inhibitörü olarak etki gösterdiği tümör modelinde; makrofajların içine sızarak MMP-9 ekspresyonunu bastırıldığını ve metaloproteaz aktivitesini inhibe ettiğini, VEGF'nin anjiyogenik endotel

hücreler üzerindeki reseptörü ile ilişkisini azalttığını rapor etmişlerdir (Girauda 2004). ZOL'ün tutunma, hayatta kalma, göç ve aktin oluşumunu inhibe ettiğini bilinmektedir (Hasmim 2007). Tüm bu deneysel veriler hücresel ve moleküler seviyede ZOL'ün antianjiyogenik aktivitesini açıklar (Santini 2007).

Bisfosfonatlar (BP'ler) osteoklast aktivitesinin ve sağ kalımın güçlü inhibitörleridir. Bazı çalışmalar, BP'lerin, antitümöral ve antimetastatik etkilerini destekleyen, tümörijenik hücreleri inhibe etme kabiliyetine odaklanmıştır. En güçlü azot içeren BP'lerin arasında, ZOL, prostat kanser hücre hatları üzerinde *in vitro* olarak doğrudan bir sitostatik ve proapoptotik etki gösterdiği, matris metaloproteinaz ekspresyonunun azaltılması yoluyla hücre istilasını inhibe ettiği gösterilmiştir.

Klinik öncesi ve klinik çalışmalar ZOL'ün antikanser yararlarını göstermesine rağmen prostat kanser hücre büyümesini önlediği moleküler mekanizma hala bilinmemektedir. ZOL'ün ana hedefi osteoklast olmasına rağmen, ZOL'ün doğrudan antitümör etkileri için artan kanıtlar vardır. Klinik öncesi çalışmalar; tümör hücresi istilasını inhibe ettiğini, tümör hücresinin apoptozunu indüklediğini, hücre canlılığını azalttığını ve anti-anjiyogenik etkileri sergilediğini göstermiştir (Fragni 2016).

Hücrelerin hem birbirlerine hem de ekstraselüler matrikse bağlanması için adezyon moleküllerine ihtiyaç vardır. Adezyon molekülleri; hücre yapısının korunmasında, doku bütünlüğünün sağlanmasında ve yara iyileşmesinde görevlidir. Hücre proliferasyonu, hücre invazyonu, tümör oluşumu ve apoptoz gibi birçok önemli hücresel olay adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleşir (Erguler 2002).

Tümör oluşumunun hücre adezyon molekülleriyle bağlantısı ve hücre invazyonu uzun zamandır çalışılan konulardandır (Tacyıldız 1995). Adezyon molekülleri özellikle plazma hücrelerine hücreden hücreye temasta büyük rol oynarlar.

Kemik dokusu; meme kanseri, miyelom ve prostat kanseri gibi hastalıklarda sıklıkla görülen bir metastaz bölgesidir. Kemikte oluşan metastatik süreçte tümörlerin büyümesini ve hayatta kalmasını sağlayan mekanizmalar kemik iliği stromal hücrelerin üretimi, osteoblast büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile ortaya çıkar (Roodman 2003). Chauhan ve ark. miyelom plazma hücrelerinin kemik iliği mikroçevresiyle olan iletişiminin hücre büyümesi ve apoptozdan korunmayla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. *In vitro* çalışmalarda miyelom hücre hattında ZOL'ün antitümör etkisi gösterilmiştir (Chauhan 1996). Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmada kemik iliği stromal hücrelerinde ZOL'ün etkinliğine bakılmaktadır. ZOL'ün kemik iliği stromal hücreler üzerindeki

antiproliferatif ve apoptotik etkisini göstermişlerdir ve aynı zamanda adezyon moleküllerinin ekspresyonunu incelemişlerdir. Miyelom kemik iliği stromal hücrelerde (BMSCs) proliferasyonun azalması, apoptozun indüklenmesi ve BMSC'lerin sitokin salınmasının down-regülasyonunu engelleyerek hücre-hücre temasıyla alakalı adezyon moleküllerindeki ekspresyon değişimini bu çalışmaları ile göstermişlerdir (Corso 2005). ZOL'ün kaspaz bağımlı bir mekanizma yoluyla prostat kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği ve düşük konsantrasyonlarda hücrelerin mineralize matrislere yapışmasını da önlediği bilinmektedir. Bu etkilerin G-protein prenilasyonunu ve özellikle de geranil-regülasyonunu inhibe ederek ortaya çıktığı gösterilmiştir. Belirgin apoptoz ve hücre yapışmasının düşük dozda ZOL ile mineralize edilmiş matrikste hücre yapışmasının önlenmesi, henüz metastaz geliştirmemiş fakat yüksek risk grubunda bulunan hastalarda bu ilaçla yapılan yeni randomize kontrollü çalışmalar ile prostat kanseri tedavisinde kullanılabilirliği düşünülmektedir (Coxon 2004).

### **Kanser Kök Hücresi ve Zoledronik Asit Etkileşimi**

ZOL'ün prostat kanseri de dahil olmak üzere çok çeşitli solid tümörlerde osteolitik veya osteoblastik kemik lezyonları olan hastalarda kullanımının güvenli ve etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca prostat kanseri hastalarında hastalığın ilerlemesinin farklı aşamalarında etkisi vardır (Lipton 2002; Saad 2004). Literatürde ZOL ile ilgili çalışmalar zoledronik asitin hastanın sağ kalımını iyileştirebileceğini, kanserin ilerlemesini azaltacağını ve güçlü antitümör etkileri sergilediğini göstermiştir. ZOL'ün bu antitümör etkileri, temel olarak, karsinogenezin çeşitli yönlerinde yer alan mevalonat (mevalonate) yolağının kilit bir enzimi olan farnesilpirofosfat sentazı (farnesylpyrophosphate synthase; FPPS) inhibe etme kabiliyetinden kaynaklanması olasıdır (Bizzarro 2015; Guenther 2010).

ZOL, kemik metastazı olan kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC; castration-resistant prostate cancer) hastalarının tedavisinde oldukça etkilidir. Yalnızca osteoklastların aktivasyonunu inhibe etmekle kalmayıp aynı zamanda tümör hücresi büyümesini, istilasını ve göçü önlediğini de gösteren kemik modifiye edici ajanlardan (BMA; bone modifying agent) biridir (Saad 2004; Tanaka 2018).

ZOL'ün ayrıca hücre tutunması, anti-anjiyojenik etkiler ve apoptoz gibi mekanizmalar yoluyla bazı insan malignitelerinde antiproliferatif ve sitostatik etkileri gibi antitümör aktivitelerine sahiptir (Dumon 2004).

ZOL'un prostat kanser kök hücreleri (KKH) üzerine yapılan bir çalışmada; ZOL, KKH olmayan DU145 hücre grubu üzerinde prostat kanser kök hücrelerden daha büyük bir sitotoksik etki sergilemiştir. Aynı çalışmada ZOL'un, apoptozu aktive ederek ilaca dirençli MCF-7 meme ve DU-145 prostat kanser kök hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğu saptandı. ZOL, anti-apoptotik genleri down regüle ederek ve pro-apoptotik genleri up-regüle ederek insan prostat KKH'lerinde apoptozun intrinsik (içsel) yolağını kolaylaştırabileceği vurgulanmıştır. Tüm bu nelerden dolayı ZOL, KKH'lerde hedefleme için etkili bir terapötik ajan olabilir. (Rouhrazi 2018). *In vitro* bir çalışmada ZOL'un meme kanseri progenitör hücrelerinin hareketliliğini ve hücre hızını sınırladığı gösterilmiştir. Çalışmada bu durumun, metastatik kaskadı yavaşlatabileceği hatta durdurabileceğine dikkat çekilmektedir (Bühler 2016). Tüm bu çalışmalar ZOL'un bilinen klinik yararının altında yatan mekanizmaya işaret edebilir.

*In vitro* olarak gerçekleştirilen bir çalışmada ZOL, kemik iliği türevli mezenkimal kök hücreler (MKH) ve meme kanseri hücreleri arasındaki etkileşimini etkileyerek tümör proliferasyonunu ve göçünü inhibe ettiği bulunmuştur (Gallo 2012). ZOL, MKH'lerin primer tümörler tarafından etkilenmesini ederek önemli bir tümör mekanizmasını etkileyebilir. Ek olarak, ZOL endotel hücrelerini FAK-PKB/Akt yolunun inhibisyonu yoluyla TNF (Tümör nekroz faktör) ile indüklenmiş (kaspazdan bağımsız) apoptozu duyarlı hale getirir (Clézardin 2011).

ZOL'un doğrudan kanser büyümesini inhibe ettiği mekanizmalar, otofajinin aktivasyonunu ve apoptozun indüklenmesini içerir. ZOL'un dolaylı antikanser etkileri, kansere karşı immün tepkilerin aktivasyonunu, anjiyogenezin inhibisyonunu ve mezenkimal kök hücrelerle hücre-hücre etkileşimlerinin karışmasını içerir. Son çalışmalarla ZOL'un immünomodülatör aktiviteye sahip olduğu da ortaya konulmuştur (Lin 2014).

ZOL'e dirençli DU145R80 prostat kanseri alt hücre hattı hücrelerinin, ZOL'e sürekli yoğun maruz kalmasının, p38-MAPK yolunu aktive edebileceğini gösterildi. Bu aktivasyon, direncin indüklenmesinde ve DU145 hücre hattına kıyasla daha agresif ve istilacı bir fenotip elde edilmesinde kritik bir role sahiptir. ZOL-dirençli prostat kanser hücrelerinin, stemness (köklülük) özelliği ile ilgili agresif bir kanser kök hücrelerine benzer fenotip geliştirdiğini saptandı (Milone 2013).

Zoledronik asitle ilgili benzer başka bir çalışmada zoledronat dirençli akciğer kanseri ve osteosarkom hücre hatlarında NANOG, c-MYC ve SOX2 seviyelerinin yükseldiği rapor

edildi. Çalışmada sadece kök hücre belirteçleri değil aynı zamanda anti-apoptotik/sağ kalım fonksiyonları ve ilaç direnci sağladığı gösterildi. Bu da zoledronik aside olan ilaç direnci ve kanser hücresi köklüğü (stemness) arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir (Yoshiyama 2016).

ZOL, kanser yayılmasının erken bir aşamasında, CEP (circulating endothelial precursor cells) mobilizasyonunun ve mezenkimal kök hücre fonksiyonunun inhibisyonu yoluyla başlatılan premetastatik nişi hedefleyebilen bir bileşik olarak da görev yapabilir (Santini 2013).

### **1.1. Araştırmanın Problemi**

Prostat kanseri Dünya genelinde en sık görülen ikinci malignitedir. Erken evrede organa sınırlı hastalık taşıyan olguların cerrahi ya da radyoterapi ile tam tedavi olabilmeleri mümkün olsa da ileri evrelerde tanı alan ya da yüksek riskli hastalarda sorunun doğası gereği uzak organ metastazları gözlenmek, tam tedavi sağlanamadığı için olgular hayatlarını kayıp etmektedirler.

Prostat kanserinin heterojen karakterde bir tümör olması da tedavilerin hastaya özel olarak bireyselleştirilmesini zorunlu hale getirmekte, standart tedavi protokolleri belirlenerek uygulanmasını zorlaştırmaktadır.

Prostat kanseri kök hücrelerinin hastalığın başlangıcında ve tedavilere direnç gelişmesinde bir faktör olduğunun belirlenmesi yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasını gündeme getirmiştir.

### **1.2. Araştırmanın Sorusu**

Tıbbın çoğu alanında olduğu gibi sorunun etiopatogenezinin belirlenmesi klinik kullanıma uygun çözümlerin bulunmasına temel oluşturmaktadır. Bütünsel bir bakışla; PKKH' lerinin hastalığın doğal seyrine etkisinin belirlenmesinin ardından sürecin nasıl kontrol edilebileceği yani olası tedavi seçeneklerinin araştırılması gündem maddesi olacaktır.

Bu noktada; hücre adezyon molekülleri üzerinden etkisini gösterebilecek tedaviler planlamak kök hücreleri hedef alan tedavilerle yüz güldürücü sonuçlar elde edilmesine olanak tanıyabilir.

### 1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Prostat kanserinde farklı hücre adezyon moleküllerinde ortaya çıkan değişimler olduğu bilinmektedir. İntegrin' in alfa subünitinin ekspresyonunda azalma olması, metastatik hastalıkta ekspresyonlarında azalma,  $\alpha$ II $\beta$ ' nın normal prostat dokusunda bulunmamasına karşın kanserli dokuda bulunmasının yanı sıra E-kaderin/katenin kompleksinin yüksek Gleason skoruyla ilgisi, P-kaderin ekspresyonunun prostat kanseri dokusunda azalması, kanserli dokuda kaderin-11 bulunması, düşük E-kaderin yüksek N-kadherin ekspresyonuyla progresyon ve mortalite ilişkisi mevcut bilgilerden bazılarıdır.

Ayrıca endojen pirofosfat analogu olan bifosfonatlar prostat kanseri hastalarında kemik metastazı gelişme sıklığını azaltmak, metastaza bağlı komplikasyonları önlemek, metastaza sekonder hiperkalseminin tedavisi gibi farklı endikasyonlarla kullanılmaktadırlar.

Üçüncü jenerasyon bifosfonat olan zoledronik asit mevalonat biyosentezinde spesifik enzim inhibisyonu yaparak intrasellüler sinyal iletimini bozarak etki ettiği de kanıtlanmış bir gerçektir. Bunun yanı sıra, zoledronik asit tedavisinin prostat kanseri hücrelerinde çoğalmayı engellediği, interlökin-6 ekspresyonunu azalttığı, tümör hücrelerinin kemik dokuya tutunmasını engellediği bilinmektedir.

### 1.4. Araştırmanın Varsayımları

*In vitro* ilaç araştırmaları güncel tıp uygulamalarında klinik pratikte kullanıma girebilecek moleküllerin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, laboratuvar ortamında denenen çok sayıda kimyasal bileşen yüz güldürücü sonuçlar vermese de önemli bir bölümü klinik başarı elde edememektedir.

### 1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın yürütüldüğü süre boyunca bu bölümde belirtilmeyi gerektirecek düzeyde bir zorluk yaşanmamıştır.

### 1.6. Araştırmanın Amacı

Malign hücrelerin metastaz yapabilme gücünde söz sahibi olan adezyon moleküllerinin zoledronik asit ile tedavi edilen prostat kanseri kök hücrelerindeki etkisinin saptanmasıdır.

## Genel Bilgiler

### Kök Hücre Nedir?

İnsan vücudunda farklı hücre tiplerine dönüşme yeteneğine sahip oldukları için kök hücreler “tüm dokularla organların oluşumuna temel oluşturan” ana hücreler olarak tanımlanabilirler. Yaşamın başlangıcı olarak tanımlayabileceğimiz **embriyo** döneminden başlayarak yaşam süresince her türlü doku ve organın gelişiminde ve yenilenmesinde kök hücreler görev alırlar.

Kök hücreler genel nitelik olarak farklılaşmamış (diferansiye olmamış) hücrelerdir. Bununla birlikte, sınırsız bölünerek çoğalma kapasiteleri nedeniyle yeni kök hücrelerin oluşmasını sağlayabilirler. Çoğalabilme becerisi özellikle uzun süreli farklılaşma gerektirmeyen durumlarda kök hücrenin yenilenmesini sağlar. Şüphesiz en çarpıcı özellikleri; kök hücrelerin uygun şartlar altında bölünerek çoğalmaları sırasında farklılaşma göstererek organ ve dokulara dönüşebilmeleridir.

Organizmanın gelişimi devam ettikçe kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri giderek azalır. Ovumun sperm tarafından döllenmesiyle gelişmeye başlayan embriyonun yaşamdaki ilk dört günü içerisinde hücrelerin değişme yetenekleri zirvede olduğu için Totipotent olarak tanımlanmaları akılcıdır (Zakrzewski 2019). Bu hücreler vücuttaki her türlü dokuya ve organa dönüşebilirler. Pluripotent kök hücreler ise embriyonun 5-6. günlerinde sistemlerin (santral sinir sistemi, iç organlar, hemopoetik sistemi iskelet sistemi gibi) oluşturulmasını sağlarlar. Bununla birlikte insan bedeninin tamamen oluşturulması için yeterli değildir. Doğuma doğru ilerleyen zamanla birlikte kök hücreler farklılaşma yeteneklerini giderek kayıp ettikleri için Multipotent nitelik kazanırlar. Adolesan dönemin ardından gelen yetişkinlik günlerinde ait oldukları dokuların ve organların yenilenme ihtiyacını sağlayabilecek hale dönüşerek sınırlı multipotent özelliği taşırlar.

Kök hücrelerin pluripotensi, organizmanın herhangi bir hücrelerini oluşturmalarına izin verir (Zakrzewski 2019). İnsan embriyonik kök hücreleri (hESC'ler) embriyonun oluşumundan sonra ortaya çıkan iç hücre kitlesinden (inner cell mass) türetilir. Embriyogenez sürecinde, hücreler germ katmanları (endoderm, mezoderm, ektoderm) olarak adlandırılan kümeleri oluştururlar ve sonuçta her biri fetüsün farklılaşmış hücrelerinin, dokularının oluşumuna zemin sağlar ve daha sonra yetişkin organizmasının gelişimi tamamlanır (Zakrzewski 2019).

Somatik veya yetişkin kök hücreler sadece belirli bir dokunun hücrelerine farklılaşabilirler (diferansiye olabilirler) ve gelişimden sonra tüm vücutta bir dokuya dönüşmüş halde hücreler arasında yer alırlar. Somatik kök hücrelerin işlevi, her gün canlılıklarını yitiren hücrelerin yenisini üretmek, iyileşme ile büyümeyi sağlamaktır (Zakrzewski 2019). Somatik kök hücre tiplerini aşağıdaki şekilde gruplamak mümkündür:

- Mezenkimal kök hücreler birçok farklı dokuda bulunabilir. Örneğin kemik iliğindeki mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilirler. Pluripotent özellikleri bir istisnadır ve herhangi bir germ tabakasının hücrelerine diferansiye olabilirler.
- Nöral hücrelerden sinir hücreleri ve oligodendrositler, astrositler gibi destek hücreleri oluşabilir.
- Hematopoetik kök hücreler eritrosit, lökosit ve trombosit gibi herhangi bir kan hücresinin oluşturulmasında görev alırlar.
- Ciltteki kök hücreler, örneğin derinin koruyucu tabakasını oluşturan keratinositlerin oluşturulması için uygunlardır.

Kök hücrelerin farklılaşma (diferansiyasyon) sürecinin başlaması hücre dışından (hücrelerin birbirlerine fiziksel teması ya da çevre dokunun salgıladığı mediatörler) ve internal (DNA' da yer alan genlerin kontrol sinyalleriyle) sağlanabilir. Bu sayede multipotent kök hücreler sadece diferansiye oldukları hücrenin şekline dönüşmeye muktedirlerdir. Hal böyle olunca kök hücrenin oligopotent veya unipotent olarak tanımlanması daha doğru olabilir.

Somatik kök hücrelerin çoğalma süresi, embriyonik kök hücrelerden daha uzundur. Bununla birlikte, yetişkin kök hücrelerin pluripotent durumlarına geri programlanması sağlanabilir (Zakrzewski 2019). Bunun için yetişkin çekirdeğin bir oosit sitoplazmasına aktarılması veya pluripotent hücre ile füzyon yolunun kullanılması yeterlidir.

### **Kök Hücrenin Klinik Önemi**

Kök hücrelerin hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine ilişkin bilgilerin ortaya çıkması zaman aldı. Sürecin ilk önemli olayı yaklaşık altmış sene önce somatik hücrenin nukleusunun oosite transfer edilmesiyle kurbağanın başarıyla klonlanmasıdır. Bu başarı sayesinde somatik hücre gelişiminin tamamen geriye doğru çalıştırılabileceği anlaşıldı (Gurdon 1962). Bu deneyin öncesinde hücre farklılaşmasının sadece tek yönlü

ilerlediğine inanıldığı için başarı çok büyük bir bulgu haline geldi. Ayrıca somatik bir hücrenin tekrar pluripotent hale dönüşebileceği de kanıtlandı (Kain 2009).

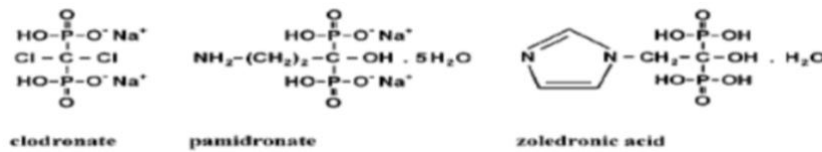
Kök hücrelerin klinikte hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğine ilişkin diğer önemli deney fibroblast DNA' sının subtraksiyonu üzerinden geliştirildi (Davis 1987). Miyoblastlara özel üç adet genin varlığı bilinmektedir. Bu genlerden birisinin fibroblastda miyojenik diferansiyasyon (Myod1) olarak isimlendirilen dönüşümle eksprese edilmesinin sağlanması hücrenin yeniden programlanabileceğini gösterdi ve hücrelerin birbirlerine dönüşümünün mümkün olduğu böylece kanıtlandı.

Kök hücre tedavisinde bir diğer çok önemli aşama multipotent kök hücrelerin yeniden programlamayla pluripotent kök hücre haline dönüşebileceklerinin gösterilmesidir (Takahashi 2013). Emrionik kök hücrelerde eksprese edilen fare fibroblastlarındaki dört transkripsiyon faktörünün (Oct-3/4, Sox2, KLF4, and c-Myc) (Sommer 2010) Retrovirüs ortamında transdüksiyonuyla fibroblastlar pluripotent hale dönüştürüldü. Kök hücrelerin bu yeni formuna indüklenmiş pluripotent kök hücre denilmesi uygundur.

Kısa süre sonra benzer sonuçlar insan hücrelerinde de elde edildi (Shi 2007). Böylece bireyselleştirilmiş insan dokuları ile uyumlu indüklenmiş pluripotent kök hücre yaratma yeni bir araştırma sahası haline geldi. Geline son noktada karsinogenezin azaltılması ve sinir iletim sisteminin geliştirilmesine yönelik çalışmalar artmıştır.

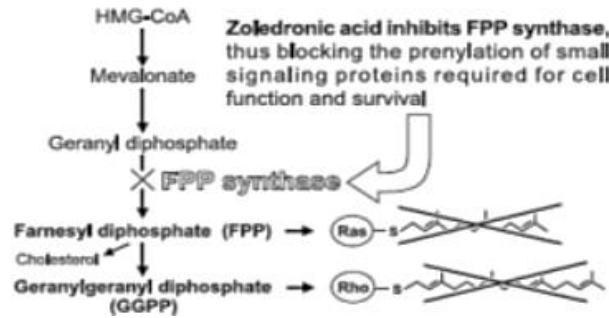
### Zoledronik Asit Nedir?

Bifosfonatlar (P-C-P), merkezi oksijen atomunun bir karbon atomu ile değiştirildiği endojen kemik mineralizasyon regülatörü olan pirofosfatın (P-O-P) metabolik stabil analoglarıdır. Geniş kimyasal araştırmalar sonucu karbon atomuna bağlı çeşitli bileşenlerden oluşan sentetik moleküller üretilmiştir. İlk bulunanlar H, OH, Cl, CH<sub>3</sub> gibi basit bileşenlerden oluşarak nitrojen atomu içermeyen bileşiklerdir. Daha sonra, azot içeren alifatik yan zincirler veya heterosiklik halkalar ile birlikte hidroksil grubu içeren ortak bileşikler gibi daha karmaşık bileşikler üretilmiştir; (Green 2003) (Şekil 2).



Şekil 2. Bifosfonat bileşiklerin kimyasal yapılarının gösterimi

Bifosfonatlar (BP'ler), osteoklastların aktivitesini ve dolayısıyla hayatta kalmasını indirgeyen kemik emiliminin etkili inhibitörlerindedir. Birçok metabolik kemik hastalıkları ve metastatik kemik tümörlerinin tedavisinde kullanılmıştır. Bu tedavilerde BP'lerin var olan tümör hücrelerini inhibe etme, aynı zamanda antitümoral ve antimetastatik etkilerinden de yararlanılmıştır (Yuasa 2007). Farklı yapıdaki BP'lerin ettiği hedefleri de farklı olabilir. Örneğin ikinci ve üçüncü nesil BP'ler olarak bilinen azot içeren BP'ler (N-BP, aminobifosfonatlar), kemik matriksindeki hidroksiapatit kristallerine bağlanarak mevalonat yolağındaki önemli bir enzim olan farnesil pirofosfat sentaz ile etkileşime girerler. Bu etkileşim sonucunda inhibe olan farnesil pirofosfat sentaz, küçük G proteinlerinin protein prenilasyonunu inhibe eder. Bu, osteoklast fonksiyonu için gerekli olan downstream metabolitlerinin kaybına yol açarak apoptozun indüklenmesine ve nihayetinde osteoklastların apoptozuna sebep olur. Osteoklastların aracılık ettiği kemik rezorpsiyonunu inhibe eden bu aminobifosfonatlardan Zoledronik Asit (ZOL), kemik turnover'ını azaltır ve kemik matriksini stabilize eder (Cleazardin 2005) (Şekil 3).



Şekil 3. Zoledronik asit difosfat farnesil enzimini inhibe eder ve küçük GTPaz olan Ras ve Rho prenilasyonuna müdahale eder (HMG-CoA= 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A).

Üçüncü nesil BP'lerden biri olan zoledronik asit (ZOL; IUPAC Name: 1-hydroxy-2-imidazol-1-yl-1-phosphonoethyl phosphonic acid), iki azot atomu içererek en aktif BP formlarından biri olarak osteoporoz, Paget hastalığı ve kanserin indüklediği kemik kaybının tedavisinde kullanılan en etkili ilaç etken maddelerindedir. Bifosfonat tedavisi, osteoklastik aktivitenin inhibisyonu ve ardından apoptozun indüklenmesi ile sonuçlanır. Kemikteki osteoklastlar üzerindeki bu güçlü sitotoksik etkiye rağmen, BP'ler diğer organlar için toksik değildir ve klinik olarak iyi tolere edilirler (Green 2003).

Yapılan *in vitro* alışmalarda, bifosfonat tedavisinin çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki değişen etkileri gösterilmiştir. Bu alışmalar meme ve prostat kanseri hücre hatlarının bifosfonat tedavisinin ardından, mineralize olmamış kemik matrikslerine hücre adezyonunu azalttığını göstermiştir (Boissier 1997).



## Gereç ve Yöntem

### Hücre Kültürü

İnsan prostat kanser hücre hattı DU145 için besiyeri, RPMI 1640 içerisine %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin streptomisin, %1 gentamisin içerecek şekilde hazırlandı. Hücrelerin çözülmesi süreci hücreler -80°C dolabından alınarak direk 37°C su banyosu içerisinde 2 dakika bekletilmesi ile gerçekleştirildi. Ardından besiyeri içerisine aktarılan hücrelerin kriyopotektan solüsyonundan kurtarılması için 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Solüsyon atıldı ve çökelti içerisindeki hücreler besiyeri içerisinde çözülerek T25 flask içerisinde önceden sıcaklığı ve karbondioksit oranı dengelenmiş besiyerine aktarıldı. Hücreler 37°C %5 CO<sub>2</sub> koşullarda sabitlenen inkübatörde büyütüldü. Hücrelerin büyüme ve morfolojileri günlük olarak takip edildi. Hücreler yüzeyi %80 oranında kapladığında %0.05 tripsin ile yüzeyden ayrıldı ve 1000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çökelti içerisinde bulunan hücreler kanser kök hücrelerin izolasyonu için kullanıldı.

### Akış Sitometrisi ile Hücrelerin Eldesi

Akış sitometrisi ile DU145 hücreleri içerisinde kanser kök hücrelerinin ayrılması sağlandı.

DU145 hücreleri *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) yöntemi ile CD133 ve CD44 çift pozitif hücreler (kanser kök hücresi-KKH) ve pozitif olmayan hücreler (NKKH) olacak şekilde ayrıldı. Ayrılma işlemi Becton Dickinson Immunocytometry Systems ile gerçekleştirildi.

Ayrılma işlemi, hücrelerin günlük takip ile flask yüzeyini %80 kapladıktan sonra pasaj işlemi ile başlatıldı. Pasaj sonunda gerçekleştirilen santrifüj işlemi sonrası üst faz uzaklaştırıldı, hücreler 5 ml 1X PBS ile çözüldü ve 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Bu santrifüj ile hücreler besiyeriden uzaklaştırılmış oldu. Hücrelere 3 ml 1X PBS eklendi ve karanlık ortamda CD133 ve CD44 antikorlarından 10'ar mikrolitre eklendi. Hücrelerin bulunduğu tüp alüminyum folyo ile sarıldı, az miktarda vorteks ile karıştırma sonrasında 10-12 dakika +4°C derecede bekletildi. Hücreler 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve 1X PBS içerisinde çözüldü. Hücrelerin tek tek ayrılması için cell strainer kapağından geçirildi ve ışık görmeyecek şekilde akış sitometresi cihazının bulunduğu birime götürüldü. Akış sistemine yükleme yapılmadan önce hücreler kısa vorteks ile kısa karıştırma işlemine maruz bırakıldı. Daha önce belirlenen kapılama ile (Rouhrazi 2018) pozitif ve negatif hücreler elde edildi.

### **Zoledronik Asit Doz Belirlenmesi**

Zoledronik asit (ZOL) 10 mg toz halinde temin edildi. Bu toz 7,35 ml 0,1 M NaOH içerisinde çözüldü ve 500 uM'lık stok elde edildi ve -20°C de saklandı. DU145 KKH ile DU145 NKKH'lerin IC<sub>50</sub> değerleri bir önceki çalışmada tespit edildi (Rouhrazı 2018). Bu kapsamda DU145 KKH'leri 108 uM, DU145 NKKH'leri 96 uM ZOL'e maruz bırakıldı. 2 mL için hazırlanan örnek hesaplama aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

$$\text{DU145 KKH } M1.v1=m2.V2$$

$$500.v1=108.2000$$

$$V1=108.4$$

$$V1=432 \text{ uL ZOL}$$

$$\text{DU145 NKKH } M1.v1 = m2. V2$$

$$500.v1=96.2000$$

$$V1=96.4$$

$$V1=384 \text{ uL ZOL}$$

### **Gerçek Zamanlı PCR**

#### **Total RNA izolasyonu**

Gerçek zamanlı PCR için öncelikli aşama olarak total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyon için SABiosciences-Qiagen, Frederick, MD firmasının Rneasy Mini Kiti kullanıldı ve üreticinin protokolü uygulandı. Sayıları yaklaşık  $1 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde hücreler hazırlandı ve pasaj işlemi sonrası besiyeri uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisine 700 uL QIAzol Liziz solüsyonu eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Kit içerisinde bulunan QIAzol Liziz solüsyonu fenol/guanidin tiyosiyanat hücrelerin parçalanmasını sağladı. Hücrelerin patlaması ve homojenize olması için ara ara vorteks ile karıştırıldı ve 1 mL şırınga ile pipetlendi. Hücreler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi, ardından üzerlerine 140 uL kloroform eklendi ve faz ayrımı için hızlıca sallandı. Hücreler 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler 4°C'de 15 dakika 12,000 x g santrifüj edildi. Bu aşama sonrasına örnekleri i) üstte RNA içeren renksiz sulu faz (hacmi yaklaşık 350 ul); ii) ortada beyaz ara katman (interfaz), ve iii) altta kırmızı organik faz üç faza ayrılmış oldu. Üst faz yeni bir tüpe geçirildi ve üzerine hacminin 1,5 katı %100 etanol eklendi ve pipetleme yapıldı. Elde edilen solüsyon kit içerisinde bulunan 2 mL toplama tüp içerisine aktarıldı ve kolona yerleştirildi. Spin kolon  $\geq 8000$  x g 15 saniye santrifüj edildi. Elüsyon döküldü ve kolona 700 uL Buffer

RWT tamponu eklendi ve 15 saniye  $\geq 8000 \times g$  'de ( $\geq 10,000$  rpm) santrifüj edildi. Kolona 500 uL Buffer RPE yıkama tampon eklendi ve 15 saniye  $\geq 8000 \times g$  'de ( $\geq 10,000$  rpm) santrifüj edilerek yıkandı. Elüsyon atıldı ve yıkama Buffer RPE yıkama tamponu ile tekrarlandı. Elüsyon atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 40 uL nükleaz içermeyen su direk membran üzerine aktarıldı ve 1 dakika  $\geq 8000 \times g$  'de ( $\geq 10,000$  rpm) santrifüj edildi. Böylece total RNA silika membrandan geçirilerek saflaştırıldı. RNA miktarının öğrenilmesi ve saflaşma derecesinin belirlenmesi için bir sonraki adıma geçildi. Maestro Nano Mikro Hacim Spektrofotometre (Maestrogen MN-913, Hsinchu, Taiwan) cihazı ile ölçüldü. OD 260nm/ OD 280nm değeri 2.0 altında çıkan örnekler deneylerde kullanıldı. Örnekler kullanım aşamasına kadar -80°C'de saklandı.

### **cDNA Eldesi**

Total RNA SABiosciences-Qiagen firmasının RT2First Strand Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. PCR işlemi Gene Amp PCR 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA) cihazı ile gerçekleştirildi. RNA miktarı 25 ng ile 5000 ng arasında olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltildi ve 5 dakika 42°C'de bekletildi. İnkübasyon sırasında 4 uL BC3 (5x RT buffer), 1 uL P2 (primerler), 2 uL RE3(RT Enzyme mix) ve 3 uL RNase-free su eklenerek bir örnek için 10 uL'lik karışım hazırlandı ve karışım 15 dakika 42°C'de bekletildi. Sonrasında 95°C 5 dakika bekletildi. En az 1 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra oluşturulan cDNA 91 uL nükleaz içermeyen su eklenerek hemen gerçek zamanlı PCR işlemine geçilecekse buz üzerinde daha sonra çalışma yapılacaksa -20°C'de saklandı.

### **Gerçek Zamanlı PCR aşaması**

Hazırlanan cDNA eşit miktarda 96 kuyucuklu plakalar içerisine yerleştirilmeden önce 100 uL cDNA, 1350 uL Sybr Green içeren RT2 qPCR karışımı (master mix) (SABiosciences) ve 1250 uL distile su ile birleştirildi. Karışım her kuyucuğa 25 uL olacak şekilde dağıtıldı. Örnekler Applied Biosystems ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA) cihazında gerçekleştirildi. Protokol olarak aşağıdaki liste uygulandı. Toplamda adezyon molekülleri ile ilgili olan gen ifadenmesine bakıldı. Data analizi  $\Delta\Delta C_t$  değerlerini elde edebilmek için SABiosciences tescilli online program ile gerçekleştirildi.

Denatürasyon

95°C 10 dakika

Amplifikasyon

60°C 40 saniye

95°C 15 saniye 45 sıklus; Her 72°C de single floresan okuma yapılmalıdır.

72°C 30 saniye

Erime

95°C 60 saniye

65°C 120 saniye 65°C den 95°C ye devamlı floresan okuma yaptırılmalıdır.

95°C 1 saniye

Soğuma

40°C 30 saniye

Çalışma gruplarında gerçek zamanlı PCR aşağıdaki tabloda (Tablo 1) listelenen genler üzerinden yapıldı.

Tablo 1: Gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı PCR ile karşılaştırılmasının yapıldığı gen listesi.

<b>HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ</b>				
<b>Transmembran Moleküller</b>				
CD44	CDH1	HAS1	ICAM1	ITGA1
ITGA2	ITGA3	ITGA4	ITGA5	ITGA6
ITGA7	ITGA8	ITGAL	ITGAM	ITGAV
ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB5
MMP14	MMP15	MMP16	NCAM1	PECAM1
SELE	SELL	SELP	SGCE	SPG7
VCAM1				
<b>Hücre-Hücre Adezyon Molekülleri</b>				
CD44	CDH1	COL11A1	COL14A1	CTNND1
ICAM1	ITGA8	VCAM1		

<b>Hücre-Matriks Adezyon Molekülleri</b>				
ADAMTS13	CD44	ITGA1	ITGA2	ITGA3
ITGA4	ITGA5	ITGA6	ITGA7	ITGA8
ITGAL	ITGAM	ITGAV	ITGB1	ITGB2
ITGB3	ITGB4	ITGB5	SGCE	SPP1
THBS3				
<b>Diğer Adezyon Molekülleri</b>				
CNTN1	COL12A1	COL15A1	COL16A1	COL5A1
COL6A1	COL7A1	COL8A1	VCAN	CTGF
CTNNA1	CTNNB1	CTNND2	FN1	KAL1
LAMA1	LAMA2	LAMA3	LAMB1	LAMB3
LAMC1	THBS1	THBS2	CLEC3B	TNC
VTN				

### **İmmünofloresan Boyama**

İmmünofloresan boyama DU145 KKH ve DU145 NKKH'lerin ZOL uygulamasından sonra farklı ifadelenen SPP1 geninin protein bazındaki farklılığını belirlemek için gerçekleştirildi.

İmmünofloresan boyama için önce hücrelerin büyütülme ve sabitleme aşaması gerçekleştirildi. Hücreler flask yüzeyini %80 kaplamaları ardından pasaj yapıldı. 6 kuyucuklu plaka içerisine her bir kuyuya üç adet 15 mm lamel konuldu ve dört hücre grubu lameller üzerine ekildi. Hücreler  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde seyretildi ve her bir kuyucuğa 2 ml hücre eklendi. 24 saat sonra ZOL maruziyeti için besiyeri ZOL içeren besiyeri ile değiştirildi. Kontrol gruplarının ise besiyeri değişimi gerçekleştirildi. Hücreler 72 saat sonrasında 1X PBS ile bir kez yıkandıktan sonra 30 dakika %4 paraformaldehit ile sabitlendi ve üç kez 1X PBS ile yıkandı. Boyama işlemi bu işlemin ardından gerçekleştirilmeyecekse hücreler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Boyama işlemi için sırasıyla bloklama, primer antikor, sekonder antikor ve kapama işlemi yapıldı. Bloklama aşaması için hücreler 1X PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik BSA içerisinde bir saat bekletildi. Primer antikor aşaması için SPP1 antikorunu 1/200 oranında 1X PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik BSA içerisinde seyreltildi ve hücreler +4°C bir gece primer antikora maruz bırakıldı. Sonraki gün hücreler 1X PBS ile üç kez yıkandı ve 1/400 oranında 1X PBS içerisinde hazırlanmış %1'lik BSA içerisinde seyreltilmiş sekonder antikor içerisinde oda sıcaklığında bir saat bekletildi. Sekonder antikor aşaması ve sonrası karanlık ortamda gerçekleştirildi. Hücreler 1X PBS içerisinde üç kez yıkandı. Lam üzerinde DAPI içeren kapama solüsyonu damlatıldı ve hücrelerin üzerinde tutunduğu lamel hücreler lam ve lamel arada kalacak şekilde kapatıldı. Hazırlanan örnek +4°C'de görüntülenene kadar bekletildi. Görüntüleme Olympus BX-51 ve Olympus C-5050 dijital kamera, Tokyo, Japan cihazında Olympus cellSens Entry programı ile gerçekleştirildi.

#### **Akış Sitometri Analizi**

Akış sitometrisi ile CD44 analizi DU145 KKH ve DU145 NKKH'lerin ZOL uygulamasından sonra farklı ifadelenen CD44 geninin protein bazındaki farklılığını belirlemek için gerçekleştirildi.

DU145 KKH ve DU145 NKKH'leri T25 flask içerisinde büyütüldü ve yüzey %80 oranında kaplandığında besi yeri IC<sub>50</sub> değerinde ZOL içeren besiyeri ile değiştirildi. Kontrol gruplarının ise besiyeri değiştirildi. 72 saat sonrasında hücreler %0.05 tripsin ile yüzeyden ayrıldı ve 1000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çökelti içerisinde bulunan hücreler kanser kök hücresi izolasyonunda belirtildiği gibi önce 1X PBS ile yıkandı, sonrasında 1X PBS içerisine CD44 antikorunu eklendi ve +4°C'de karanlıkta 10-12 dakika bekletildi. Santrifüj sonrasında hücreler 1X PBS içerisinde çözüldü ve tek tek düşmeleri için cell strainer kapağından geçirildi ve cihazın bulunduğu analiz birimine götürüldü. CD133 ve CD44 kapılamalarına dayanarak analiz sadece CD44 kapılamasına göre yapıldı.

## Bulgular

### Adezyon Molekülleri ve İlişkili Genlerin Oluşturulan 4 Hücre Grubundaki Gerçek Zamanlı PCR sonuçları

DU145 hücre hattı CD133 ve CD44 proteinlerine özel antikorlar ile etiketlendikten sonra akış sitometrisi ile ayrıldı ve her iki hücre için pozitif olan hücreler DU145 KKH, diğerleri DU145 NKKH'ler olarak isimlendirildi. Bu hücre gruplarına belirlenen ZOL için IC50 değerleri uygulanmış ve adezyon moleküllerine özgü gen ekspresyon seviyelerine bakıldı.

Ekspresyon düzeyi katsayı olarak 2 ve üzeri olan genler anlamlı olarak değerlendirildi (Tablo 2). Bu iki hücre hattı birbirleriyle ZOL tedavisi altında ve ZOL tedavisi altında olmadıkları durumda karşılaştırıldı (Tablo 3-8).

Tablo 2: DU145 KKH ZOL'e karşı DU145 NKKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Sembol	Kat değişimi DU145 KKH ZOL'e karşı DU145 NKKH Z	Log DU145 KKH ZOL'e karşı DU145 NKKH ZOL	Mutlak değer kat değişimi DU145 KKH ZOL'e karşı DU145 NKKH ZOL	Regülasyon DU145 KKH ZOL'e karşı DU145 NKKH ZOL
PECAM1	1,6366549	0,7107501	1,6366549	yukarı
ADAMTS13	-1,1276932	-0,17337465	1,1276932	aşağı
VTN	-1,4418772	-0,5279484	1,4418772	aşağı
NCAM1	1,0110457	0,01584816	1,0110457	yukarı
NCAM1	-1,3512099	-0,4342518	1,3512099	aşağı
CD44	-1,4850719	-0,5705328	1,4850719	aşağı
ADAMTS1	-2,0214224	-1,0153708	2,0214224	aşağı
THBS3	-1,3472811	-0,43005085	1,3472811	aşağı
TGFBI	2,1030762	1,0725012	2,1030762	yukarı
COL11A1	-1,0086201	-0,012382984	1,0086201	aşağı
COL11A1	1,0158852	0,022737503	1,0158852	yukarı
MMP10	1,2435747	0,31449318	1,2435747	yukarı
SPG7	1,3527154	0,43585825	1,3527154	yukarı
SPG7	1,2245414	0,29224157	1,2245414	yukarı
SELP	1,1662496	0,22187662	1,1662496	yukarı

VCAM1	-1,0305065	-0,043353558	1,0305065	aşağı
ECM1	-1,4345146	-0,52056265	1,4345146	aşağı
CTNNA1	1,1768847	0,23497295	1,1768847	yukarı
KAL1	-1,3736836	-0,45804977	1,3736836	aşağı
COL11A1	-1,0383323	-0,05426836	1,0383323	aşağı
SGCE	-1,0814518	-0,1129694	1,0814518	aşağı
ITGB5	1,147674	0,19871283	1,147674	yukarı
ITGA8	1,0121386	0,01740694	1,0121386	yukarı
ITGB2	-1,1891234	-0,24989843	1,1891234	aşağı
MMP12	1,132588	0,17962313	1,132588	yukarı
ITGB4	1,6614307	0,73242617	1,6614307	yukarı
ITGB4	1,0158077	0,022627354	1,0158077	yukarı
SPP1	-8,35988	-3,0634823	8,35988	aşağı
MMP16	1,0748662	0,10415697	1,0748662	yukarı
LAMB3	3,3224628	1,7322531	3,3224628	yukarı
LAMB3	1,4087427	0,49440813	1,4087427	yukarı
ITGB1	-1,4482286	-0,53428936	1,4482286	aşağı
CTNND1	1,4838581	0,5693531	1,4838581	yukarı
ITGA6	-1,3772528	-0,46179342	1,3772528	aşağı
MMP7	-1,5048997	-0,5896673	1,5048997	aşağı
MMP7	-1,6409708	-0,71454954	1,6409708	aşağı
MMP13	-1,1841319	-0,24382973	1,1841319	aşağı
SPARC	1,2192239	0,28596306	1,2192239	yukarı
COL15A1	1,0052677	0,007579804	1,0052677	yukarı
COL12A1	1,315533	0,39564753	1,315533	yukarı
MMP16	1,4140294	0,49981213	1,4140294	yukarı
COL6A2	-1,2050098	-0,26904488	1,2050098	aşağı
COL6A2	1,4764743	0,5621562	1,4764743	yukarı
ITGAM	1,015973	0,022861958	1,015973	yukarı
CTGF	-1,0326763	-0,04638815	1,0326763	aşağı
COL6A2	1,0013683	0,001972675	1,0013683	yukarı
THBS1	1,1642689	0,21942425	1,1642689	yukarı

CLEC3B	1,1490756	0,20047379	1,1490756	yukarı
LAMA1	1,0025108	0,003617764	1,0025108	yukarı
MMP12	1,0100232	0,014388561	1,0100232	yukarı
COL12A1	-1,1335343	-0,1808281	1,1335343	aşağı
CTNNB1	1,0375667	0,05320406	1,0375667	yukarı
MMP8	-1,1505414	-0,20231295	1,1505414	aşağı
MMP11	-1,2657446	-0,33998632	1,2657446	aşağı
MMP16	-1,0197725	-0,028247356	1,0197725	aşağı
MMP1	1,71259	0,7761798	1,71259	yukarı
ITGB4	-1,154776	-0,20761299	1,154776	aşağı
HAS1	1,0193042	0,027584553	1,0193042	yukarı
TIMP2	1,6293672	0,70431185	1,6293672	yukarı
ITGB1	1,5479984	0,630404	1,5479984	yukarı
ITGB1	1,0168339	0,024084091	1,0168339	yukarı
MMP3	1,0670582	0,0936389	1,0670582	yukarı
CTGF	1,0077864	0,011189938	1,0077864	yukarı
ITGA5	-1,2155896	-0,28165627	1,2155896	aşağı
SELE	-1,2045152	-0,26845264	1,2045152	aşağı
SELE	1,2059903	0,27021837	1,2059903	yukarı
ITGB5	1,017236	0,024654388	1,017236	yukarı
ITGB1	1,3664645	0,45044804	1,3664645	yukarı
SPP1	-4,1093655	-2,0389156	4,1093655	aşağı
FN1	-1,1881989	-0,24877644	1,1881989	aşağı
LAMB3	-1,1837143	-0,24332094	1,1837143	aşağı
CTNND1	1,5875037	0,66675997	1,5875037	yukarı
ADAMTS8	1,0260712	0,037130833	1,0260712	yukarı
TIMP1	1,151917	0,20403671	1,151917	yukarı
ITGA1	-1,1398754	-0,18887615	1,1398754	aşağı
CTNNB1	-1,4474299	-0,5334935	1,4474299	aşağı
CTNNB1	1,2338128	0,30312347	1,2338128	yukarı
CTNNB1	1,2228334	0,2902279	1,2228334	yukarı
CD44	1,0173062	0,024754047	1,0173062	yukarı

ITGA6	-1,4977908	-0,58283615	1,4977908	aşağı
ITGA6	1,036781	0,05211115	1,036781	yukarı
VCAN	1,3772551	0,4617958	1,3772551	yukarı
FN1	-1,1594157	-0,21339798	1,1594157	aşağı
ADAMTS13	1,032636	0,046331882	1,032636	yukarı
ADAMTS13	-1,0218357	-0,031163216	1,0218357	aşağı
ITGA2	-1,211267	-0,2765169	1,211267	aşağı
CDH1	1,2468776	0,3183198	1,2468776	yukarı
SPG7	1,2348102	0,30428934	1,2348102	yukarı
ITGB3	-1,2169379	-0,28325558	1,2169379	aşağı
ITGB1	-1,2346755	-0,30413198	1,2346755	aşağı
COL11A1	-1,1614151	-0,21588373	1,1614151	aşağı
CTNNB1	1,38876	0,47379732	1,38876	yukarı
LAMA3	1,1181204	0,16107559	1,1181204	yukarı
COL14A1	-1,4270164	-0,5130019	1,4270164	aşağı
ITGB2	-1,0441236	-0,062292576	1,0441236	aşağı
ITGAL	1,3825845	0,46736765	1,3825845	yukarı
ITGA3	1,2545686	0,32719135	1,2545686	yukarı
ITGA3	1,0303236	0,043097496	1,0303236	yukarı
ICAM1	1,6252446	0,7006569	1,6252446	yukarı
LAMA3	-1,4561616	-0,5421705	1,4561616	aşağı
LAMA3	1,2261744	0,29416418	1,2261744	yukarı
LAMC1	-1,9870987	-0,9906635	1,9870987	aşağı
NCAM1	-1,651912	-0,7241368	1,651912	aşağı
TNC	1,0981994	0,13513994	1,0981994	yukarı
TNC	1,1965092	0,2588315	1,1965092	yukarı
COL8A1	1,1604133	0,21463871	1,1604133	yukarı
COL8A1	1,2320633	0,3010764	1,2320633	yukarı
COL7A1	1,0555524	0,07799816	1,0555524	yukarı
COL1A1	1,0563526	0,07909155	1,0563526	yukarı
COL8A1	-1,0299801	-0,042616367	1,0299801	aşağı
CTNNB1	1,0103749	0,014890671	1,0103749	yukarı

NCAM1	1,1350887	0,18280506	1,1350887	yukarı
CNTN1	-1,230828	-0,2996292	1,230828	aşağı
MMP14	-1,0413125	-0,058403015	1,0413125	aşağı
CTNND2	-1,0626496	-0,087666035	1,0626496	aşağı
MMP2	1,0116019	0,016641617	1,0116019	yukarı
ITGB5	-1,0459906	-0,06486988	1,0459906	aşağı
ITGB5	-2,359071	-1,2382188	2,359071	aşağı
ITGB5	-2,1594186	-1,1106429	2,1594186	aşağı
CNTN1	-1,0002112	-3,05E-04	1,0002112	aşağı
TIMP2	-1,1797335	-0,23846102	1,1797335	aşağı
VCAM1	-1,1571199	-0,21053839	1,1571199	aşağı
VCAM1	1,0960733	0,13234425	1,0960733	yukarı
LOC728044	1,2278425	0,2961254	1,2278425	yukarı
CTNNB1	1,1943601	0,25623798	1,1943601	yukarı
MMP9	1,2077363	0,2723055	1,2077363	yukarı
ITGB1	-1,3346478	-0,41645908	1,3346478	aşağı
CTNND1	1,2216207	0,28879642	1,2216207	yukarı
SELL	1,1702894	0,22686529	1,1702894	yukarı
ITGA4	-1,015062	-0,021567822	1,015062	aşağı
CD44	-1,1586426	-0,21243572	1,1586426	aşağı
TIMP3	-1,3828975	-0,46769428	1,3828975	aşağı
LAMA3	-1,0029911	-0,004308701	1,0029911	aşağı
ITGAV	-1,6595181	-0,7307644	1,6595181	aşağı
LAMB1	-1,9783671	-0,98431015	1,9783671	aşağı
LAMB1	-1,5079359	-0,5925751	1,5079359	aşağı
TIMP2	-1,8775268	-0,9088335	1,8775268	aşağı
LAMA1	1,1447016	0,19497156	1,1447016	yukarı
LAMA1	1,0355124	0,050344944	1,0355124	yukarı
CTNNA1	-1,6622151	-0,7331071	1,6622151	aşağı
COL4A2	1,2333179	0,3025446	1,2333179	yukarı
ITGA7	-1,1678438	-0,22384739	1,1678438	aşağı
ITGB4	1,0798938	0,110889435	1,0798938	yukarı

CTNND1	1,0597059	0,08366394	1,0597059	yukarı
THBS2	-1,0088716	-0,012742519	1,0088716	aşağı
ECM1	-1,4250039	-0,5109658	1,4250039	aşağı
LAMA2	-1,1774939	-0,23571968	1,1774939	aşağı
MMP15	1,0276738	0,039382458	1,0276738	yukarı
COL16A1	1,2021604	0,2656293	1,2021604	yukarı
FN1	-1,2002931	-0,26338673	1,2002931	aşağı
LAMA2	-1,1726074	-0,22972012	1,1726074	aşağı
COL6A1	-1,0452086	-0,0637908	1,0452086	aşağı
COL5A1	-1,1233051	-0,16774988	1,1233051	aşağı

Tablo 3: DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH'lerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Sembol	Kat değişimi DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH	Log DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH	Mutlak değer kat değişimi DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH	Regülasyon DU145 KKH'lerine karşı DU NKKH
PECAM1	-1,0201329	-0,028757095	1,0201329	aşağı
ADAMTS13	-1,0276371	-0,03933096	1,0276371	aşağı
VTN	1,1849431	0,24481773	1,1849431	yukarı
NCAM1	-1,056683	-0,07954264	1,056683	aşağı
NCAM1	-1,0480853	-0,067756176	1,0480853	aşağı
CD44	2,5297437	1,3389912	2,5297437	yukarı
ADAMTS1	-1,4568958	-0,5428977	1,4568958	aşağı
THBS3	1,0185498	0,026516438	1,0185498	yukarı
TGFBI	-1,0994116	-0,13673162	1,0994116	aşağı
COL11A1	1,0031826	0,004584312	1,0031826	yukarı
COL11A1	1,0082072	0,011792183	1,0082072	yukarı
MMP10	1,0094566	0,013578892	1,0094566	yukarı
SPG7	-1,1563622	-0,2095933	1,1563622	aşağı
SPG7	-1,1674093	-0,22331047	1,1674093	aşağı
SELP	1,0492662	0,06938076	1,0492662	yukarı
VCAM1	-1,2043854	-0,2682972	1,2043854	aşağı

ECM1	-1,019389	-0,027704716	1,019389	aşağı
CTNNA1	-1,4893878	-0,5747194	1,4893878	aşağı
KAL1	1,4383131	0,5243778	1,4383131	yukarı
COL11A1	-1,383501	-0,4683237	1,383501	aşağı
SGCE	-1,0568765	-0,079806805	1,0568765	aşağı
ITGB5	1,007242	0,010410309	1,007242	yukarı
ITGA8	1,2251151	0,29291725	1,2251151	yukarı
ITGB2	-1,067344	-0,094025135	1,067344	aşağı
MMP12	1,1618755	0,21645546	1,1618755	yukarı
ITGB4	-1,1398253	-0,18881273	1,1398253	aşağı
ITGB4	-1,0128374	-0,018402576	1,0128374	aşağı
SPP1	1,0472293	0,066577435	1,0472293	yukarı
MMP16	-1,4464161	-0,5324826	1,4464161	aşağı
LAMB3	-1,1301869	-0,17656136	1,1301869	aşağı
LAMB3	-1,3375319	-0,4195733	1,3375319	aşağı
ITGB1	1,6944169	0,7607889	1,6944169	yukarı
CTNND1	1,0294805	0,04191637	1,0294805	yukarı
ITGA6	-1,1605985	-0,21486902	1,1605985	aşağı
MMP7	-1,171381	-0,22821045	1,171381	aşağı
MMP7	-1,282138	-0,3585515	1,282138	aşağı
MMP13	1,1321266	0,17903519	1,1321266	yukarı
SPARC	-1,1446377	-0,19489098	1,1446377	aşağı
COL15A1	1,1481353	0,19929266	1,1481353	yukarı
COL12A1	-1,1581595	-0,21183395	1,1581595	aşağı
MMP16	-1,1450213	-0,19537449	1,1450213	aşağı
COL6A2	1,0050764	0,007305145	1,0050764	yukarı
COL6A2	1,0324842	0,04611969	1,0324842	yukarı
ITGAM	-1,1387645	-0,18746948	1,1387645	aşağı
CTGF	1,185587	0,24560165	1,185587	yukarı
COL6A2	1,1265849	0,17195606	1,1265849	yukarı
THBS1	1,5956928	0,6741829	1,5956928	yukarı
CLEC3B	1,069795	0,097334385	1,069795	yukarı

LAMA1	1,3961047	0,48140717	1,3961047	yukarı
MMP12	1,0206516	0,02949047	1,0206516	yukarı
COL12A1	-1,0407757	-0,05765915	1,0407757	aşağı
CTNNB1	-1,0089163	-0,012806416	1,0089163	aşağı
MMP8	1,2067606	0,27113962	1,2067606	yukarı
MMP11	1,032778	0,046530247	1,032778	yukarı
MMP16	-1,5950658	-0,67361593	1,5950658	aşağı
MMP1	-1,1585757	-0,21235228	1,1585757	aşağı
ITGB4	-1,0182848	-0,026141167	1,0182848	aşağı
HAS1	-1,6642728	-0,7348919	1,6642728	aşağı
TIMP2	-1,002049	-0,002953053	1,002049	aşağı
ITGB1	1,3008105	0,37941074	1,3008105	yukarı
ITGB1	1,0072397	0,010406971	1,0072397	yukarı
MMP3	-1,1303188	-0,17672968	1,1303188	aşağı
CTGF	-1,041013	-0,057988167	1,041013	aşağı
ITGA5	-1,0628674	-0,087961674	1,0628674	aşağı
SELE	1,005869	0,008442402	1,005869	yukarı
SELE	1,1750971	0,23277998	1,1750971	yukarı
ITGB5	-1,2247471	-0,2924838	1,2247471	aşağı
ITGB1	1,1307997	0,17734337	1,1307997	yukarı
SPP1	-1,1947672	-0,2567296	1,1947672	aşağı
FN1	1,0036038	0,005189896	1,0036038	yukarı
LAMB3	1,0443715	0,062634945	1,0443715	yukarı
CTNND1	1,2066889	0,2710538	1,2066889	yukarı
ADAMTS8	1,0451968	0,063774586	1,0451968	yukarı
TIMP1	-1,1763772	-0,23435068	1,1763772	aşağı
ITGA1	1,3428274	0,4252739	1,3428274	yukarı
CTNNB1	-1,3978524	-0,483212	1,3978524	aşağı
CTNNB1	1,1350899	0,18280649	1,1350899	yukarı
CTNNB1	1,0133504	0,019133091	1,0133504	yukarı
CD44	1,1548519	0,20770788	1,1548519	yukarı
ITGA6	1,3812289	0,4659524	1,3812289	yukarı

ITGA6	-1,0444564	-0,06275225	1,0444564	aşağı
VCAN	1,431096	0,51712036	1,431096	yukarı
FN1	-1,177378	-0,23557758	1,177378	aşağı
ADAMTS13	1,3554444	0,438766	1,3554444	yukarı
ADAMTS13	-1,0751312	-0,10451269	1,0751312	aşağı
ITGA2	1,176231	0,23417139	1,176231	yukarı
CDH1	1,0429944	0,06073141	1,0429944	yukarı
SPG7	-1,1457361	-0,19627476	1,1457361	aşağı
ITGB3	-1,0081636	-0,011729717	1,0081636	aşağı
ITGB1	1,1674714	0,22338724	1,1674714	yukarı
COL11A1	1,2145487	0,2804203	1,2145487	yukarı
CTNNB1	1,1574707	0,21097565	1,1574707	yukarı
LAMA3	-1,2080122	-0,27263498	1,2080122	aşağı
COL14A1	1,2629414	0,3367877	1,2629414	yukarı
ITGB2	1,0638655	0,08931589	1,0638655	yukarı
ITGAL	-1,1920649	-0,2534628	1,1920649	aşağı
ITGA3	-1,1307697	-0,17730522	1,1307697	aşağı
ITGA3	-1,0443642	-0,06262493	1,0443642	aşağı
ICAM1	-1,0416987	-0,058938026	1,0416987	aşağı
LAMA3	1,0248754	0,03544855	1,0248754	yukarı
LAMA3	1,1550298	0,20793009	1,1550298	yukarı
LAMC1	1,7732835	0,82642317	1,7732835	yukarı
NCAM1	-1,1468132	-0,1976304	1,1468132	aşağı
TNC	1,1736225	0,23096848	1,1736225	yukarı
TNC	-1,0874261	-0,12091732	1,0874261	aşağı
COL8A1	-1,1614339	-0,2159071	1,1614339	aşağı
COL8A1	1,0454428	0,064114094	1,0454428	yukarı
COL7A1	-1,0282922	-0,0402503	1,0282922	aşağı
COL1A1	-1,1275605	-0,1732049	1,1275605	aşağı
COL8A1	1,0076638	0,011014462	1,0076638	yukarı
CTNNB1	-1,021471	-0,030648232	1,021471	aşağı
NCAM1	1,2081591	0,27281046	1,2081591	yukarı

CNTN1	-1,0073591	-0,010578156	1,0073591	aşağı
MMP14	-1,0372101	-0,05270815	1,0372101	aşağı
CTNND2	1,1494354	0,20092535	1,1494354	yukarı
MMP2	1,199925	0,26294422	1,199925	yukarı
ITGB5	1,1684357	0,22457838	1,1684357	yukarı
ITGB5	1,146458	0,19718361	1,146458	yukarı
ITGB5	1,3800894	0,46476173	1,3800894	yukarı
CNTN1	-1,0247128	-0,03521967	1,0247128	aşağı
TIMP2	-1,1612405	-0,21566677	1,1612405	aşağı
VCAM1	-1,1987299	-0,26150656	1,1987299	aşağı
VCAM1	-1,4452567	-0,5313258	1,4452567	aşağı
LOC728044	1,0376518	0,053322315	1,0376518	yukarı
CTNNB1	1,2215085	0,28866386	1,2215085	yukarı
MMP9	-1,1663811	-0,22203922	1,1663811	aşağı
ITGB1	2,3963664	1,2608485	2,3963664	yukarı
CTNND1	1,0028508	0,004106998	1,0028508	yukarı
SELL	1,0790585	0,10977316	1,0790585	yukarı
ITGA4	1,0355861	0,050447464	1,0355861	yukarı
CD44	1,6990913	0,76476336	1,6990913	yukarı
TIMP3	1,190628	0,2517228	1,190628	yukarı
LAMA3	1,3614492	0,44514322	1,3614492	yukarı
ITGAV	1,2575086	0,3305683	1,2575086	yukarı
LAMB1	-1,0795926	-0,110486984	1,0795926	aşağı
LAMB1	1,0082768	0,011891842	1,0082768	yukarı
TIMP2	1,0464494	0,06550264	1,0464494	yukarı
LAMA1	1,1560996	0,20926571	1,1560996	yukarı
LAMA1	-1,3601742	-0,4437914	1,3601742	aşağı
CTNNA1	1,2557825	0,32858658	1,2557825	yukarı
COL4A2	-1,1687795	-0,22500277	1,1687795	aşağı
ITGA7	1,0019437	0,002801418	1,0019437	yukarı
ITGB4	-1,2122643	-0,27770424	1,2122643	aşağı
CTNND1	-1,0294076	-0,041814327	1,0294076	aşağı

THBS2	-1,146869	-0,1977005	1,146869	aşağı
ECM1	-1,2105638	-0,2756791	1,2105638	aşağı
LAMA2	-1,654817	-0,7266717	1,654817	aşağı
MMP15	-1,0466988	-0,06584644	1,0466988	aşağı
COL16A1	-1,2017182	-0,26509857	1,2017182	aşağı
FN1	1,0123999	0,01777935	1,0123999	yukarı
LAMA2	1,1136286	0,15526819	1,1136286	yukarı
COL6A1	-1,0299017	-0,042506695	1,0299017	aşağı
COL5A1	-1,071119	-0,09911871	1,071119	aşağı

Tablo 4: DU145 KKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Sembol	Kat değişimi DU145 KKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL	Log DU145 KKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL	Mutlak değer kat değişimi DU145 KKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL	Regülasyon DU145 KKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL
CD44	6,351967	2,6672034	6,351967	yukarı
ITGB1	3,8517108	1,9454994	3,8517108	yukarı
CD44	1,7014443	0,7667599	1,7014443	yukarı
LAMC1	2,2318099	1,1582141	2,2318099	yukarı
ITGB1	2,0894763	1,0631413	2,0894763	yukarı
ITGAV	1,8926727	0,92042494	1,8926727	yukarı
CTNNA1	1,6624684	0,7333269	1,6624684	yukarı
SPP1	-4,1729774	-2,061077	4,1729774	aşağı
LAMB3	-2,7870002	-1,478713	2,7870002	aşağı
SPP1	-3,3568287	-1,7470989	3,3568287	aşağı
ITGA3	-1,594505	-0,6731086	1,594505	aşağı

Tablo 5: DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Sembol	Kat değişimi DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL	Log DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL	Mutlak değer kat değişimi DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL	Regülasyon DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL
--------	---	--	---	--

THBS3	-1,5644925	-0,64569473	1,5644925	aşağı
SGCE	-1,5808153	-0,66066885	1,5808153	aşağı
SPP1	-51,858116	-5,696498	51,858116	aşağı
MMP7	-1,6251464	-0,7005696	1,6251464	aşağı
SPP1	-21,043764	-4,395321	21,043764	aşağı
ITGB5	-1,5935234	-0,67222023	1,5935234	aşağı
LAMB1	-2,325844	-1,2177544	2,325844	aşağı
LAMB1	-1,8953626	-0,9224739	1,8953626	aşağı
TIMP2	-2,372412	-1,2463546	2,372412	aşağı
CD44	3,6768649	1,8784761	3,6768649	yukarı
TGFBI	2,5578916	1,3549552	2,5578916	yukarı
ITGB1	2,4063773	1,2668629	2,4063773	yukarı
CD44	1,7406076	0,79959106	1,7406076	yukarı

Tablo 6: DU145 NKKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

Sembol	Kat değişimi DU145 NKKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL	Log DU145 NKKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL	Mutlak değer kat değişimi DU145 NKKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL	Regülasyon DU145 NKKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL
SPP1	-4,372087	-2,1283221	4,372087	aşağı
LAMB3	-2,3604367	-1,2390537	2,3604367	aşağı
CTNND1	-1,5224212	-0,6063676	1,5224212	aşağı
ITGB1	-1,9425055	-0,95791864	1,9425055	aşağı
SPP1	-3,1332352	-1,6476531	3,1332352	aşağı
CTNNB1	-1,5260727	-0,6098237	1,5260727	aşağı
CD44	1,9125403	0,93549013	1,9125403	yukarı
ITGB1	2,1122537	1,078783	2,1122537	yukarı

Tablo 7: DU145 NKKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL hücrelerinde adezyon molekülleri ve ilişkin genlerin ekspresyon kat değişimleri

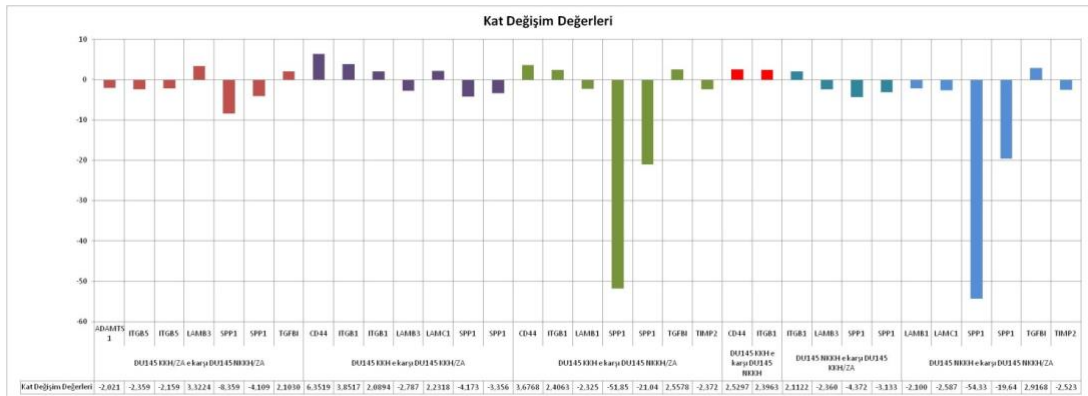
Sembol	Kat değişimi DU145	Log DU145 NKKH'lerine karşı	Mutlak değer kat değişimi	Regülasyon DU145
--------	-----------------------	--------------------------------	------------------------------	---------------------

	NKKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL	DU145 NKKH ZOL	DU145 NKKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL	NKKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL
THBS3	-1,5919489	-0,670794	1,5919489	aşağı
SPP1	-54,332478	-5,763743	54,332478	aşağı
MMP7	-1,5642438	-0,6454654	1,5642438	aşağı
SPP1	-19,64207	-4,295875	19,64207	aşağı
LAMC1	-2,587532	-1,3715768	2,587532	aşağı
ITGB5	-1,8911313	-0,91924953	1,8911313	aşağı
ITGB5	-1,8344307	-0,87533236	1,8344307	aşağı
ITGB1	-1,9595895	-0,9705515	1,9595895	aşağı
LAMB1	-2,100192	-1,0705214	2,100192	aşağı
LAMB1	-1,9162633	-0,93829584	1,9162633	aşağı
TIMP2	-2,5237732	-1,3355823	2,5237732	aşağı
CTNNA1	-1,5947142	-0,6732979	1,5947142	aşağı
TGFBI	2,9168365	1,5444045	2,9168365	yukarı
CTNNA1	1,5391198	0,6221056	1,5391198	yukarı
LAMB3	1,5358163	0,6190057	1,5358163	yukarı

Tablo 8: Ekspresyon katsayı düzeyi 2 üzeri olan gen listeleri. Dört farklı hücre grubu birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

Grup Karşılaştırılması	Sembol	Kat Değişim Değerleri
<b>DU145 KKH ZOL'e karşı DU145 NKKH ZOL</b>	ADAMTS1	-2,0214224
	ITGB5	-2,359071
	ITGB5	-2,1594186
	LAMB3	3,3224628
	SPP1	-8,35988
	SPP1	-4,1093655
	TGFBI	2,1030762
<b>DU145 KKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL</b>	CD44	6,351967
	ITGB1	3,8517108

	ITGB1	2,0894763
	LAMB3	-2,7870002
	LAMC1	2,2318099
	SPP1	-4,1729774
	SPP1	-3,3568287
<b>DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL</b>	CD44	3,6768649
	ITGB1	2,4063773
	LAMB1	-2,325844
	SPP1	-51,858116
	SPP1	-21,043764
	TGFBI	2,5578916
	TIMP2	-2,372412
<b>DU145 KKH'lerine karşı DU145 NKKH</b>	CD44	2,5297437
	ITGB1	2,3963664
<b>DU145 NKKH'lerine karşı DU145 KKH ZOL</b>	ITGB1	2,1122537
	LAMB3	-2,3604367
	SPP1	-4,372087
	SPP1	-3,1332352
<b>DU145 NKKH'lerine karşı DU145 NKKH ZOL</b>	LAMB1	-2,100192
	LAMC1	-2,587532
	SPP1	-54,332478
	SPP1	-19,64207
	TGFBI	2,9168365
	TIMP2	-2,5237732



Şekil 4: Hücre grupları karşılaştırılmasında anlamlı çıkan genlerin grafiksel gösterimi.

Sonuçlara göre üç farklı grupta belirgin şekilde SPP1 geni farklı ifadelenmiştir. Ayrıca yine 3 farklı grup karşılaştırılmasında CD44 geni ifadelenmesi farklı belirgin olarak görülmüştür.

Anlamlı çıkan genlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir.

- **CD44**: Homo sapiens CD44 molecule (Indian blood group) (CD44), transcript variant 4, mRNA.
- **ITGB1**: Homo sapiens integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), transcript variant 1A, mRNA.
- **LAMB3**: Homo sapiens laminin, beta 3 (LAMB3), transcript variant 1, mRNA.
- **LAMC1**: Homo sapiens laminin, gamma 1 (formerly LAMB2) (LAMC1), mRNA.
- **SPP1**: Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (SPP1), transcript variant 2, mRNA.
- **LAMB1**: Homo sapiens laminin, beta 1 (LAMB1), mRNA.
- **TGFBI**: Homo sapiens transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFBI), mRNA.
- **TIMP2**: PREDICTED: Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2), mRNA.
- **ADAMTS1**: Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 (ADAMTS1), mRNA.
- **ITGB5**: PREDICTED: Homo sapiens integrin, beta 5, transcript variant 3 (ITGB5), mRNA.

Gerçek zamanlı PCR'a göre SPP1 gen ekspresyonu;

\*DU 145 KKH ile benzer DU 145 NKKH

\*DU 145 KKH < DU 145 KKH ZOL

\* DU 145 KKH ZOL <DU 145 NKKH

\*DU 145 NKKH <DU 145 NKKH ZOL

Gerçek zamanlı PCR'a göre CD44 gen ekspresyonu;

\*DU 145 KKH >DU 145 NKKH

\*DU 145 KKH > DU 145 KKH ZOL

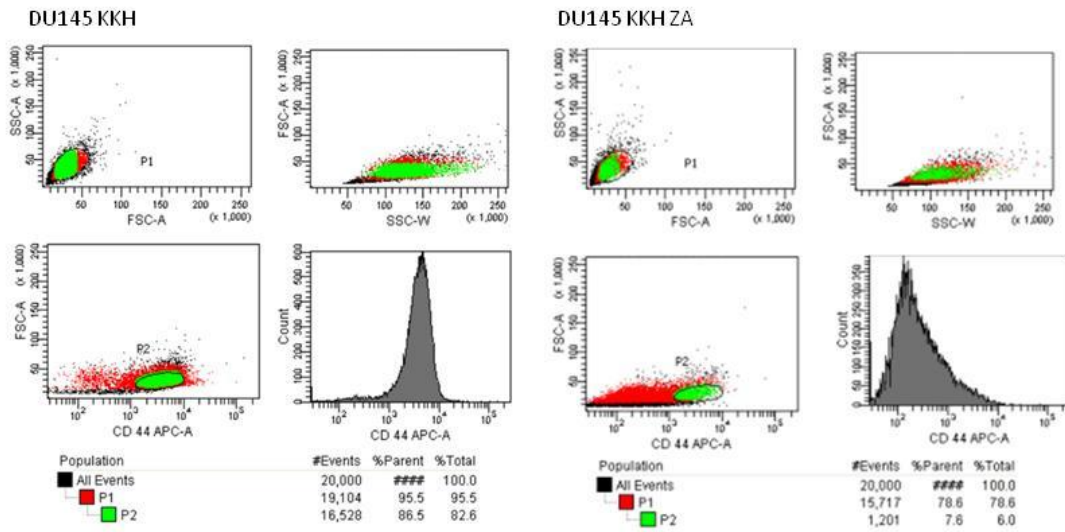
\*DU 145 KKH ZOL ile benzer DU 145 NKKH ZOL

\*DU 145 NKKH ile benzer DU 145 NKKH ZOL

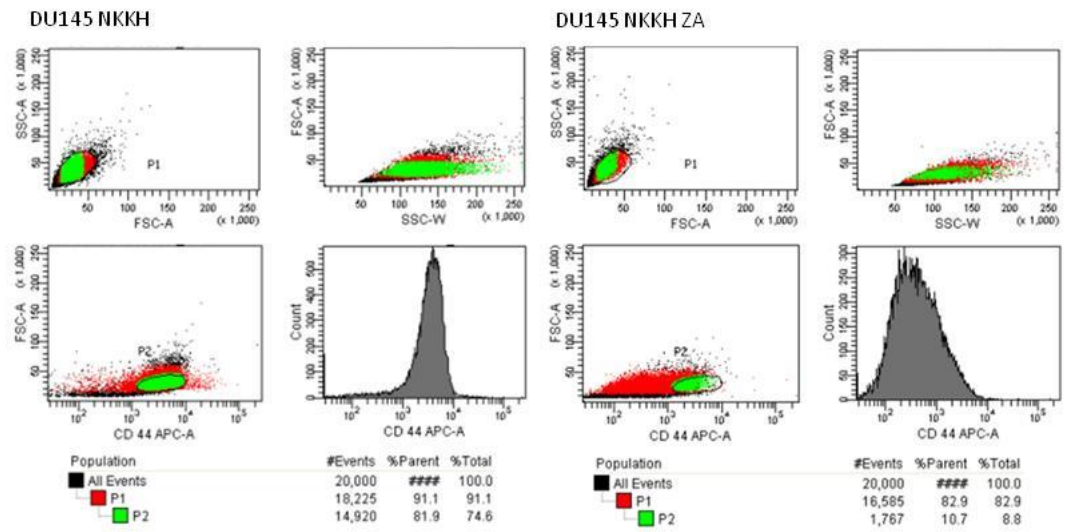
Bu sonuçlar dâhilinde anlamlı çıkan genlerden biri olan SPP1 immüno Floresan yöntem ile CD44 akış sitometresi analizi protein seviyesinde değerlendirilmiştir.

### CD44 Akış Sitometresi Analizi

Elde edilen dört hücre grubunun CD44 protein ekspresyonu analizi akış sitometresi ile gerçekleştirildi. Hücreler Yöntem kısmında belirtildiği gibi hazırlandı ve PBS içerisinde cihazda okutuldu. Her hücre grubundan 20000 hücre analiz edildi (Şekil 5-6).



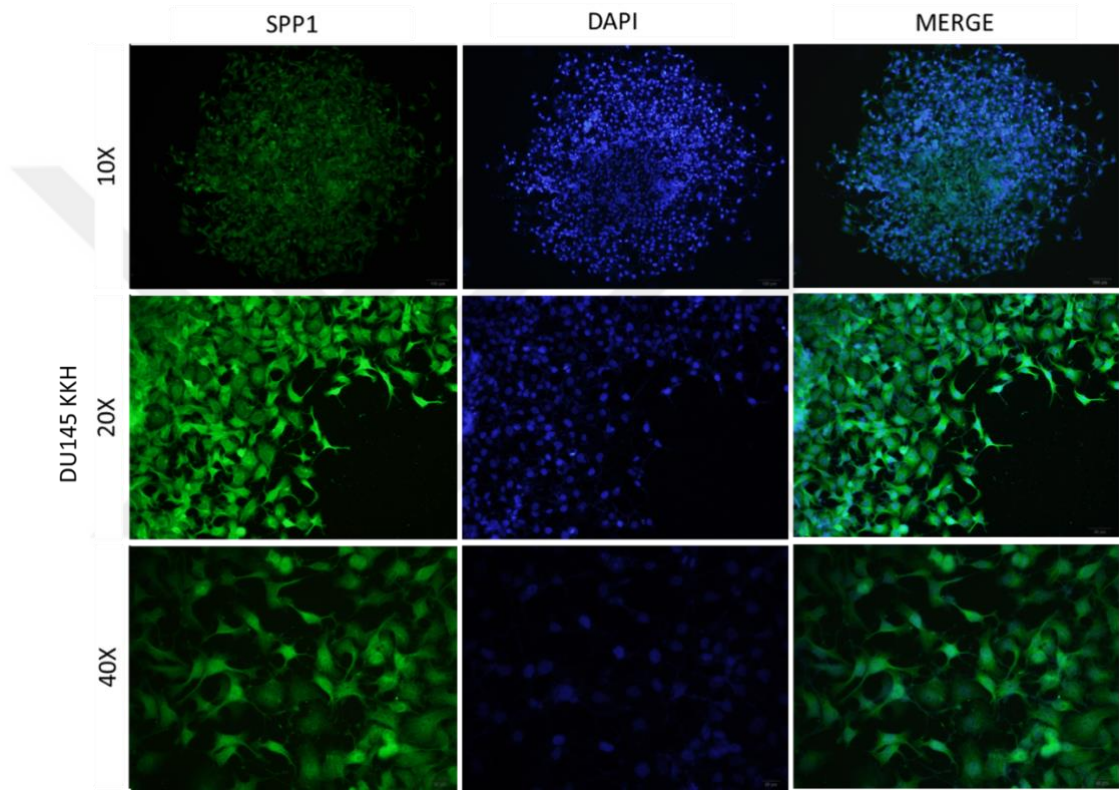
Şekil 5: DU 145 KKH kontrol ve ZOL grubunda CD44 protein ekspresyonu. Hücreler akış sitometresi ile analiz edildi ve CD44 pozitif hücre oranları karşılaştırıldı.



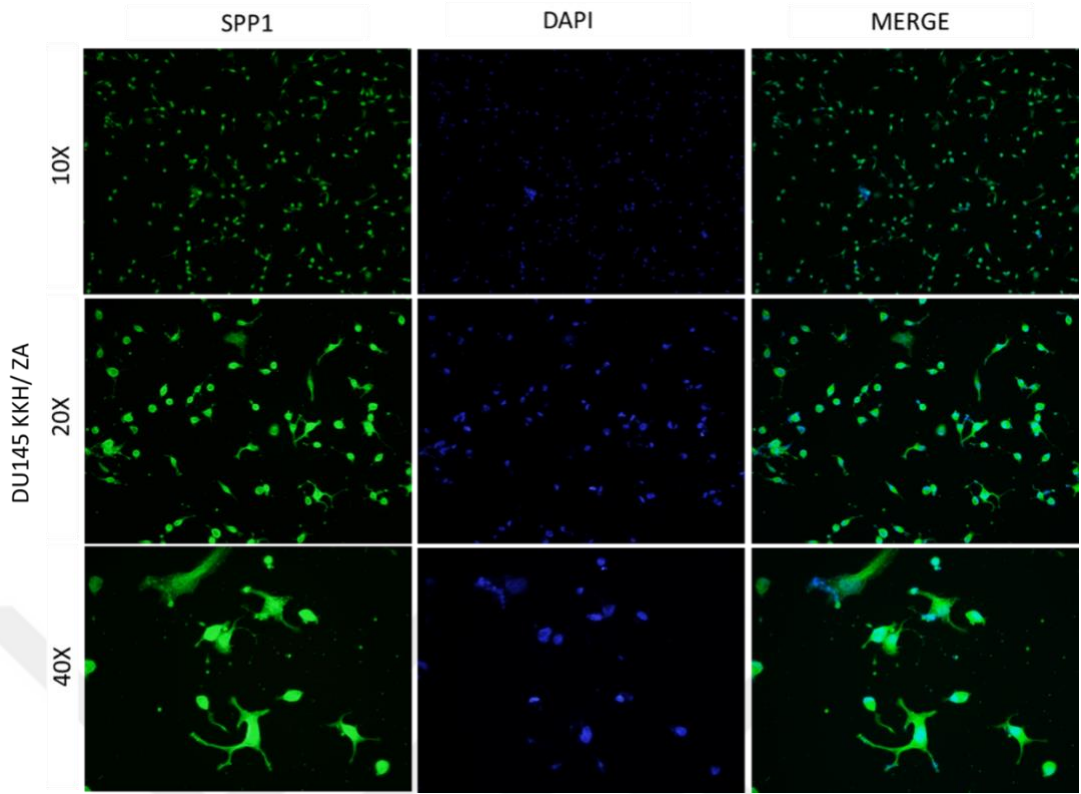
Şekil 6: DU 145 NKKH kontrol ve ZOL grubunda CD44 protein ekspresyonu. Hücreler akış sitometresi ile analiz edildi ve CD44 pozitif hücre oranları karşılaştırıldı.

Sonuç olarak CD44 ekspresyonu DU 145 KKH grupta daha yüksek (%82.6) iken DU145 NKKH grupta %74.6 olarak belirlendi ve bu durum gen ekspresyonu ile korelasyon göstermektedir. Her iki hücre grubu da ZOL maruziyeti sonrası CD44 protein ekspresyonunda düşüş gösterdi (DU145 KKH ZOL: %6 iken DU145 NKKH ZOL: %8.8). Fakat gen ekspresyonunda (gerçek zamanlı PCR sonucunda) düşüş sadece DU145 KKH grupta belirlendi.

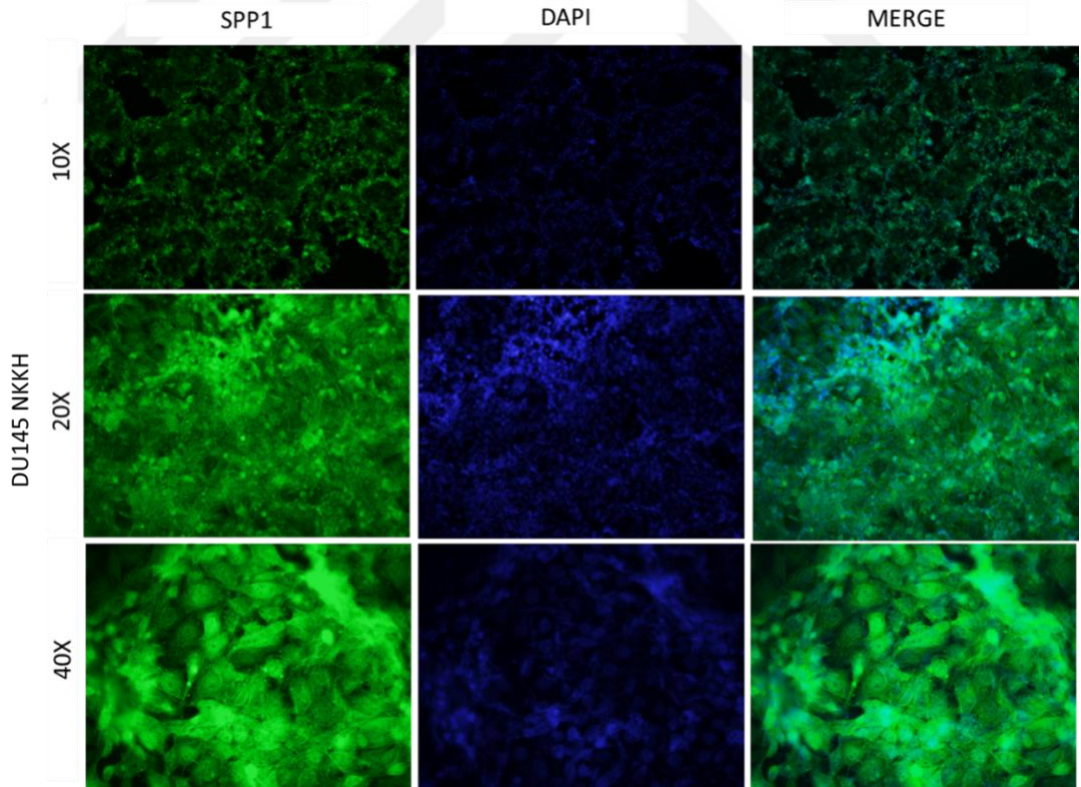
### İmmüno Floresan Boyama



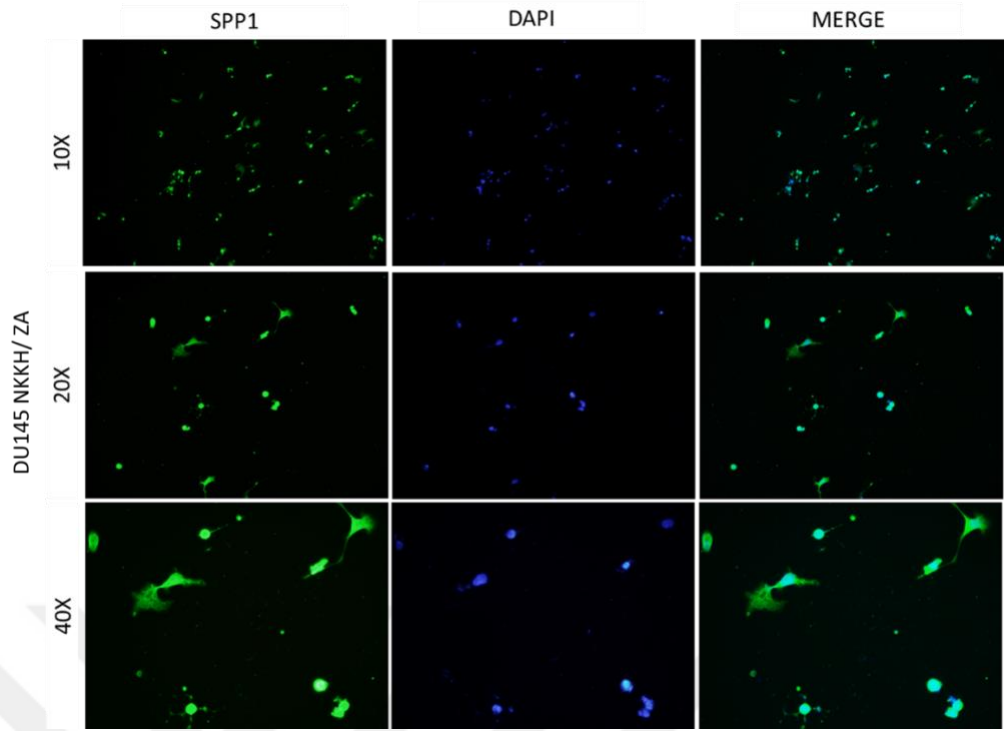
Şekil 7: DU145 KKH'lerinin SPP1 immüno floresan boyaması



Şekil 8: ZOL maruziyeti sonrası DU145 KKH'lerinin SPP1 immüno Floresan boyaması



Şekil 9: DU145 NKKH'lerinin SPP1 immüno Floresan boyaması



Şekil 10: ZOL maruziyeti sonrası DU145 NKKH'lerinin SPP1 immüno Floresan boyaması

İmmüno Floresan boyama sonuçlarına göre, DU145 KKH ve DU145 NKKH grupları benzer ışımaya ve yüksek yüzey kaplaması gösterirken, ilaç sonrası SPP1 ekspresyonu iki grup için de azalma göstermiştir. Ayrıca lokalizasyon olarak normalde hücre içerisinde eşit dağılım gösteren SPP1 proteini ZOL tedavisi sonrası hücre membranına yakın lokalizasyonunu artırmış ve şerit halinde bir yapılanma göstermiştir. ZOL tedavisi ekspresyon değişimi yanı sıra hücre ölümünü de artırdığından görüntülerde kontrol hücrelerine göre çok az sayıda hücre elde edilmiştir. Ayrıca yüzeyden ayrılan hücrelerin yüksek seviyede kalıntıları da yine SPP1 pozitif olarak yer yer boyanmıştır. Sonuç olarak SPP1 ZOL maruziyeti sonrası DU145 KKH ve DU145 NKKH gruplarında artış göstermiştir. Bu sonuçlar SPP1 gen ekspresyonu ile de korelidir. Kontrol görüntülerindeki belirli bölgelerdeki bulanıklık ve yüksek ışımaya gösteren bölgeler kanser hücrelerinin özelliklerinden biri olan 'anchorage independence' yani büyüme alanı bittiğinde diğer hücre üzerinde yeni bir katman oluşturabilme özelliğinden dolayıdır ve o bölgelerde birden fazla hücre katmanı bulunmaktadır.

## Tartışma

Prostat kanseri gelişmiş ülkelerde erkekler arasında en sık teşhis konulan ve kansere bağlı ölüme ikinci sıklıkta yol açan malign hastalıktır. Biyolojik özellikleri, buna bağlı klinik, sosyal ve ekonomik etkileri nedeniyle prostat kanseri araştırmaların giderek daha fazla hedefi haline gelmektedir. Tedavi sonrasında kanserin tekrarlaması, hastalığın ilerleme göstermesi ve metastaz gelişimi prostat kanseri hastalarında yaşam süresinin uzatılması açısından halen aşılması gereken engellerdir.

Diğer kanserlerde olduğu gibi prostat kanserinde de ileri evre hastalık tanısı konulması hasta ve hekim açısından zorlu bir sürecin yaşanacağını işaretidir. Tedavilerle hastalığın kontrol edilememesi, rekürens gelişmesi ve metastatik kanserle mücadele yoğun mesai gerektirir. Yüksek riskli ve/veya ileri evre prostat kanseri hastalarında kemoterapi uygulamasının yaşam süresini uzattığı artık bilinen bir gerçektir. Son 10 yıl içerisinde prostat kanserinin sistemik tedavisinde çok sayıda ve mucizevi başarılar elde edilmesine rağmen yaşam savaşının kazanıldığından halen söz etmek için erkendir.

İleri evre prostat kanserinin tedavisinde yeni ve gelişmiş seçeneklerin ortaya konulmasını hedefleyen araştırmaların temel odak noktasında prostat kanseri kök hücrelerini hedefleyen yöntemler yer almaktadır. Kanser kök hücrelerine yönelik tedavi seçenekleri geleneksel antiproliferatif yöntemlerden daha etkin malignite sağaltımına önderlik yapabilecek kapasiteye sahip olabilir (Maitland 2008, Dubrovka 2010, Castelo-Branco 2011).

Kanser kök hücrelerini hedef alan tedavilerde hücre yüzeyindeki belirleyiciler, sinyalizasyon yolları ve kanser kök hücresi mikroçevresine (niche) odaklanılmaktadır. Tümör mikroçevresi için büyük önem taşıyan anjiogenezis adeta köşe taşıdır ve kanser kök hücrelerinin yaşaması ve ilaç direnci gelişimi açısından önemlidir (Leão 2017).

Kanser kök hücrelerinin homeostazisine etki edecek Hh, Wnt, Notch, and NF-κB yolları inhibitörlerinin inhibisyonu kök hücrelerin kendisini yenileme yeteneğini engelleyecek, kök hücre faktörlerinin (Oct4, Sox2, c-Myc, and Nanog) pluripotent halini baskılayacak ve tümör büyümesini inhibe edecektir.

Prostat kanseri tedavisi özelinde Wnt yolağı inhibitörleri (Foxy-5 ve OMP-54F28) kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarının tedavisinde Faz I çalışma olarak araştırılmaktadır (Sheikh 2014, Le 2015). Hh yolağı inhibisyonunu hedefleyen klinik çalışmalar da yoğun bir ilgi ile devam etmektedir (Takebe 2011, Gonnissen 2013,

Gonnissen 2015, Hanna 2016). Klinik alışmalar prostata sınır kanser ve metastatik olgulara yönelik gerçekleştirilmektedir.

Bu alışmada, ZOL'un prostat kanser hücre hattı içerisindeki DU145 KKH ve DU145 NKKH hücre populasyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Akım sitometrisi ile elde edilen sonuçlarda, önemli KKH yüzey belirteci olan CD44 hücre yoğunluğunda önemli düşüşler tespit edilmiştir. Bu sonuç, ZOL uygulamasında KKH'lerin büyük oranda hedeflenebildiğini göstermektedir. ZOL uygulamasında CD44, ITGB1, CD29, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPP1, TGFB1, TGFB1, TIMP2, ADAMTS1, ITGB5 adezyon genlerinde önemli değişimlerin olduğu tespit edilmiştir. En belirgin değişim SPP1'de görülmüştür. Sonuçlar, KKH-adezyon molekülleri ekseninde ZOL'un önemli rollerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Klinik araştırmalarda elde edilen sonuçların klinik öncesi çalışma verilerinin getirdiği umutlara erişememesine rağmen üzerinde inceleme yapılması gereken çok sayıda seçenek bulunmaktadır. Prostat kanseri kök hücrelerini hedefleyen birden fazla ilacın birlikte kullanımı esasına dayalı protokollerin bugün için bilinen tedavi seçeneklerini değiştirebilir. Böylesi bir değişim prostatta sınırlı hastalık, lokal ileri hastalık, metastatik hastalık ve tedavilere rağmen ilerleyen hastalık olgularına çözüm getirebilir.



## Sonuç ve Öneriler

Kök hücreler rejeneratif tıbbi tedavi uygulamalarıyla birçok kronik hastalık sahibi için ümit ışığı olma yolunda ilerlemektedir. Bununla birlikte, kanser kök hücresi ve kanser kök hücresi üzerinden etki edecek tedavi uygulamaları göreceli olarak yeni araştırma sahalarıdır.

Bu araştırma birbirinden bağımsız üç ayrı bileşeni bir araya getirerek bugün için *in vitro* ortamda ama gelecekte prostat kanserli hastaların tedavisinde kullanılabilme potansiyeli olan yeni bir tedavi seçeneği yaratmayı başarmıştır. Hiç şüphesiz laboratuvar şartları ile klinik pratik her zaman aynı başarıya erişememektedir. Yine de, Zoledronik asit uygulamasıyla prostat kanseri kök hücreleri adezyon moleküllerinde elde edilen değişimler klinik uygulamada kullanılacak potansiyel etkileri işaret etmektedir.

Bu aşamadan sonra yapılacak çalışmalar hiç şüphesiz bir kimyasalın ilaç olabilmesi için gereken basamakları aşmasını gerektirmektedir.

## Kaynaklar

- Alison MR, Murphy G, Leedham S. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res.* 2008;331:109–24
- American Cancer Society. Survival rates for prostate cancer. <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-survival-rates>. Revised March 12, 2015
- Ayla S, Huseyinoglu S. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 24(1):27–34 (2019)
- Bizzarro, V., Belvedere, R., Milone, M. R., Pucci, B., Lombardi, R., Bruzzese, F., ... Petrella, A. (2015). Annexin A1 is involved in the acquisition and maintenance of a stem cell-like/aggressive phenotype in prostate cancer cells with acquired resistance to zoledronic acid. *Oncotarget*, 6(28), 25074–25092. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4725>
- Boissier, S., Magonetto, S., Frappart, L., Cuzin, B., Ebetino, F. H., Delmas, P. D., & Clezardin, P. (1997). Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Research*, 57(18), 3890–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9307266>
- Borah A, Raveendran S, Rochani A, Maekawa T, Kumar DS. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis*. 2015;4:e177.
- Bukhtoyarov, O. V., & Samarin, D. M. (2015). Pathogenesis of Cancer: Cancer Reparative Trap. *Journal of Cancer Therapy*. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.65043>
- Bühler, H., Hoberg, C., Fakhrian, K., & Adamietz, I. A. (2016). Zoledronic acid inhibits the motility of cancer stem-like cells from the human breast cancer cell line MDA-MB 231. *In Vivo*, 30(6), 761–768. <https://doi.org/10.21873/invivo.10992>
- Castelo-Branco P, Zhang C, Lipman T, Fujitani M, Hansford L, Clarke I, Harley CB, Tressler R, Malkin D, Walker E, Kaplan DR, Dirks P, Tabori U: Neural tumor-initiating cells have distinct telomere maintenance and can be safely targeted for telomerase inhibition. *Clin Cancer Res* 2011;17:111-121
- Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T. A., & Anderson, K. C. (1996). Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*, 87(3), 1104–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562936>

- Chiodoni, C., Colombo, M. P., & Sangaletti, S. (2010). Matricellular proteins: From homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9221-8>
- Clezardin, P. (2005). Anti-tumour activity of zoledronic acid. *Cancer Treatment Reviews*, *31*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2005.09.002>
- Clézardin, P. (2011). Bisphosphonates' antitumor activity: An unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone*. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.07.016>
- Condic, M. L. (2013). Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells and Development*. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>
- Coppola, D., Szabo, M., Boulware, D., Muraca, P., Alsarraj, M., Chambers, A. F., & Yeatman, T. J. (2004). Correlation of Osteopontin Protein Expression and Pathological Stage across a Wide Variety of Tumor Histologies. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1405-2>
- Corso, A., Ferretti, E., Lunghi, M., Zappasodi, P., Mangiacavalli, S., De Amici, M., ... Lazzarino, M. (2005). Zoledronic acid down-regulates adhesion molecules of bone marrow stromal cells in multiple myeloma. *Cancer*, *104*(1), 118–125. <https://doi.org/10.1002/cncr.21104>
- Coxon, J. P., Oades, G. M., Kirby, R. S., & Colston, K. W. (2004). Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU International*, *94*(1), 164–170. <https://doi.org/10.1111/j.1464-4096.2004.04831.x>
- Danzaki, K., Kanayama, M., Alcazar, O., & Shinohara, M. L. (2016). Osteopontin has a protective role in prostate tumor development in mice. *European Journal of Immunology*, *46*(11), 2669–2678. <https://doi.org/10.1002/eji.201646391>
- Das, S., Samant, R. S., & Shevde, L. A. (2013). Nonclassical activation of Hedgehog signaling enhances multidrug resistance and makes cancer cells refractory to smoothed-targeting Hedgehog inhibition. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.432302>
- David Roodman, G. (2003). Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis. *Cancer*, *97*(S3), 733–738. <https://doi.org/10.1002/cncr.11148>
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987;24(51(6)):987–1000
- Driesch, H., & Driesch, H. (1894). *Analytische theorie der organischen entwicklung, von Hans Driesch. Mit acht textfiguren*. Leipzig.: W. Engelmann., <https://doi.org/10.5962/bhl.title.1394>
- Dubrovskaja A, Elliott J, Salamone RJ, Kim S, Aimone LJ, Walker JR, Watson J, Sauveur-Michel M, Garcia-Echeverria C, Cho CY, Reddy VA, Schultz PG:

- Combination therapy targeting both tumor-initiating and differentiated cell populations in prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:5692-5702.
- Dumon, J. C., Journé, F., Kheddoumi, N., Lagneaux, L., & Body, J. J. (2004). Cytostatic and apoptotic effects of bisphosphonates on prostate cancer cells. *European Urology*. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2003.12.012>
- Erguler, G., Demir, N., & Demir, R. (2002). Adezyon Moleküllerinin Yapısal Özellikleri ve Fonksiyonları, (2), 313–327.
- Fragni, M., Bonini, S. A., Stabile, A., Bodei, S., Cristinelli, L., Simeone, C., ... Sigala, S. (2016). Inhibition of Survivin Is Associated with Zoledronic Acid-induced Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Anticancer Research*, 36(3), 913–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976978>
- Gallo, M., De Luca, A., Lamura, L., & Normanno, N. (2012). Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: Implications for adjuvant therapy of breast cancer. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr159>
- Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet*. 2008;49:193–99
- Giraud, E., Inoue, M., & Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 114(5), 623–633. <https://doi.org/10.1172/JCI22087>
- Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K: Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. *Int J Mol Sci* 2013;14:13979-14007.
- Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K: Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget* 2015;6:13899-13913.
- Green, J. R. (2003). Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer*, 97(S3), 840–847. <https://doi.org/10.1002/cncr.11128>
- Guenther, A., Gordon, S., Tiemann, M., Burger, R., Bakker, F., Green, J. R., ... Gramatzki, M. (2010). The bisphosphonate zoledronic acid has antimyeloma activity in vivo by inhibition of protein prenylation. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.24758>
- Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Development*. 1962;10:622–40
- Hanna A, Shevde LA: Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Mol Cancer* 2016;15:24
- Hasmim, M., Bieler, G., & Rüegg, C. (2007). Zoledronate inhibits endothelial cell

adhesion, migration and survival through the suppression of multiple, prenylation-dependent signaling pathways. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(1), 166–173. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02259.x>

Hindupur SK, Balaji SA, Saxena M, Pandey S, Sravan GS, Heda N, Kumar MV, Mukherjee G, Dey D, Rangarajan A. Identification of a novel AMPK-PEA15 axis in the anoikis-resistant growth of mammary cells. *Breast Cancer Res.* 2014;16:420

<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2005f4pwsecu redpdf.pdf>. Published 2005

Iczkowski, K. A. (2010). Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *American Journal of Translational Research*, 3(1), 1–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139802>

Ishii, S., Ford, R., Thomas, P., Nachman, A., Steele, G., & Jessup, J. M. (1993). CD44 participates in the adhesion of human colorectal carcinoma cells to laminin and type IV collagen. *Surgical Oncology*. [https://doi.org/10.1016/0960-7404\(93\)90015-Q](https://doi.org/10.1016/0960-7404(93)90015-Q)

Jalkanen, S., & Jalkanen, M. (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.3.817>

Jiang, W. G., Sanders, A. J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., ... Santini, D. (2015). Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S244–S275. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.008>

Kain K. The birth of cloning: an interview with John Gurdon. *Dis Model Mech.* 2009;2(1–2):9–10.

Kallakury, B. V. S., Yang, F., Figge, J., Smith, K. E., Kausik, S. J., Tacy, N. J., ... Ross, J. S. (1996). Decreased levels of CD44 protein and mRNA in prostate carcinoma: Correlation with tumor grade and ploidy. *Cancer*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19961001\)78:7<1461::AID-CNCR13>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19961001)78:7<1461::AID-CNCR13>3.0.CO;2-Y)

Kim J, Orkin SH. Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Med.* 2011;3:75.

Kluger, H. M., Hoyt, K., Bacchiocchi, A., Mayer, T., Kirsch, J., Kluger, Y., ... Halaban, R. (2011). Plasma markers for identifying patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2402>

- Kumar, V., Behera, R., Lohite, K., Karnik, S., & Kundu, G. C. (2010). p38 kinase is crucial for osteopontin-induced furin expression that supports cervical cancer progression. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1470>
- Kurisetty, V. V, Johnston, P. G., Johnston, N., Erwin, P., Crowe, P., Fernig, D. G., ... El-Tanani, M. K. (2008). RAN GTPase is an effector of the invasive/metastatic phenotype induced by osteopontin. *Oncogene*, 27(57), 7139–7149. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.325>
- Lau EY, Ho NP, Lee TK. Cancer stem cells and their microenvironment: biology and therapeutic implications. *Stem Cells Int*. 2017;2017:3714190.
- Le PN, McDermott JD, Jimeno A: Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther* 2015;146:1-11
- Leão R. Domingos C. Figueiredo A. Hamilton R. Tabori U. Castelo-Branco P. Cancer Stem Cells in Prostate Cancer: Implications for Targeted Therapy. *Urol Int* 2017;99:125-136
- Legg, J. W., Lewis, C. A., Parsons, M., Ng, T., & Isacke, C. M. (2002). A novel PKC-regulated mechanism controls CD44-ezrin association and directional cell motility. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb797>
- Li, N. Y., Weber, C. E., Wai, P. Y., Cuevas, B. D., Zhang, J., Kuo, P. C., & Mi, Z. (2013). An MAPK-dependent pathway induces epithelial-mesenchymal transition via Twist activation in human breast cancer cell lines. *Surgery (United States)*. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2013.05.012>
- Lin, Y., Liao, P., Tsai, T., Chou, K., Chen, H., Lin, J., & Hwang, T. I. (2014). Zoledronic Acid Elicits Proinflammatory Cytokine Profile in Osteolytic Prostate Cancer Cells, 2014.
- Lipton, A., Small, E., Saad, F., Gleason, D., Gordon, D., Smith, M., ... Seaman, J. (2002). The new bisphosphonate, Zometa® (zoledronic acid), decreases skeletal complications in both osteolytic and osteoblastic lesions: A comparison to pamidronate. In *Cancer Investigation*. <https://doi.org/10.1081/CNV-120014886>
- Lokeshwars, V. B., & Bourguignon, L. Y. W. (1991). *Post-translational Protein Modification and Expression of Ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and Its Biosynthetic Precursors during T-Lymphoma Membrane Biosynthesis\**. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (c)* (Vol. 266). Retrieved from <http://www.jbc.org/content/266/27/17983.full.pdf>
- Maitland NJ, Collins AT: Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol* 2008;26:2862-2870.

- Malagobadan S, Nagoor NH. Evaluation of microRNAs regulating anoikis pathways and its therapeutic potential. *Biomed Res Int.* 2015;2015:716816.
- Marhaba, R., & Zöller, M. (2003). CD44 in Cancer Progression: Adhesion, Migration and Growth Regulation. *Journal of Molecular Histology*, 35(3), 211–231. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000032354.94213.69>
- Milone, M. R., Pucci, B., Bruzzese, F., Carbone, C., Piro, G., Costantini, S., ... Budillon, A. (2013). Acquired resistance to zoledronic acid and the parallel acquisition of an aggressive phenotype are mediated by p38-MAP kinase activation in prostate cancer cells. *Cell Death and Disease*, 4(5), e641-11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.165>
- Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:133–43
- Nicholas, J. S., & Hall, B. V. (1942). Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. *Journal of Experimental Zoology.* <https://doi.org/10.1002/jez.1400900307>
- Noordzij, M. A., Van Steenbrugge, G. J., Verkaik, N. S., Schröder, F. H., & Van Der Kwast, T. H. (1997). The prognostic value of CD44 isoforms in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Clinical Cancer Research.*
- Omara-Opyene, A. L., Qiu, J., Shah, G. V., & Iczkowski, K. A. (2004). Prostate cancer invasion is influenced more by expression of a CD44 isoform including variant 9 than by Muc18. *Laboratory Investigation.* <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700112>
- Rebecca L. Siegel, Kimberly D. Miller, Ahmedin Jemal. Cancer Statistics, 2018, *CA Cancer J Clin* 2018;68:7–30
- Robertson, B. W., Bonsal, L., & Chellaiah, M. A. (2010). Regulation of Erk1/2 activation by osteopontin in PC3 human prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 9, 260. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-260>
- Rouhrazi, H., Turgan, N., & Oktem, G. (2018). Zoledronic acid overcomes chemoresistance by sensitizing cancer stem cells to apoptosis. *Biotechnic and Histochemistry*, 93(2), 77–88. <https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1387286>
- Saad, F., & Schulman, C. C. (2004). Role of Bisphosphonates in Prostate Cancer. *European Urology*, 45(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2003.10.003>
- Santini, D., Vincenzi, B., Galluzzo, S., Battistoni, F., Rocci, L., Venditti, O., ... Tonini, G. (2007). Repeated Intermittent Low-Dose Therapy with Zoledronic Acid Induces an Early, Sustained, and Long-Lasting Decrease of Peripheral Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4482–4486. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0551>

- Santini, D., Zoccoli, A., Gregorj, C., Di Cerbo, M., Iuliani, M., Pantano, F., ... Tonini, G. (2013). Zoledronic acid induces a significant decrease of circulating endothelial cells and circulating endothelial precursor cells in the early prostate cancer neoadjuvant setting. *Oncology (Switzerland)*, 85(6), 342–347. <https://doi.org/10.1159/000347226>
- Sheikh A, Niazi AK, Ahmed MZ, Iqbal B, Anwer SM, Khan HH: The role of Wnt signaling pathway in carcinogenesis and implications for anticancer therapeutics. *Hered Cancer Clin Pract* 2014;12:13.
- Shevde, L. A., & Samant, R. S. (2014). Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.03.001>
- Shi D, Lu F, Wei Y, et al. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod.* 2007;77:285–91
- Sommer CA, Mostoslavsky G. Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:26.
- Sun, B., You, J., Li, Y., Zhang, Z., & Wang, C. (2013). Osteopontin knockdown suppresses non-small cell lung cancer cell invasion and metastasis. *Chinese Medical Journal*, 126(9), 1683–8. <https://doi.org/10.3760/CMA.J.ISSN.0366-6999.20123465>
- Tacyıldız, N., & Cavdar, O. A. (1995). Adezyon molekülleri ve metastaz, 48, 199–214.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development.* 2013;140(12):2457–61
- Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP: Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:97-106.
- Tanaka, T., Morimoto, K., & Nakatani, T. (2018). Zoledronic Acid Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasion via Degradation of Ubiquitinated NEDD9 in PC-3 Prostate Cancer Cells. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 10(04), 80–84. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000523>
- Underhill, C. (1992). COMMENTARY: CD44: The hyaluronan receptor. *Journal of Cell Science*, 103, 293–298. Retrieved from <http://www.biologists.com/JCS/103/02/jcs7731.html>
- Weber, G. F., Ashkar, S., Glimcher, M. J., & Cantor, H. (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.509>
- Weiswald LB, Richon S, Massonnet G, Guinebretiere JM, Vacher S, Laurendeau I, Cottu P, Marangoni E, Nemati F, Validire P, Bellet D. A short-term colorectal

cancer sphere culture as a relevant tool for human cancer biology investigation. *Br J Cancer*. 2013;108:1720–31.

Yoshiyama, A., Morii, T., Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Tajima, T., Aoyagi, T., ... Ichimura, S. (2016). Development of Stemness in Cancer Cell Lines Resistant to the Anticancer Effects of Zoledronic Acid. *Anticancer Research*.

Yuasa, T., Kimura, S., Ashihara, E., Habuchi, T., & Maekawa, T. (2007). Zoledronic acid - a multiplicity of anti-cancer action Yuasa et al. 2007. *Current Medicinal Chemistry*, 14(20), 2126–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17691952>

Yuen, H. F., Chan, K. K., Grills, C., Murray, J. T., Platt-Higgins, A., Eldin, O. S., ... El-Tanani, M. (2012). Ran is a potential therapeutic target for cancer cells with molecular changes associated with activation of the PI3K/Akt/mTORC1 and Ras/MEK/ERK pathways. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2035>

Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. *Stem Cell Research & Therapy* 10:68 2-22, 2019

Zimmerlin, L., Park, T. S., & Zambidis, E. T. (2017). Capturing Human Naïve Pluripotency in the Embryo and in the Dish. *Stem Cells and Development*. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0055>

## Teşekkür

Bugünler hekimlik kariyerimin otuzbirinci yılını tamamladığım anlara denk geliyor. Değişik zamanlarda, farklı lokasyonlarda Türk Sağlık Mevzuatının hekim olarak çalışmaya olanak tanıdığı biri dışında tüm mevkilerde çalıştım. Akademik mevzuatın idari görevlere verdiği sıfatların en kıymetlisi olduğuna inandığım “Tıp Fakültesi Kurucu Dekanı” olma onuruna da eriştim.

Yaşadıklarına rağmen “Doktora Tezinin Teşekkür Bölümünü” yazmak çok daha farklı duygulanıma yol açıyor. Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu Hocamızın öğrencisi olarak başladığım süreç büyük sabır, anlayışını esirgemeyen Prof. Dr. Cumhur Gündüz Hocamın yöneticiliği altında tamamlanıyor.

Doç. Dr. Buket Kosova Hocam ile yaptığımız görüşme sonrası başlayan çalışmalarım Doç. Dr. Zuhale Eroğlu Hocamın verdiği dersleri kapsayacak şekilde ilerledi.

Doktora sürecimin yakın takipçisi ve daraldığım anların çözüm üretenlerinden birisi olan Prof. Dr. Gülperi Öktem Hocam da gelinen noktada emekleriyle büyük kıymet taşıyor.

Aklımın derinliklerinde çok büyük ve önemli yer işgal eden konu “tezimi yazmak” bitmek üzere.

“Teşekkür” etmek insani erdemler arasında yüce bir yere sahip olsa da Topçuoğlu, Gündüz, Eroğlu, Kosova ve Öktem Hocalarıma minnetimi hakkıyla anlatabilmem için benim nazarımda yeterli değil. Çünkü Hocalarıma çok teşekkür etmem, şükranlarımı sunmam ve minnet hislerimden söz etmem de gerekli.

Hocalarıma derin saygılarım, kalpten şükran ve minnet duygularıyla,

İzmir, 7.07.2020

A. Çağ Çal

## Özgeçmiş

İlk ve orta öğrenimini tamamlayarak 1982 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinde yüksek öğrenimine başladı. Mezuniyetinin ardından gittiği mecburi hizmeti sırasında Üroloji Uzmanlık Eğitimi yapma hakkını kazandı. İzmir Atatürk Devlet Hastanesi Üroloji Kliniği' nde başladığı ihtisasını Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı' nda tamamladı. Uzmanlık (1995), Doçentlik (2001) ve Profesörlük (2007) süreçlerini halen çalışmalarını sürdürdüğü Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim dalında tamamladı.

Klinik gözlemci ve/veya araştırmacı olarak Amerika Birleşik Devletleri' nde Memorial Sloan Kettering Cancer Center (1993), Mayo Clinic (1997), University of California Los Angeles (2000) ve Avusturya' da Innsbruck Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Kliniklerinde (2002) çalıştı. Bu çalışmaları için hazırladığı projelerle Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) ve Avrupa Üroloji Derneği (EAU) burslarını kazandı.

Özellikle üroonkoloji ve endoüroloji alanlarında çalışmalarını yoğunlaştıran Dr. Çal' ın kitap editörlüklerinin yanı sıra yurtiçi, yurtdışında basılmış kitap bölümleri ve makaleleri bulunmaktadır. Başta üroonkolojik temel araştırmaları olmak üzere eserleri çok sayıda ödülle değer görülmüştür.

Ulusal ve uluslararası birçok dernekte aktif üye olarak görev almaktadır.

Dr. Çal evlidir ve Cem, Ece isimli çocukları vardır.

E-posta: