



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIÇAN PROSTAT KANSERİNDE VOLTAJ KAPILI
SODYUM KANAL AKTİVİTESİNİN FARKLI
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI**

Selma KÜÇÜK

Biyoloji Anabilim Dalı

Radyobiyoloji Programı

Danışman

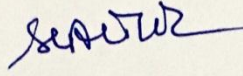
Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Haziran, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 20/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Radyobiyojoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



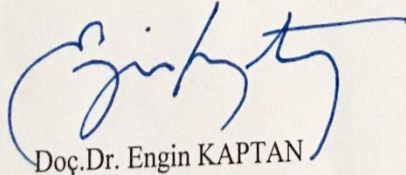
Prof.Dr. Seyhan ALTUN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



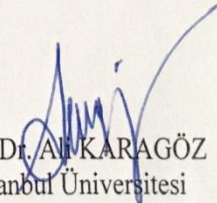
Prof.Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç.Dr. Ömür BULAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç.Dr. Engin KAPTAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç.Dr. Ali KARAGÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 47629 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca bilimsel bilgi ve birikimi ile danışmanlığımı yapan, gerek hazırladığı laboratuvar koşulları ve çalışma ortamı ile gerekse göstermiş olduğu sabrı ve manevi desteği ile tez danışmanlığının yanı sıra yol göstericim olarak her zaman yanımda olan, kendisiyle çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a;

Kendisi ile tanışabilme, tecrübesi ve fikirleri ile aydınlanabilme imkanı bulabildiğim 'Imperial College' (Londra)'dan saygıdeğer Hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa B.A. DJAMGOZ'e;

İmmünohistokimyasal ve immünfloresan çalışmalarım sırasında değerli bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, laboratuvar imkânlarıyla destek veren, güler yüzü ve anlayışı ile Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Handan KAYA'ya, değerli emekleri ve yorumları için Sayın Dr. Naziye ÖZKAN'a;

Derslerinde bulunmaktan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, tez çalışmam da emeği geçen, bilgisi ve fikirlerinden yararlanma fırsatı bulabildiğim Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Ana Bilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Kadir TURAN'a, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Araş. Gör. Mehmet Şerif AYDIN'a;

Tezimin biyoistatistiksel kısmında yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Ömer ALTUN'a; bilgi ve desteği ile tez çalışmamda emeği geçen Sayın Dr. Mine Güzel'e;

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren bilgisi, tecrübesi, yardımları ve dostluğu ile yanımda olan, birlikte çalışmaktan sevinç ve gurur duyduğum, tüm zor anlarımda varlığı ile güçlendiğim ve kendimi her zaman şanslı hissettirdiği için Sayın Araş. Gör. Dr. İlknur BUGAN'a; yardımlarından dolayı sevgili çalışma arkadaşlarım Gökçe ERDEMİR'e ve Sercan UZUN'a;

Ve de hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgileri, anlayışları, emekleri ve destekleri ile güçlendiğim, varlıkları ile hayatımı renklendiren Sevgili Aileme ve Babam'a...

Tüm minnettarlığım ve en içten dileklerimle sonsuz teşekkür ediyorum.

-Bu çalışma aynı zamanda, 110T890 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Haziran, 2016

Selma KÜÇÜK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	6
2.1. İYON KANALLARI	6
2.2. İYON KANALLARININ BİYOLOJİSİ VE FONKSİYONU	7
2.2.1. Ligand Kapılı İyon Kanalları	8
2.2.1.1. Hücre İçi Ligand Kapılı Kanallar	8
2.2.1.2. Hücre Dışı Ligand Kapılı İyon Kanalları	9
2.2.2. Voltaj Kapılı İyon Kanalları	10
2.2.2.1. Voltaj kapılı sodyum kanalı	11
2.2.2.2. Voltaj kapılı kalsiyum kanalı	11
2.2.2.3. Voltaj kapılı klorid kanalı	11
2.2.2.4. Voltaj kapılı potasyum kanalı	12
2.3. VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI (VGSC)	12
2.3.1. VGSC Yapısı ve Fonksiyonu	13
2.3.2. VGSC’de Israrlı Akım	16
2.4. PROSTAT KANSERİ VE METASTAZ.....	18
2.5. KANSERDE VGSC EKSPRESYONU.....	24
2.5.1. VGSC’lerde α Alt Birimleri.....	27
2.5.2. VGSC’lerde β Alt Birimleri.....	30
2.6. KANSER ARAŞTIRMALARINDA KULLANILAN DENEYSEL MODELLER.....	31
2.7. KANSERDE TERAPÖTİK POTANSİYEL VE YENİ STRATEJİLER.....	32

2.8. RANOLAZİNE.....	34
3. MALZEME VE YÖNTEM	39
3.1. MAT-LYLU HÜCRELERİNİN YETİŞTİRİLMESİ.....	39
3.2. RANOLAZİNE'İN HAZIRLANMASI.....	39
3.3. SIÇANLARDA DUNNING MODELİNİN OLUŞTURULMASI	39
3.4. TEDAVİ VE DOKU PROSEDÜRLERİ.....	40
3.4.1. Tedavi Planı ve Tedavi	40
3.3.2. Dokuların Diseksiyonu	41
3.4. DOKU ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	42
3.4.1. Hematoksilen & Eosin Boyama.....	42
3.4.2. İmmünohistokimyasal Analiz	43
3.4.2.1. Skolama.....	43
3.4.2.2. <i>Image-J</i>	44
3.4.2. İmmünfloresan Analiz.....	44
3.4.3. Western Blott Analiz.....	44
3.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi.....	44
3.4.4.1. RNA Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu.....	47
3.4.4.2. cDNA Sentezi.....	47
3.4.4.3. Real-Time PCR.....	48
3.4.4.4. Jel Elektroforezi	48
3.5. İSTATİSTİK ANALİZ	48
4. BULGULAR	50
4.1. HİSTOMORFOLOJİK YÖNTEM	50
4.2. PROSTAT KANSERİNDE Na _v 1.7 PROTEİN EKSPRESYONU.....	52
4.2.1. Hücre ve Dokularda Na _v 1.7 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi	52
4.2.1.1. İmmünreaktivitenin Skolama ile Değerlendirilmesi	52
4.2.1.2. İmmünreaktivitenin <i>Image-J</i> ile Değerlendirilmesi	57
4.2.2. Dokularda Na _v 1.7 Protein Ekspresyonunun İmmünfloresan Analiz	62
4.3. WESTERN BLOTT ANALİZİ	64
4.4. PCR ANALİZİ.....	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	69
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Hücre membranı ve membrana yerleşmiş olan iyon kanalı şeması.	6
Şekil 2.2: İyon kanallarının iki büyük sınıfı	8
Şekil 2.3: VGSC'ler de α alt birim por oluşumu ve dört homolog alanın gösterimi	13
Şekil 2.4: Normal ve hipoksik ortamlarda VGSC akımı.	17
Şekil 2.5: Tümör büyümesinde hipoksia varlığının etkisi	18
Şekil 2.6: Prostat kanser hücrelerindeki farklılaşmayı gösteren Gleason skoru dereceleri.....	22
Şekil 2.7: Metastatik süreç boyunca meydana gelen basamaklar ve prostat kanserinde metastaz gelişiminin gerçekleştiği organlar	23
Şekil 2.8: Kanser ilerlemesinde VGSC alt birimlerinin rolü.....	26
Şekil 2.9: Dunning modeline ait MAT-LyLu hücrelerinin orijini.	32
Şekil 2.10: Ranolazine'in kimyasal formülü.	35
Şekil 4.1: Mat-LyLu hücresi ile sağlıklı ve deney grubu sıçanlardan elde edilen dokuların H&E boyama ile histolojik görüntüleri	51
Şekil 4.2: Mat-LyLu hücresi ile sağlıklı sıçanların kalp, akciğer ve prostat dokularındaki $Na_v1.7$ immünreaktivitesi.	53
Şekil 4.3: Dunning model prostat kanserli deney grubu sıçanların farklı dokularındaki $Na_v1.7$ ekspresyonunu.....	56
Şekil 4.4: Kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) grubu sıçanların primer tümör hücrelerindeki $Na_v1.7$ immünreaktivite şiddetleri.	57
Şekil 4.5: Kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) grubu sıçanların primer tümörde $Na_v1.7$ ekspresyonu yapan hücre yüzdeleri	58
Şekil 4.6: Sağlıklı, Kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) grubu sıçanların akciğerlerindeki $Na_v1.7$ immünreaktivite şiddetleri	59
Şekil 4.7: Sağlıklı, Kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) grubu sıçanların akciğer metastazlarında $Na_v1.7$ ekspresyonu yapan hücre yüzdeleri	60
Şekil 4.8: Kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) grubu sıçanların prostat bezi hücrelerindeki $Na_v1.7$ immünreaktivite şiddetleri.	61

Şekil 4.9: Kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) grubu sıçanların prostat bezinde Na _v 1.7 ekspresyonu yapan hücre yüzdeleri.	61
Şekil 4.10: Dunning modeli prostat kanserli ve 5 μ M RNL ile tedavi edilen sıçanların farklı dokularında immünfloresan ile VGSC α Na _v 1.7 protein ekspresyonu.....	63
Şekil 4.11: Western Blott analizi ile membran protein bantları	64
Şekil 4.12: Kontrol ve farklı dozlarda RNL uygulanan hayvanların primer tümörlerindeki mRNA miktarları.....	66
Şekil 4.13: Kontrol ve farklı dozlarda RNL uygulanan hayvanların akciğer metastazlarındaki mRNA miktarları.	67
Şekil 4.14: Kontrol ve farklı dozlarda RNL uygulanan hayvanların prostat bezi dokularındaki mRNA miktarları.	68

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: VGSC α alt birimlerinin doku lokasyonları ve kanser ekspresyonları	14
Tablo 2.2: VGSC β alt birimlerinin doku lokasyonları ve kanser ekspresyonları.....	15
Tablo 2.3: VGSC'lerin farklı alt birimleri tarafından metastatik hücre davranışları regülasyonu	28
Tablo 3.1: Gruplar ve tedavi planı.	40
Tablo 3.2: PCR analizlerinde kullanılan primerler.	46
Tablo 3.3: Na _v 1.7 gen dizisi.....	46
Tablo 4.1: Dunning modeli prostat kanserli Kontrol ve Deney grubu (2,5 μ M, 5 μ M RNL) sıçanların farklı dokularında Na _v 1.7 immünekspresyon skorları.....	55
Tablo 4.2: Sağlıklı, kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) tedavili sıçanların primer tümör, akciğer ve prostat dokularında Na _v 1.7 ekspresyonu yapan hücre yüzdesi	58

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

Ca^{+2}	: Kalsiyum
Cl^-	: Klor
K^+	: Potasyum
Na^+	: Sodyum

Kısaltmalar Açıklama

ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
BPH	: Bening Prostate Hiperplazi
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DMAB	: 3,2-dimethyl-4-amino-bifenil
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dNTP	: Deoksiribonukleozid Trifostat
DTT	: Dithiothreitol
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Birliği
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
GABA	: γ -Amino Butirik Asit
HIF-1	: Hipoksiya-İndüklenebilir Faktör-1
HRP	: Horseradish Peroksidaz
ICa	: Geç Kalsiyum Akımı
IKr	: Hızlı Potasyum Akımı
IKs	: Yavaş Potasyum Akımı
INa_(P)	: Israrlı sodyum kanal akımı
INa_(T)	: Geçici sodyum kanal akımı
INa-Ca	: Sodyum kalsiyum değiştirici
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
nAChR	: Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
NGF	: Nöron Büyüme Faktörü
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIN	: Prostatik İntraepitel Neoplazi
PKA	: Protein Kinaz A
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay
RNaz	: Ribonukleaz
RNL	: Ranolazine

RT-PCR	: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
siRNA	: Small interfering RNA
TRUS	: Transrektal Ultrasonografi
TTX	: Tetrodotoksin
VGCC	: Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları
VGIC	: Voltaj Kapılı İyon Kanalları
VGSC	: Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇAN PROSTAT KANSERİNDE VOLTAJ KAPILI SODYUM KANAL AKTİVİTESİNİN FARKLI TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

Selma KÜÇÜK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Günümüzde çeşitli faktörlerin etkisi ile görülme sıklığı giderek artan kanser hastalığı, mortalite ve morbiditesinin yüksek olması, tedavi maliyeti, süresi ve yan etkileri nedeniyle çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisini oluşturmaktadır. Kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerin primer tümörden çok, metastazlardan kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Metastaz oluşumunun altında yatan mekanizmaların anlaşılması üzerindeki yoğun çalışmalar, voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC) metastatik süreci etkileyen bir faktör olarak rol oynadığı ve yeni tedavi olanakları sağlama ve prognostik bir marker olma potansiyeli taşıdıklarını ortaya koymuştur (Brackenbury, 2012). Artarak devam eden deneysel çalışmalarda, prostat kanser hücrelerinin VGSC'lere sahip olduğu ve bu kanalların hastalığın metastatik ilerlemesine katkıda bulunduğu elektrofizyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmiştir. Bu hücrelerde özellikle VGSC'lerin $Na_v1.7$ alt tipinin ekspresyonu gösterilmiştir. VGSC'ler, prostat kanseri, meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolon kanseri ve serviks kanseri de dâhil olmak üzere birçok karsinomada ekspresse olduğu gözlenmiş ve $Na_v1.7$ 'nin prostat kanserindeki metastatik davranışlarından sorumlu olduğu saptanmıştır. Uzun zamandan beri, "VGSC'lerin kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde kuvvetlendirici bir etkiye sahip olduğu ve kanalların bloklanmasıyla metastatik ilerlemenin baskılanabileceği" hipotezi çalışmalarında, birbiriyle etiyolojik faktörler, hormon-bağımlı olma, metastatik karakter

vb. yönlerden benzerlik taşıyan prostat kanseri ve meme kanseri ile ilgili çok sayıda çalışma yürütülmüştür.

Çalışmada, klinikte kullanılan kronik anjina tedavisinde etkili bir ilaç olmasının yanı sıra, aynı zamanda iyon kanalları üzerine de etkisi gösterilmiş olan Ranolazine'in (RNL), Dunning modeli sıçan prostat kanseri üzerindeki etkisinin $Na_v1.7$ kanalının protein seviyesinde ve moleküler düzeyde varlığının etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, VGSC'lerin karsinogenezdeki ve metastazdaki heterotopik ekspresyonunun; güçlü metastatik Mat-Lyly hücrelerinin sıçanlara inokülasyonu ile oluşturulan *in vivo* Dunning prostat kanser modelinde metastazdan sorumlu olduğu belirlenen VGSC'lerde $Na_v1.7$ 'nin saptanması ve RNL (2,5 μ M - 5 μ M) ilacının farklı dozlar kullanılarak metastaza olan etkisi: primer tümör, akciğer metastazları ve prostat bezlerinde korunup korunmadığı; immünohistokimyasal, immünfloresan, western blotting ve eş zamanlı PCR yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Sonuç olarak, Dunning modeli prostat kanseri üzerinde RNL ile tedavi edilmesi sonucunda $Na_v1.7$ kanalının varlığı ilk kez araştırılmıştır. Israrlı akım blokeri olan RNL'nin 2,5 μ M ve 5 μ M dozunun, prostat kanseri metastazını azalttığı yöndeki veriler bu tez çalışmasıyla ilk kez ortaya konulmaktadır. Bu veriler ışığında, çeşitli ajanlar ya da ilaçlar aracılığı ile sağlanacak VGSC inhibisyonunun, kanser metastazında terapötik bir değer taşıyacağı yönünde umut verirken, insanların yaşam süresi üzerinde ve yaşam kalitesini artırmada yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

Haziran 2016, 114 sayfa.

Anahtar kelimeler: Ranolazine, Prostat Kanseri, Dunning Modeli, Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı (VGSC), $Na_v1.7$

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION WITH DIFFERENT TECHNIQUES OF VOLTAGE-GATED NA⁺ CHANNEL ACTIVITY ON THE RAT PROSTATE CANCER

Selma KÜÇÜK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Cancer disease, the prevalence of which is gradually increasing with the effect of various factors today, is among the most important health problems of our age due to its high mortality and morbidity, treatment costs, duration and side effects. It is understood that the deaths that occur as a result of cancer result more from metastases than primary tumours. Intensive studies on understanding the mechanisms under the formation of metastasis have revealed that voltage-gated sodium channels (VGSC) play a role as a factor that affects the metastatic process and have the potential of providing new treatment options and being a prognostic marker. In gradually increasing experimental studies, it has been shown that prostate cancer cells have VGSCs and these channels contribute to the metastatic advancement of the disease using electrophysiological and molecular methods. Especially the expression of Na_v1.7 subtype of VGSCs was shown in these cells. It was observed that VGSCs are expressed in many carcinomas, including prostate cancer, breast cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, colon cancer and cervical cancer, and it was determined that Na_v1.7 is responsible for the metastatic behaviours in prostate cancer. Many studies on prostate cancer and breast cancer that bear similarities in such aspects as etiologic factors, being hormone dependent, metastatic character, etc., have been carried out for a long time in the studies on the hypothesis that “VGSCs have a strengthening effect on the metastatic potential of cancer cells, and the metastatic advancement can be suppressed by blocking the channels.”

In this study, it was aimed to examine the effect of Ranolazine (RNL), the effect of which was shown on various ion channels as well as being an effective drug in the treatment of chronic angina used in the clinic, on the Dunning model rat prostate cancer at the protein level of Na_v1.7 channel and its presence at the molecular level.

In this study, the detection of Na_v1.7 in VGSCs in which it was determined that the heterotopic expression of VGSCs in carcinogenesis and metastasis is responsible for metastasis in the *in vivo* Dunning prostate cancer model formed with the inoculation of strongly metastatic Mat-LyLu cells to rats and the effect of RNL (2,5 µM - 5 µM) drug on metastasis using different doses; whether it is protected in primary tumour, lung metastases and prostate glands were investigated using immunohistochemical, immunofluorescence, western blott and real-time PCR methods.

Consequently, the presence of Na_v1.7 channel as a result of the treatment with RNL on the Dunning model prostate cancer was examined for the first time. The data showing that 2,5 µM and 5 µM doses of RNL, which is a persistent current blocker, reduce prostate cancer metastasis are revealed for the first time. These data give hope that the inhibition of VGSC that will be ensured through various agents or drugs will have a therapeutic value in cancer metastasis, and they also point out that the need for the electrophysiological revealing of the VGSC inhibition profiles of the drugs to be used in clinical studies in the future will arise.

June 2016, 114 pages.

Keywords: Ranolazine, Dunning Model, Prostate cancer, Voltage-gated sodium channel (VGSC), Na_v1.7

1. GİRİŞ

Hücrelerin kontrolsüz bölünme ve büyümeleri olarak tanımlanan kanser, her yıl dünya çapında yaklaşık 14 milyon kişiye tanı konulmasına sebep olmakta ve kanser nedeniyle hayatını kaybedenlerin sayısı yılda yaklaşık 8,2 milyonu bulmaktadır. Türkiye’deki durum incelendiğinde ise, T.C. Sağlık Bakanlığı verilerinde 2000-2006 yılları arasında 396 bin kanser olgusu bulunmuştur. Her yıl ortalama 140 bin kişi kanserden ölmekte ve 150 bin kişi kanser tanısı almaktadır. 2030 yılında ise, bu rakamın 22 milyona ulaşacağı beklenmektedir (Uğur, 2014). 2008-2010 yılları arasında yapılan bir araştırmada erkeklerin yaşamları boyu kanser gelişme olasılıkları incelenmiş ve prostat kanserinin ilk sırada yer aldığı saptanmıştır (Kutluk, 2014).

Prostat kanseri Amerika’da, deri kanserleri dışında, erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. 2013 yılında, yaklaşık 238.590 kişiye prostat kanseri tanısı konulmuştur ve bu sayı tüm yeni tanı alan kanser türlerinin yaklaşık %28’ini oluşturmaktadır (Hacıbekiroğlu ve diğ., 2015). Aynı yıl, 29.270 prostat kanserine bağlı ölüm gerçekleşmiş olup, prostat kanseri; kansere bağlı ölümlerde yaklaşık %10 sıklıkla, ikinci sırada yer almaktadır (Siegel ve diğ., 2013). Ülkemizde ilk kez İzmir’de yapılan tek nüfus tabanlı kanser kayıt sistemi insidans çalışmasında prostat kanseri, en sık görülen beşinci kanser olarak tespit edilmiş ve 1995-1996 yılları arasındaki insidansı 9,1/100.000 olarak bildirilmiştir (Zorlu ve diğ., 2004). Prostat kanseri insidansı 1995’ten bu yana %1,7 artış göstermesine karşın, mortalite oranı 1994’ten itibaren her yıl %4 azalmaya devam etmektedir (Chan ve diğ., 2004). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri Yıllığında (2013) yer alan 2010 yılı istatistiklerine göre, Türkiye’de, prostat kanserinin yıllık insidansı 100.000’de 36,3’tür. Prostat kanserinin görülme sıklığının ileri yaşlarda artması ve yaşam süresinin uzaması, hastalığın prevalansını göreceli olarak artırmakta, dolayısıyla hastalığa dair tanı yöntemlerinin güvenilirliği önem kazanmaktadır (Ferlay ve diğ., 2010). Prostat kanserinin oluşumu ile ortaya çıkan ve hastalığın yayılmasına neden olan metastatik süreç, farklı tedavi yöntemlerinin belirlenmesi aşamasında önemli bir kilit noktasını oluşturmaktadır. Kanser metastatik yayılımı üzerine çalışmalar hızla ilerlemektedir.

Metastaz kavramı; büyüyen primer tümör kitlesindeki invaziv karakterli kanser hücrelerinin, primer tümörden uzakta, vücudun bir başka bölgesinde veya organında ikincil tümörleri meydana getirmesi şeklinde tanımlanabilmekte ve kanserle mücadelede en önemli problem olmaya devam etmektedir. Metastatik evrede iken, tanı konmuş ya da primer tümöre yönelik başarılı bir tedavi yapılmış vakaların, ilerleyen dönemlerinde metastaz oluşumu gerçekleşmekte ve bu hastaların, genel olarak en ciddi prognoza sahip oldukları görülmektedir (Khanna ve Hunter, 2005; Tapon ve Ziebold, 2008). Böyle hastaların tedavi şanslarını arttırabilmek için, metastaz biyolojisinin kapsamlı şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Uzun zamandır devam eden çalışmalar, hücre membranında yer alan iyon kanallarının tümör gelişiminde çok önemli rollere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Normal bir epitel hücresinin, kanser hücresine değişimi sırasında iyon kanal ekspresyonu ve/veya aktivitesi üzerinde etkili olan bir dizi genetik değişiklik meydana gelmektedir. Değişen iyon kanal aktivitesi ise, tümörün çoğalmasını desteklemektedir (Kunzelmann, 2005). İyon kanallarının bu patofizyolojik özelliklerinin araştırılması, en ilginç çalışma sahalarından birini oluşturmakta ve kansere karşı açılan savaşta yeni tedavi seçenekleri vaatmektedir (Schonherr, 2005). Prostat, meme, kolon gibi, bazı kanser türlerinde gözlenebilen voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC) upregülasyonu metastatik hücre davranışlarını etkin hale getirmektedir (Brackenbury ve Djamgoz, 2006). VGSC ekspresyonunun metastatik süreçte hızlandırıcı bir faktör olarak rol oynadığını ve hastalığın teşhis ve tedavisinde bir markır olma potansiyeli taşıdığını gösteren tüm çalışmalar VGSC'lerin prostat kanserinde yeni terapötik bir hedef olduğunu ortaya koymaktadır (Le Guennec ve diğ., 2007; Nakajima ve diğ., 2009; Yıldırım ve diğ., 2009; Djamgoz ve diğ., 2014; Fraser ve diğ., 2014a).

Kanserden kaynaklanan ölümlere bakıldığında, klinik yönden önem taşıyan temel etkenin; primer tümörden çok, bu tümörden kökenlenen sekonder tümörler, yani metastazlar olduğu dikkati çekmektedir (Nandana ve Chang, 2014; Nelson ve diğ., 2015). Bu sebeple, uzun yıllardır gerek *in vitro* gerekse *in vivo* olarak yürütülen pek çok çalışma, oldukça karmaşık ve çok basamaklı bir süreç olan metastaz kavramının aydınlığa kavuşturulması üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla, yürütülen çalışmalar, iyon kanallarının, bazı kanserlerin gelişiminde ve yayılımında önemli rollere sahip

olduğunu, bunlardan, özellikle VGSC'lerin, metastatik süreçte belirgin bir etkisinin bulunduğunu ve yeni tedavi metotlarının geliştirilmesine ışık tutmasının yanı sıra prognostik bir markır olma potansiyeli taşıdığını ortaya çıkarmıştır. VGSC'lerin kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde kuvvetlendirici bir etkiye sahip olduğunun tespit edilmesiyle birlikte, bu kanalların bloke edilerek metastatik ilerleyişin önüne geçilebileceğini ileri süren görüşler kuvvet kazanmaya başlamıştır (Grimes ve diğ., 1995; Laniado ve diğ., 1997; Diss ve diğ., 2001; Diss ve diğ., 2005, Nakajima ve diğ., 2009; Shan ve diğ., 2014; Patel ve Brackenbury, 2015).

Meme kanseri, lenfoma, küçük hücreli ve küçük hücreli-dışı akciğer kanseri, mezoteliyoma, nöroblastoma, servikal kanser ve melanoma gibi pek çok insan karsinomasını içeren kanser türlerinde *in vitro* ve/veya *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda VGSC ekspresyonunun varlığı ve fonksiyonel VGSC aktivitesinin karsinomaların genel bir özelliği olabileceğini ortaya koymuştur (Chioni ve diğ., 2009). Tetrodotoksin (TTX) gibi selektif kanal blokerleri ya da poliklonal antikorlar kullanılarak veya gen düzeyinde VGSC aktivitesinin inhibe edilmesi sonucu başta motilite ve invazyon olmak üzere (Grimes ve diğ., 1995; Laniado ve diğ., 1997, Bennet ve diğ., 2004; Roger ve diğ., 2007; Gillet ve diğ., 2009; House ve diğ., 2010; Hernandez-Plata ve diğ., 2011) morfolojik genişleme (Fraser ve diğ., 1999), galvanotaksis (Djamgoz ve diğ., 2001; Fraser ve diğ., 2005), lateral ve transvers hücre hareketi (Fraser ve diğ., 2003; Brackenbury ve Djamgoz, 2006; Fulgenzi ve diğ., 2006; Uysal-Onganer ve Djamgoz, 2007; Gao ve diğ., 2010), salgılayıcı membran aktivitesi (Mycielska ve diğ., 2003; Onganer ve Djamgoz, 2005), gen ekspresyonu (Mycielska ve diğ., 2005a; Brackenbury ve Djamgoz, 2006) ve adezyon (Palmer ve diğ., 2008) gibi metastaz ile ilişkili hücre hareketlerinin baskılanabildiği gösterilmiştir.

Sıçan ve insan prostat kanser hücrelerinde farklı tiplerde VGSC'ler bulunmaktadır. (Laniado ve diğ., 1997). Grimes ve arkadaşları (1995) tarafından *in vitro* olarak yetiştirilen Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücreleri ve TTX kullanılarak yürütülen elektrofizyolojik çalışmada, kuvvetli metastatik karakterdeki MAT-LyLu hücrelerinde VGSC akımı ölçülürken zayıf metastatik AT-2 hücrelerinde bu akım tespit edilememiştir. Mat-LyLu hücrelerinde patch-clamp tekniği kullanılarak hücrelerin metastatik yeteneği ile VGSC'ler arasındaki ilişki ortaya konulmuştur (Grimes ve diğ.,

1995). *In vitro* bulguları destekleyecek şekilde Dunning sıçan prostat kanser modeli ile yapılan bir *in vivo* araştırmada VGSC'lerin prostat kanser hücrelerinin metastatik davranışlarında rolü olduğu ve bu kanalların TTX ile bloklanması metastazı baskıladığı gösterilmiştir. (Altun ve Djamgoz, 2008; Yıldırım ve diğ., 2012). Nelson ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir başka çalışmada, meme kanseri dokuları, normal meme dokuları ile kıyaslandığında SCN1B mRNA / β_1 proteininin up-regüle olduğunu bulmuşlardır. β_1 upregülasyonunun, meme kanserinin ksenograft modelinde tümör büyümesini ve metastazı önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir. β_1 'in aşırı ekspresyonunun da, damarlanmayı arttırdığı ve primer tümörlerde apoptozu azalttığı tespit edilmiştir (Nelson ve diğ., 2014b).

Bu çalışmaların ışığında, metastaz oluşumunun altında yatan mekanizmaların anlaşılması üzerindeki yoğun çalışmalardan bir kısmı "VGSC'lerin, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde kuvvetlendirici bir etkiye sahip olduğu ve kanalların bloklanmasıyla metastatik ilerlemenin baskılanabileceği" hipotezi çerçevesinde yürütülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan ve kronik anjina tedavisi için FDA onayı alan Ranolazine (RNL), geç sodyum akımı inhibitörüdür. Mekanizması, Na^+ kanal blokeri olarak iskemi ve reperfüzyon sırasında Na^+ bağımlı intraselüler Ca^{+2} 'nin aşırı yüklemesini azaltarak (Belarddinelli ve diğ., 2006), kalpteki diastolik fonksiyonlar ile iskemi sonrasındaki bozuklukları azaltmaktır (Filardi, 2011). Literatürde *in vitro* ortamda hücre hareketleri üzerine RNL'nin etkilerinin incelendiği az sayıda çalışma bulunmaktadır. *In vitro* olarak yürütülen ve %2 oksijen içeren akut hipoksik ortamda yetiştirilen MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinin transvers hareketini hem TTX (10 μM) hem de, RNL (300 μM)'nin tamamen baskıladığı ve bu baskılamanın Na^+ kanallarını bloke ederek gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Djamgoz ve Onkal, 2013). Meme kanserinin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak farklı dozlarla araştırıldığı bir başka çalışmada RNL'nin, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin *in vitro* daki giriciliğini azaltmasının yanısıra, 50 mg/kg/gün dozunun meme kanserli farelerdeki akciğer metastaz kolonizasyonunu da anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir. Na_v 1.5'in aşırı ekspresyonunun gözlemlendiği bu meme kanseri hücrelerinde VGSC'lerin, RNL ile bloke edildiğini belirten Driffort ve diğ., (2014) RNL'nin kanser tedavisinde kullanılabilecek bir bloker olduğunu ileri sürmüşlerdir.

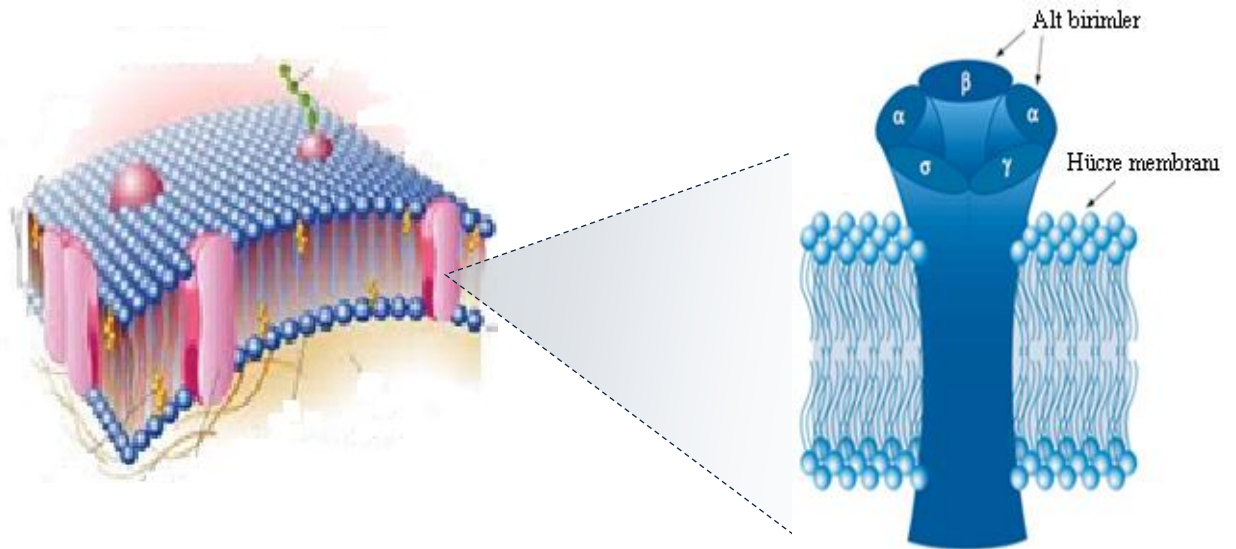
Grubumuz tarafından RNL'nin VGSC blokeri olarak değerlendirildiği bir çalışmada Dunning prostat kanserli sıçanların 5 μ M RNL ile tedavileri sonucunda, akciğer metastaz sayısında ve metastazların büyüklüklerinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Altun ve diğ., 2014).

Çalışmada, VGSC'lerin karsinogenezdeki ve metastazdaki heterotopik ekspresyonunun; güçlü metastatik Mat-Lylu hücrelerinin sıçanlara inokülasyonu ile oluşturulan Dunning prostat kanseri modelinde, metastazdan sorumlu olduğu belirlenen $Na_v1.7$ 'nin saptanması ve ekspresyonunun primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezi dokularında korunup korunmadığının farklı yöntemlerle değerlendirilerek, hücre ve dokulardaki $Na_v1.7$ miktarını karşılaştırmaya ve böylece VGSC kanalının kanserdeki muhtemel rolüne katkı sağlanması amaçlanmıştır. Aynı zamanda anjino pektoris tedavisinde kullanılan VGSC blokeri olarak bilinen RNL'nin $Na_v1.7$ kanalı üzerindeki etkisinin, primer tümörde ve tümörün metastatik ilerleyişinde nasıl bir rol alacağı araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. İYON KANALLARI

İyon kanalları, hücre zarında bulunan ve yüzeye tutunmuş karbonhidrat gruplarını içeren hidrofilik yapıdaki transmembran proteinlerdir (Foster ve diğ., 1999; Denac ve diğ., 2000). Hidrofilik yapıda olan iyon kanalları, hücre zarının lipid kısmından geçiş yapamayan iyonların taşınmasında görevli bir protein kompleksidir. Kanal proteinleri özellikle inorganik iyonları taşıdığı için ‘iyon kanalları’ olarak da isimlendirilir. İyon kanalları hücre membranında 3-5 Å⁰ çapında porlar oluşturmakta ve iyonların hareketi bu porlar aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Şekil 2-1). İyon kanalları açık oldukları zaman, Na⁺, K⁺, Ca⁺² ve Cl⁻ gibi spesifik oldukları iyonların elektrokimyasal derecelenmeleri doğrultusunda zardan pasif olarak geçmelerine olanak sağlamaktadır (Alberts ve diğ., 2008).



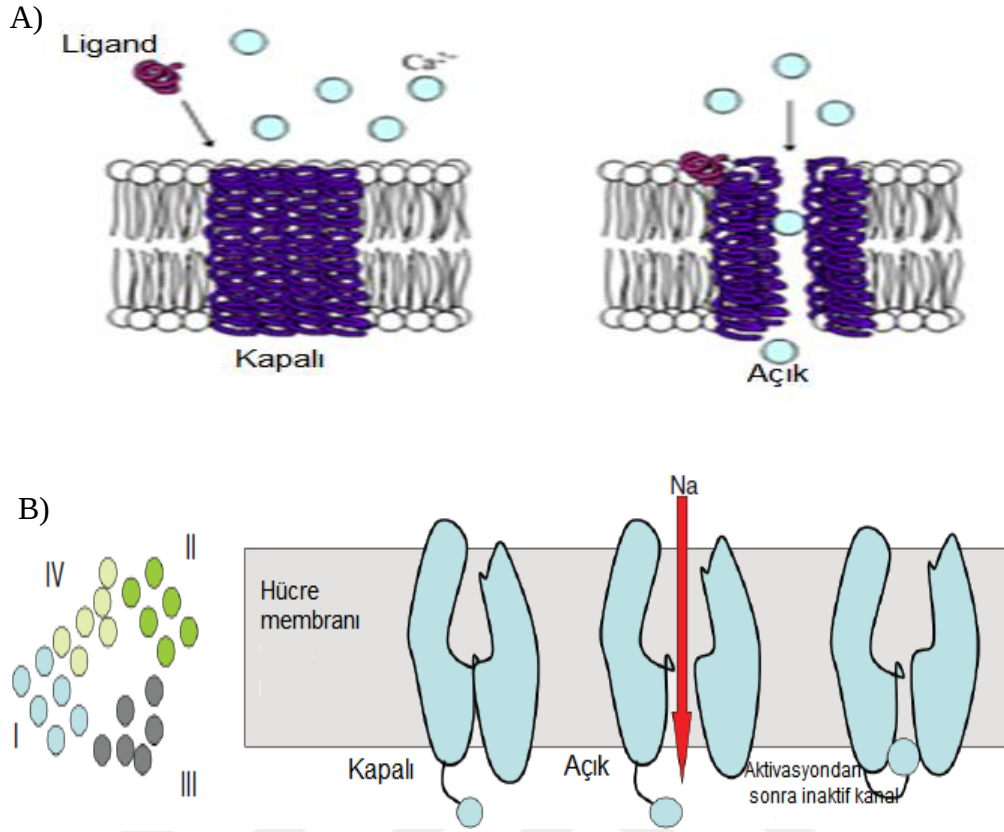
Şekil 2.1: Hücre membranı ve membrana yerleşmiş olan iyon kanalı şeması.

2.2. İYON KANALLARININ BİYOLOJİSİ VE FONKSİYONU

İyonların membranlardaki hareketi bakterilerilerden insanlara kadar evrimsel olarak korunmuştur. Membran potansiyelinin kaynağı, kanallar boyunca iyon akımıdır ve hücrenin elektriksel uyarılabilirliği için olmazsa olmazdır. Bu iyon translokasyonunun aracılık ettiği hücresel olaylardan birisi de ozmotik dengenin yani hücresel pH'nın düzenlenmesidir (Cannon, 2007).

İyon kanalları, iyonların geçişini düzenleyerek sinir ve kas gibi hücrelerde membran potansiyelinin oluşumuna aracılık ederler. Seçici geçirgenlerdir ve her biri belli iyonların taşınması ile görevlidir. Bu seçicilik ise, iyonun hacimsel büyüklüğüne bağlıdır. İyon kanallarının spesifik bir uyarıya cevap olarak kısa bir süre açılıp sonra tekrar kapanmasını sağlayan kapılara sahip olma özellikleri, onları hücre zarında bulunan basit geçitler olmaktan çıkartarak işlevlerinin temelini oluşturur. İyon kanallarının açık veya kapalı olma durumu, hücre zarı potansiyelindeki değişim (voltaj kapılı kanallar) veya nörotransmitter, iyon gibi hücre dışı bir ligantın kanala bağlanması (ligand kapılı kanallar) şeklindeki farklı mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir (Terlau ve Stühmer, 1998; Pollard ve Earnshaw, 2004). Bu kanallar açılıp kapanma özelliklerine bağlı olarak iki büyük alt sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2-2) (Alberts ve diğ., 2008; Bernard ve Shevell, 2008)

1. Ligand kapılı iyon kanalları
2. Voltaj kapılı iyon kanalları.



Şekil 2.2: İyon kanallarının iki büyük sınıfı, A) Ligand kapılı iyon kanalı, B) Voltaj kapılı iyon kanalı.

2.2.1. Ligand Kapılı İyon Kanalları

Yapısı iyi tanımlanmış olan ve açılmak için elektrik yükünden ziyade nörotransmitterler veya kimyasal ajanlar gibi özel bir liganda ihtiyaç duyan kanallardır. Bunlar Na⁺ ve Ca²⁺ kanalları ile aynı yapıda protein gruplarına sahiptir (Şekil 2-2) (Purves ve diğ., 2008). Ligandın kanala bağlanma bölgesine bağlı olarak; hücre içi ligand kapılı kanallar ve hücre dışı ligand kapılı kanallar olarak iki ana grupta toplanmaktadır.

2.2.1.1. Hücre İçi Ligand Kapılı Kanallar

Sitoplazmik Ca²⁺, halkasal nükleotidler (örneğin cAMP) veya trimerik guanozin trifosfataz (GTPaz)'ın (G proteini) β/γ alt birimlerine duyarlı kapı kanallar, evrimsel olarak K⁺ kanallarından farklılaşmışlardır (Connolly ve Wafford, 2004; Purves ve diğ., 2004). Hücre içi ligand kapılı kanallara daha çok duyu organlarındaki hücrelerde rastlanmaktadır. Hücre içi halkasal nükleotid kapılı iyon kanalları duyu sisteminde özellikle koku ve görme de çok önemlidir. Koku molekülleri, hücre zarındaki yedi

sarmallı resöptörlere bağlanarak koku reseptörlerini uyarır. Bu reseptörler G protein aracılığıyla sitoplazmik cAMP konsantrasyonunu artırır. cAMP, cAMP kapılı katyon kanallarının açılmasını sağlar, zar depolarize olur ve aksiyon potansiyeli oluştururlar. Görme iletiminde de halkasal nükleotid kapılı kanal kullanılır. Işık, yedi sarmallı bir reseptörü aktifleştirir, bu da sitoplazmik cGMP seviyesini azaltır. Bu azalma cGMP kapılı kanalların kapanmasına, fotoreseptör, hücre zarının hiperpolarize olmasına ve nörotransmitter salgılanmasının azalmasına neden olmaktadır.

2.2.1.2. Hücre Dışı Ligand Kapılı İyon Kanalları

Hücre dışı ligand kapılı iyon kanalları bir nöronun aksonu ile diğer nöronun dendriti veya kas hücreleri arasındaki iletişimi sağlarlar. Bu iletişim sinaps yoluyla gerçekleşir. İletici taraf yani presinaptik uç, nörotransmitter olarak adlandırılan kimyasalların ekzositozu için özelleşmiştir. Bu nörotransmitterler, glutamat, asetilkolin, serotonin, glisin ve γ -aminobutirik asit (GABA)'dır. Sinir ucuna bir aksiyon potansiyeli ulaştığında, voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları Ca^{+2} iyonlarının sitoplazmaya geçişini, bu da sinaptik vesiküllerin nöronlarla kaynaşmalarını sağlar. Böylece nörotransmitterler sinaptik aralığa (hücre dışına) geçmiş olur. Bu nörotransmitterler postsinaptik zarda yer alan ligand kapılı iyon kanallarını aktifleştirirler (Yamakage ve Namiki, 2002).

Glutamat reseptörü kanalı: Glutamaterjik iletim, öğrenme ve bellek oluşumlarının altında yatan uzun süreli değişikliklerde kendini ortaya koymaktadır. Hem Na^{+} hem de K^{+} kanalına karşı geçirgen olan katyon kanalına, bir glutamat molekülünün bağlanması, kanalın açılmasına, dolayısıyla da zarın depolarizasyonuna neden olur. Bu depolarizasyon hücre zarını uyararak voltaj-duyarlı Na^{+} kanallarının açılmasına ve aksiyon potansiyelinin oluşumuna yol açmaktadır (Paoletti ve Neyton, 2007; Olive, 2009).

Nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR) kanalı: Omurgalılarda bulunan nAChR'ler, kas hücrelerinin postsinaptik kanallarını oluşturmakta ve doğrudan nörotransmitterlerle açılmaktadırlar. Kası destekleyen nöronun elektriksel olarak uyarılması çok sayıda nAChR ile birleşmeye yetecek kadar asetilkolin salgılar. Kanalların açılması, sodyum ve potasyum iyonlarının akımında değişikliğe sebep olur ve bir depolarizasyon meydana gelir. Bunun sonucunda da, voltaj-kapılı kanallar açılır ve kaslar kasılır.

Ayrıca bu kanallar nikotine de bağlanabildiklerinden dolayı ‘nikotinik kanal’ olarak da isimlendirilirler (Aidler ve Stanfield, 1996).

GABA ve Glisin reseptör kanalları: Memeli merkezi sinir sisteminde (MSS) hızlı inhibitör iletim, GABA_A veya glisin reseptörlerindeki klora duyarlı kanalların açılmasını gerektirir. GABA_A reseptörleri beyine dağılmışken glisin reseptörleri büyük oranda beyin sapı ve omuriliğe dağılmıştır. Glisin reseptörü, ACh reseptörüne benzer şekilde beş alt birim içerir. Ortak bir merkezi açıklık etrafında pentamerik düzende ($\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$) gruplanmış beş alt birimden oluşur (Aidler ve Stanfield, 1996; Ben-Ari ve diğ., 1997; Taketo ve Yoshioka, 2000).

2.2.2. Voltaj Kapılı İyon Kanalları

Voltaj kapılı iyon kanalları (VGIC) büyük, geniş bir gen ailesinin üyesidir. Bu ailedeki birçok iyon kanalı membran depolarizasyonuna yanıt olarak açılır (Şekil 2-2) ve yüksek derecede voltaja bağımlılık gösterir (Hernandes ve Troncone, 2009). Bu sınıftaki iyon kanalları voltaj-kapılı Na⁺ ve K⁺ kanallarıdır. Hodgkin ve Huxley’e göre akson membranındaki iyonik akım, membranın sodyum ve potasyum iyonlarına olan geçirgenliğinin değişmesine dayanmaktadır (Aidler ve Stanfield, 1996).

VGIC, yapısal olarak birbiriyle ilişkili toplam 143 sinyal proteininden oluşan geniş bir ailedir (Yu ve Catterall, 2004). VGIC’lerin en önemli fizyolojik rolü, elektriksel sinyallerin oluşumuna katılmaktır. Kas kasılması, hormon sekresyonu, çevresel uyarıların alınması, bilginin değerlendirilmesi ve oluşan cevabın periferik dokulara iletilmesi gibi işlevler elektriksel sinyaller tarafından kontrol edilir. Ayrıca, VGIC’ler sekresyon, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi gibi hücresel olayların sinyallenmesinde de görev alan moleküllerdir (Yu ve diğ., 2005; Catterall ve diğ., 2007). Tek hücre düzeyinde bile, yapısal ve işlevsel açıdan çok fazla çeşitlilik gösteren VGIC’lerin bu çeşitlilikleri ve hücre içi düzenlenmelerinde; ekspresse oldukları genlerin çeşitliliği, mRNA transkriptlerinin alternatif kesilip eklenmesi ile kanal kinetiğinde farklılığa yol açan translasyon sonrası değişimler (fosforilasyon, glikolizasyon vb.) ve kanal proteinin hücre içi lokalizasyonu, hücre zarındaki yoğunluklarında rol oynayan mekanizmalardır (Schulz ve diğ., 2008).

2.2.2.1. Voltaj kapılı sodyum kanalı

Voltaj kapılı sodyum kanalları intrinsik nöron ve kas uyarılabilirliğinin anahtar mediyatörleridir. Sıçan beynindeki sodyum kanalları temel büyük bir α alt birim ile iki küçük yardımcı alt birim ($\beta 1$ - $\beta 4$) den oluşmaktadır (Cannon, 2007; Mantegazza ve diğ., 2010). Epilepsi, migren, nörodejeneratif hastalıklar ve nöropatik ağrı gibi birçok nörolojik hastalıklar, sinirsel uyarılabilirlik açısından bozukluk içermektedir. Bu hastalıklarda VGSC'lerin yer aldığına veya etken olduğuna dair çalışmalar bulunmakta ve bu çalışmaların sayıları giderek artmaktadır (Mantegazza ve diğ., 2010).

2.2.2.2. Voltaj kapılı kalsiyum kanalı

Kalsiyum kanalları birçok omurgasızların kaslarında ve omurgalıların düz kaslarında voltaj kapılı depolarizasyonunun tümünden sorumludurlar ve omurgalıların kalp kasında aksiyon potansiyelinin plato fazı boyunca depolarizasyonunu sağlamakla görevlidir. Birçok kas ve salgı hücresinde, sinir uçlarında kalsiyum iyonu derişimini kontrol etmekte kritik önemleri vardır. Ayrıca, ikincil haberci oldukları için, kalsiyum iyonlarının membran potansiyelini etkileyebilecek başka hücre içi kontrol mekanizmalarını da düzenleme etkisi göstermektedir (Aidler ve Stanfield, 1996; Yamaage ve Namiki, 2002; Catterall ve diğ., 2005).

Kalsiyum kanalları; membran uyarılabilirliğinin, iletim maddelerinin salımının ve gen ekspresyonunun önemli modülatörleridir. Mutasyonlar kalsiyum kanal girişini etkileyebilir ve kanal hasarları epilepsi patojenezine katılabilir. Ancak, buna yol açan mekanizmalar tam olarak tanımlanmamıştır (Steinlein ve Noebels, 2000; Nelson ve diğ., 2006).

2.2.2.3. Voltaj kapılı klorid kanalı

Bakterilerden mayaya hatta insanlara kadar uzanan geniş yelpazedeki organizmalarda klorid kanallarının (ClC) varlığı gösterilmiştir. Bu klorid kanalları pH regülasyonunda, homeostaside, organik çözünmüş madde de, hücre migrasyonu, proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında rol oynamaktadır. Her birinin ortasında por bulunan iki alt birimden oluşurlar. Aktif olduklarında porlardan biri veya her ikisi Cl^- iyonlarını iletir. Her alt birim bir ile on iki arasında transmembran segmentten meydana gelmiştir. Bazı klorid kanalları sadece voltaj kanalları ile aktive olurken bazıları Ca^{+2} tarafından bazıları da ekstraselüler ligandlar veya pH tarafından aktive edilmektedir (Li ve diğ., 2006; Suzuki

ve diğ., 2006). Bu ailenin iyi bilinen üyeleri iskelet kaslarında yer almaktadır (ClC0). Voltaj kapılı katyon kanalları gibi, bu kanallar da zar depolarize olduğunda açılır ve sonra inaktifleşir. Cl⁻ kanal genlerindeki mutasyonlar insanlarda görülen bazı hastalıklara neden olabilirler. Hasarlı iskelet kası klorid kanalları (ClC1) resesif ve dominant kas kasılmalarına sebep olurken, böbrek klorid kanallarındaki (ClC5) mutasyon, taş oluşumunun nedeni olarak ortaya çıkmaktadır (Li ve diğ., 2006; Suzuki ve diğ., 2006).

2.2.2.4. Voltaj kapılı potasyum kanalı

Membran depolarizasyonu voltaj kapılı potasyum kanallarını aktive eder. Bu kanallar bir kere açılınca konsantrasyon gradyenti boyunca potasyum iyonlarını elektrik alana karşı iletir. Dışa yönelen bu akım, membranın repolarizasyonuna neden olur. Potasyum kanalı birbirine eş olmayan alt birimlerden oluşan bir heteromultimerdir. Heteromultimer oluşturma yeteneği, potasyum kanallarının işlev çeşitliliğine olanak sağlar (Aidler ve Stanfield, 1996; Long ve Campbell, 2005).

2.3. VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALLARI (VGSC)

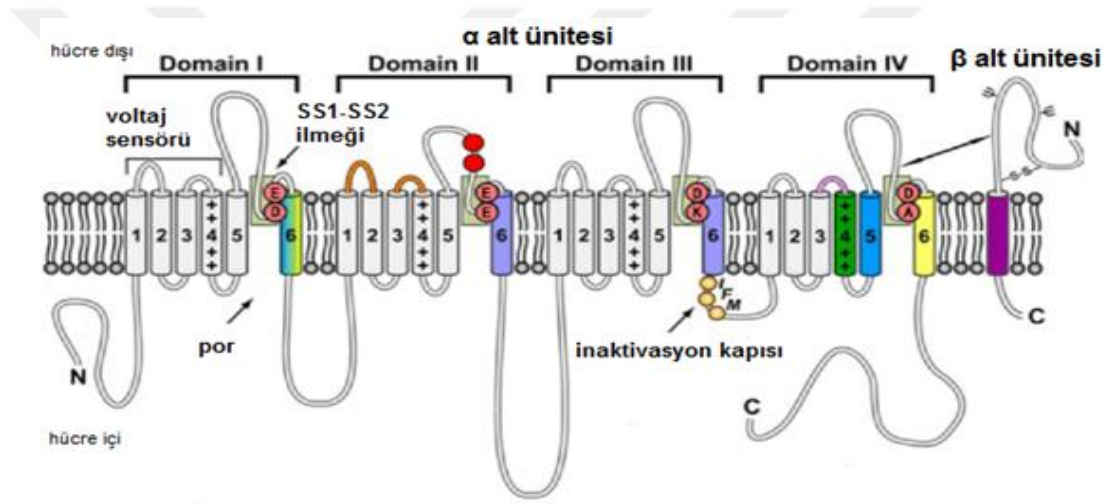
Voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC), hayvan hücrelerinde, zar depolarizasyonu ile aktive olarak aksiyon potansiyelinin başlatılmasını ve buna bağlı elektriksel uyarılabilirliğin düzenlenmesini gerçekleştirmektedir (Goldin, 2003). Elektrik sinyali üzerindeki ilk çalışmalar Hodgkin ve Huxley tarafından 1952 yılında sinir, kas ve diğer uyarılabilir hücrelerde başlamıştır (Hodgkin ve Huxley, 1952 a,b,c ve d). Sinirlerde başlatılan elektrik sinyallerinin, sodyum akımı ve voltaj-bağımlı aktivasyonu tarafından downregüle olduğunu gösteren ilk çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma, voltaj-kapılı sodyum kanalını ilk kez ortaya koymuş ve elektrik sinyal mekanizması hakkındaki ilk bilgileri sağlamıştır. 1970'li yıllarda çeşitli laboratuvarlarda yapılan çalışmalar ile multi reseptörler üzerinde nörotoksin hareketinin, voltaj bağımlı sodyum kanal kapısı ve iyon iletkenliği üzerindeki değişimi gösterilmiştir (Catterall, 1980). 1980'li yıllarda fotoafinite etiketleme ile sodyum kanallarının protein alt birimlerinin tespiti için akrep toksinleri kullanılmıştır (Beneski ve Catterall, 1980).

VGSC alt tiplerinin adlandırılmasında, kanalların aminoasit dizilimlerindeki benzerlik esas alınarak aile ve alt tipleri belirtilmektedir. Bu isimlendirme tekniğine göre sodyum (Na⁺), kanalın geçirgenliğe sahip olduğu iyonun kimyasal sembolünü Na_(v), voltajı ifade

eden kanalın esas fizyolojik regülatörünü takip eden ilk rakam Na_v (1.1) ise spesifik izoformlarını tarif etmektedir (Goldin ve diğ., 2000).

2.3.1. VGSC Yapısı ve Fonksiyonu

Yapısal olarak VGSC'ler, ~260 kDa'luk büyük bir α alt ünitesi ile 33-36 kDa'luk bir ya da iki adet yardımcı β alt ünitesinden oluşan heteromerik kompleks şeklindeki transmembran glikoproteinlerdir. VGSC'lerin α por oluşumu, dört homolog alanın altı adet transmembran segmentlerinden meydana gelmektedir. Por, her bir alanın 5. ve 6. transmembran segmentleri arasındaki membran döngüsünden oluşur (Şekil 2-3) (Catterall, 2000).



Şekil 2.3: VGSC'ler de α alt birim por oluşumu ve dört homolog alanın gösterimi (Zhang ve diğ., 2013).

VGSC'lerin uyarılabilen hücrelerde aksiyon potansiyelinin başlamasından ve iletiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Hille, 1992). Ayrıca α ve β alt birimlerinin diğer sinyal molekülleri ile etkileşim içinde bulunduğu saptanmıştır (Brackenbury ve Isom, 2008). VGSC'lerin α alt birimini kodlayan $Na_v1.1$ 'den $Na_v1.9$ 'a kadar dokuz adet gen bulunmaktadır ve bunlar SCN1A-SCN11A olan dokuz homolog üye tarafından kodlanmıştır (Tablo 2-1) (Catterall, 2000). Çeşitli α alt birimleri çoğu zaman doku spesifik ekspresyon modelleri ile üst üste gelebilmektedir (Goldin ve diğ., 2000). Bu α alt birimleri arasında önemli elektrofizyolojik ve farmokolojik çeşitlilik bulunmaktadır.

Tablo 2.1: VGSC α alt birimlerinin doku lokasyonları ve kanser ekspresyonları
(Goldin ve diğ., 2000; Brackenbury, 2012).

VGSC protein	Gen sembolü	Kromozomal lokasyonu [♦]	Doku lokasyonu	Kanser tipi
Na_v1.1	<i>SCN1A</i>	M:2 H:2q24	MSS, PSS	Yumurtalık
Na_v1.2	<i>SCN2A</i>	M:2 H:2q23-24	MSS	Prostat, Rahim ağzı, Mezotelyoma, Yumurtalık
Na_v1.3	<i>SCN3A</i>	M:2 H:2q24	MSS (embriyonik)	Prostat, Yumurtalık, Küçük hücreli akciğer kanseri
Na_v1.4	<i>SCN4A</i>	M:11 H:17q23-25	İskelet kası	Prostat, Rahim ağzı, Yumurtalık
Na_v1.5	<i>SCN5A</i>	M:9 H:3p21	Kalp kası	Meme, Rahim ağzı, Lenfoma, Nöroblastoma, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, Yumurtalık, Küçük hücreli akciğer kanseri
Na_v1.6	<i>SCN8A</i>	M:15 H:12q13	MSS, PSS, glia Ranvier boğumu	Meme, Prostat, Rahim ağzı, Lenfoma, Melonama, Mezotelyoma, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, Küçük hücreli akciğer kanseri
Na_v1.7	<i>SCN9A</i>	M:2 H:2q24	PSS Schwann hücresi	Meme, Prostat, Servikal, Lenfoma, Mezotelyoma, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, Yumurtalık
Na_v1.8	<i>SCN10A</i>	M:9 H:3p22-24	PSS (duysal nöronlar)	Prostat
Na_v1.9	<i>SCN11A</i>	M:9 H:3p21-24	PSS	Lenfoma, Küçük hücreli akciğer kanseri

♦ M: fare, H: insan. MSS: Merkezi sinir sistemi, PSS: Periferik sinir sistemi (Catterall, 2012; Zhang ve diğ., 2013).

Kanalın α alt birimlerinin alternatifli yapışmaları, fonksiyonel, gelişimsel ve spesifik doku değişkenliğini sağlamaktadır (Diss ve diğ., 2004).

VGSC alt tiplerinin dokulardaki dağılımları Tablo 2-1' de de görüldüğü gibi farklılık göstermektedir. $Na_v1.1$ - $Na_v1.3$ ve $Na_v1.6$ merkezi sinir sisteminde dağılım gösterirken, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ ve $Na_v1.9$ yüksek oranda periferik sinir sisteminde ekspresyone olmaktadır (Goldin, 2001; Ogata ve Ohishi, 2002; Zhang ve diğ., 2013).

Memelilerde tanımlanmış dört adet β alt birimi bulunmakta ve SCN1B-SCN4B genleri kontrolünde kodlanmaktadır (Tablo 2.2) (Brackenbury ve Isom, 2011; Catterall, 2012; Eijkelkamp ve diğ., 2012). β alt birimleri, α alt birimlerinin biyofiziksel özelliklerini ayarlamaktadır. Örneğin, $\beta1$ ve $\beta2$ akım yoğunluğunu, inaktivasyon hızını ve heterolog hücrelerin voltaj bağımlı hiperpolarizasyonunu artırır (Isom ve diğ., 1992, Isom ve diğ., 1995). Buna karşılık $\beta3$, HEK-293 hücrelerinde $Na_v1.3$ 'ün inaktivasyon ve aktivasyonunun voltaj bağımlılığını inaktive eder (Cusdin ve diğ., 2010), ve plazma membranında $Na_v1.5$ 'in hareketini yükselterek Na^+ akım yoğunluğunun artmasına neden olur (Ishikawa ve diğ., 2013).

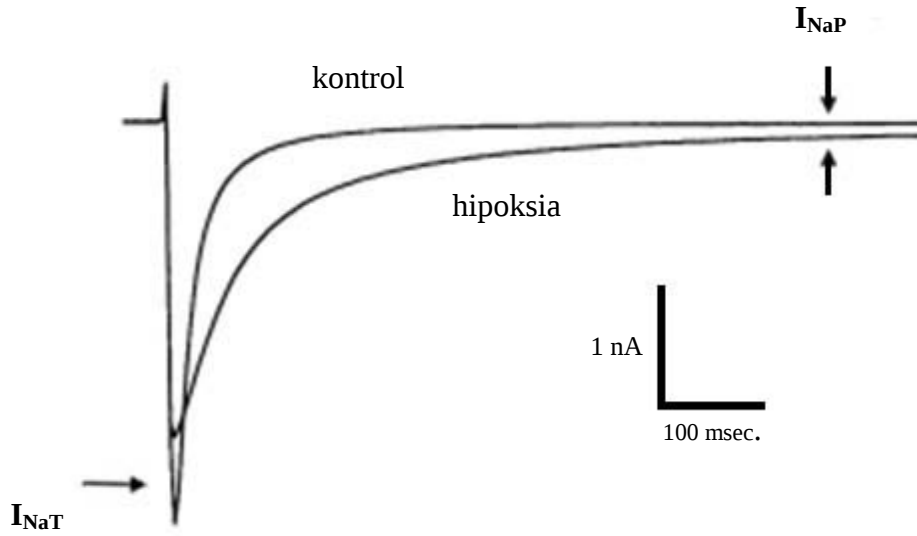
Tablo 2.2: VGSC β alt birimlerinin doku lokasyonları ve kanser ekspresyonları (Brackenbury ve Isom, 2011; Brackenbury, 2012).

VGSC Protein	Gen sembolü	Doku lokasyonu	Kanser tipi
$\beta1$	SCN1B	MSS, PSS, Kalp, İskelet kası, Böbreküstü, Glia	Meme, Prostat, Rahim ağzı, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
$\beta2$	SCN2B	MSS, PSS, Kalp, Glia	Meme, Prostat, Rahim ağzı, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
$\beta3$	SCN3B	MSS, PSS, Böbreküstü, Böbrek,	Prostat, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
$\beta4$	SCN4B	MSS, PSS, Kalp, İskelet kası	Meme, Prostat, Rahim ağzı, Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

2.3.2. VGSC'de Israrlı Akım

Kanser hücreleri tipik olarak, epitel ve nöronlar gibi, farklılaşmış hücreler ile kıyaslanan depolarize membran potansiyeli ile ilişkilidir (Kunzelmann, 2005). Tipik bir nöronun dinlenme halindeki potansiyeli -65 mV iken (Brackenbury ve diğ., 2010), metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin membran potansiyelleri ~15-30 mV arasındadır (Roger ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005; Brackenbury, 2012; Yang ve diğ., 2012). Depolarizasyonun ardından birkaç milisaniye içinde VGSC'ler açılır, hızlı bir şekilde inaktive olur ve repolarizasyona kadar inaktif olarak kalır (Hille, 1992). Bu nedenle, depolarize dinlenme potansiyelleri ile kanser hücrelerinde, VGSC'lerin büyük çoğunluğu inaktive edilmiş olacaktır (Catterall, 2014). Ancak, $\text{Na}_v1.5$ 'de dâhil olmak üzere bazı VGSC'ler tamamen inaktif olmaz ve Na^+ akımı zayıf da olsa ısrarlı bir şekilde devam eder (Crill, 1996; Ju ve diğ., 1996).

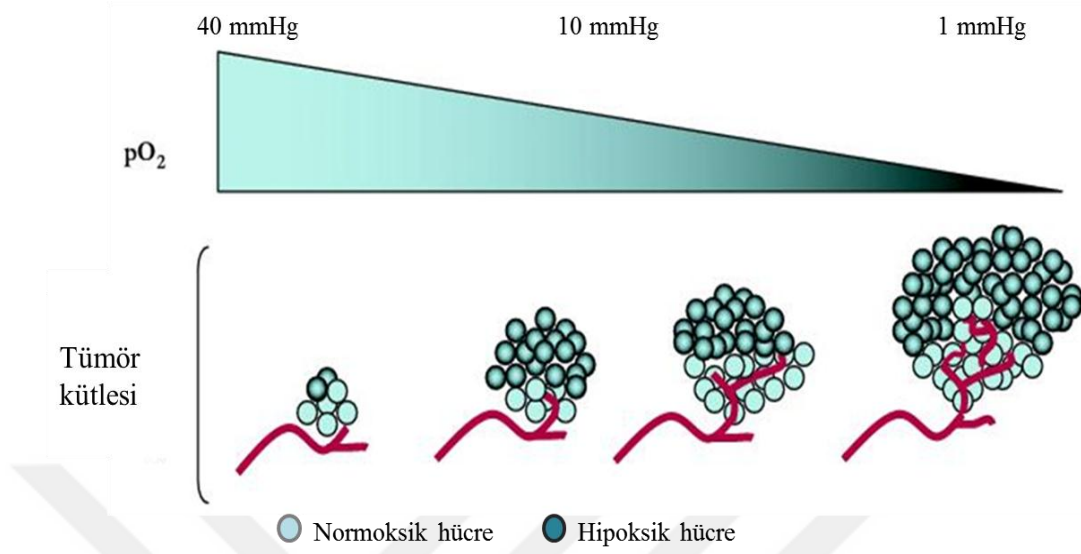
Zayıf olarak devam eden ısrarlı Na^+ akımının (I_{Nap} =persistent current), VGSC'lerin kanser hücre ekspresyonunda baskın olabileceği ve Na^+ akımının bu bileşenin spesifik olarak, hücre migrasyonunun ve invazyonunun gücünü artırabileceği Yang ve diğ. (2012) tarafından ileri sürülmüştür. VGSC aktivitesi ile oluşan membran akımı genel olarak iki farklı bileşenden oluşmuştur. Membran akımının birinci bileşeni 1 msn kadar süren geçici akım (I_{NaT}), ikinci birleşeni, 100 msn den 1 dakikaya kadar devam eden ısrarlı/geç akımdır. I_{Nap} , repolarizasyonda çok hızlı deaktif olur (Saint ve diğ., 1992) ve makroskopik düzeyde I_{NaT} ile aktivasyon özellikleri arasında oldukça az fark bulunmaktadır (Şekil 2-4). I_{Nap} 'nin büyüklüğü, geçici komponentin %1'i kadardır ki, sıçan miyositlerinde yapılan bir çalışmada -40 mV'a depolarizasyondan sonra 140 ms içerisinde pik I_{NaT} 'nin 53 nA, I_{Nap} 'nin ise, 300 pA olduğu bildirilmiştir (Nilius ve diğ., 1987; Josephson ve Sperelakis, 1989; Ju ve diğ., 1992; Saint ve diğ., 1992).



Şekil 2.4: Normal ve hipoksik ortamlarda VGSC akımı (Ju ve diğ., 1996).

Kardiyak hücrelerde I_{NaP} , I_{NaT} gibi aynı iyonik seçiciliğe sahiptir ve tek kanallar geçici akımı gibi aynı iletkenliğe, ortalama açık süre ve ters potansiyele sahiptir (Gintant ve diğ., 1984). I_{NaP} , lidocaine ve TTX gibi ajanlar tarafından bloklanmaya daha duyarlıdır (Saint ve diğ., 1992). I_{NaP} 'ın hipoksik ortamda geliştiği Hammarstrom ve Gage, (2002) tarafından gösterilmiştir. RNL, ısrarlı geç sodyum akımını yavaşlatmak için, kendi inaktif durumunu stabilize ederek, aksiyon potansiyelinin süresini uzatılabildiği gösterilmiştir (Belardinelli ve diğ., 2006; Hale ve diğ., 2008).

Oksijen yetmezliği durumu yani hipoksia, özellikle katı tümörlerin pek çok formunda yaygındır (Kaur ve diğ., 2005). *İn vivo* sağlıklı memeli dokusunda oksijen seviyesi hafif hipoksi %2,9 (ortalama %5,6) olmasına rağmen, tümör hücrelerinde genellikle yetersiz tümör damarlanması nedeniyle akut hipoksi ($<2\% O_2$) izlenmektedir (Şekil 2-5) (Brahimi-Horn ve Pouyssegur, 2007; 2009). Bu nedenle, ısrarlı akım özellikle kanseri de kapsayan pek çok durumda büyük bir öneme sahiptir. Tümör büyüdükçe merkezi kısmında giderek artan oranda görülen hipoksi, ısrarlı akımın artmasına neden olmaktadır (Djamgoz ve Onkal, 2013).



Şekil 2.5: Tümör büyümesinde hipoksia varlığının etkisi (Brahimi-Horn ve Pouyssegur, 2007).

2.4. PROSTAT KANSERİ VE METASTAZ

Bir organ veya dokuya ait hücrelerin kontrolsüz olarak yapısal bozukluklarıyla beraber çoğalması ile kanserleşme ortaya çıkmaktadır. Bu kontrolsüz hücre çoğalması, doku ve organdaki anatomik şekil bozukluğunu, büyüyen kitleyi yani tümörü oluşturur. Habis yani malign, kötü huylu tümörler, organizmanın normal büyüme kontrolünün dışına çıkarlar. Kontrolsüz ve anarşik düzen içindeki hücreler hızla çoğalırlar. Etrafındaki dokulara nüfuz edip, içe doğru büyüyerek hücrelerin fonksiyonlarını etkileyebildikleri gibi, kan ve lenf damarlarına da girip diğer organlara ulaşabilirler. Gittikleri organlara yerleşerek, çoğalmaya, metastaz oluşturmaya devam ederler (Sun ve diğ., 2010).

Prostat kanseri dünya çapında erkekler arasında görülme sıklığı açısından 2012 yılında yaklaşık olarak 1,111.689 yeni vaka ile birlikte, akciğer kanserinin (1,241.601 vaka) hemen ardından ikinci sırada yer almaktadır (Lopez-Abente ve diğ., 2014).

Epidemiyolojik gözlemlere göre, prostat kanserinin en önemli risk faktörleri; genetik predispozisyon, hormonlar, diyet, yaş, ırk ve çevresel faktörlerdir (Knudsen ve Vasioukhin, 2010). Ancak bu risk faktörlerinden kalıtım ve yaş daha geniş bir yer tutmaktadır. Birinci derecede akrabalarından baba, amca ve kardeşlerin birinde prostat

kanseri varsa, risk ikiye katlanmaktadır (Johns ve Houlston, 2003). Ayrıca 50 yaşın altındaki erkeklerde nadir görölmesine rağmen, yaşla birlikte belirgin bir biçimde yükselmekte ve 65 yaş üzeri erkeklerde prostat kanseri vakaları %70-85'e çıkmaktadır (Fournier ve diğ., 2004; Patel ve Klein, 2009; Nandana ve Chung, 2014). Coğrafi bölgelere bakıldığında da prostat kanseri insidansı ile mortalite oranı arasında farklılıklar görölmektedir (Ferlay ve diğ., 2010; Center, 2012). En yüksek insidansa Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ile Kuzey Avrupa'da, en düşük insidansa ise, Güney doğu Asya'da rastlanmaktadır. Ancak Asya kıtasından Havai'ye göç eden Japonlarda insidans artmakta ve ABD'ye göç eden Japonlarda risk, Amerikan halkınıninkine yaklaşmaktadır (Whittemore ve diğ., 1995; Cook ve diğ., 1999). Prostat kanseri, ABD'de en sık tanı konulan solid organ malignitesini oluşturmakta ve kanser ölümlerinde ikincilikteki sırasını korumaktadır. ABD'de 2012 yılında yaklaşık 240.000 prostat kanseri tanısı konmuştur ve 28.000'in üzerinde ölüm gerçekleşmiştir (Siegel ve diğ., 2012). Ülkemizde İzmir'de yapılan ilk insidans çalışmasında prostat kanseri en sık görülen beşinci kanser türü olarak tespit edilmiştir ve 1995-1996 yılları arasında insidans 9,1/100.000 olarak bildirilmiştir (Zorlu ve diğ., 2004). Meydana gelen ölüm sayısı ve görölme sıklığı açısından değerlendirilen 2009 yılındaki çalışmada insidans 100.000'de 36,1'e yükselerek ikinci sırayı almıştır (Gültekin ve Boztaş, 2014). Bu oranlar tüm kanser türleri için her geçen gün artmakta olup, 2008 yılında 12.7 milyon olan yeni vakanın, 2030 yılına kadar 22.2 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Bray ve diğ., 2012).

Prostat kanserinin etiyolojisinde yaşlılıkla ortaya çıkabilen hormonal değişiklikler, ileri yaşlardaki seks hormonları metabolizması yani, androjen-östrojen dengesindeki bozukluklar, kalıtsal ve somatik genetik mutasyonlar, immün sistemdeki değişimler ile beslenmenin kanser riskini artırdığı gösterilmiştir (Platz ve Giovannucci, 2004; Imamoto ve diğ., 2008). Beslenme alışkanlıklarında, yağ, kırmızı et, süt ve süt ürünleri, fazla kalsiyum alımı kanser riskini artırırken, likopen, yeşil çay, selenyum, vitamin E ve C gibi antioksidan desteklerin kanser riskini azaltıcı yönde rol oynadığı bilinmektedir (Sonn ve diğ., 2005; Haddad ve diğ., 2006; Lowe ve Frazee, 2006; Stacewicz-sapuntzakis ve diğ., 2008).

Prostat kanseri insidansı 1995'ten bu yana yıllık %1,7 oranında artış gösterirken, mortalite oranı 1994'den itibaren her yıl %4 azalmaya devam etmektedir (Chan ve diğ., 2004). İlk kez 1979 yılında Wang ve arkadaşları prostat duktal epitel hücreleri tarafından salınan dokuya özgü Prostat Spesifik Antijen (PSA)'nın bulunduğunu göstermişlerdir. Bu antijen, prostat duktal epitel hücreleri tarafından salınmaktadır ve prostat kanserinin varlığında serumda PSA değerinin yüksek olması ile tespit edilmektedir. Ancak, prostat kanserli hastaların insidansı, PSA'nın kliniğe girmesinden sonra, belli yaşın üzerinde kliniğe gelen tüm erkeklere bu test uygulandığından ve kanserli olmayan hastalarda da pozitif sonuç gösterebildiğinden dolayı artış göstermiştir (Wang ve diğ., 1979).

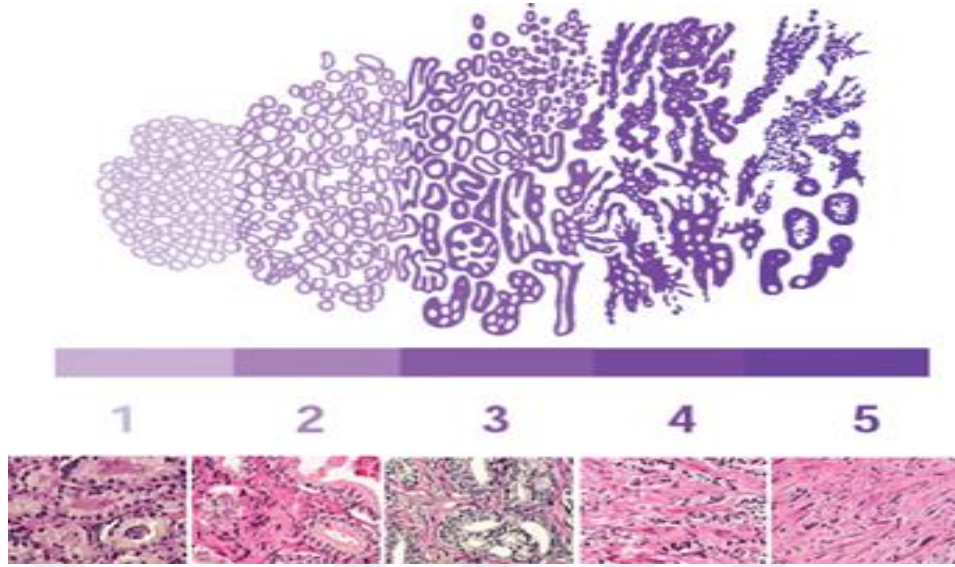
Prostat kanseri dışında benign prostat hiperplazisi (BPH), prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) veya prostatit (prostat iltihabı) olan hastalarda da PSA yüksekliği saptanabilmektedir. Verilere göre, 50 yaşındaki bir erkekte yaşam boyunca prostat kanseri gelişme riski ortalama %42 olup, klinik olarak bunun saptanma oranı %17,8 olarak bildirilmektedir (Jemal ve diğ., 2006). Ancak, kanda PSA düzeyi yüksekliği, prostat kanserinin yanı sıra prostat iltihabına veya BPH'a bağlı olarak da gelişmektedir. Bu nedenle, prostat kanseri açısından bir ön tanı kriteri olarak kabul edilse de, güvenilirliği tartışmalı bir tanı yöntemi olan PSA testinin, serbest PSA düzeyi, PSA yoğunluğu gibi parametreler ve prostat kanseri antijeni-3 gibi yeni biyomarkırlar ile birlikte ele alınması gerekmektedir (Chakravarti ve Zhai, 2003; Madu ve Lu, 2010; Prensner ve diğ., 2012).

PSA'nın yanı sıra son zamanlarda prostat kanserinde spesifik olduğu saptanan bir genetik mRNA yapısının araştırılması temeline dayanan prostat kanser antijeni-3 (PCA3) testi daha ortaya konmuştur. İdrara dökülen prostat epitel hücrelerindeki kansere spesifik olan mRNA molekülü aranmasını içeren bu testin yakın zamanda klinikte oldukça yaygın olarak kullanılacağı düşünülmektedir (Kok ve diğ., 2002, Madu ve Lu, 2010; Prensner ve diğ., 2012).

Prostat kanseri sırasıyla, lokalize evre (organa sınırlı) hastalık, lokal ileri evre hastalık, metastatik hastalık ve hormonal tedaviye dirençli hastalık evrelerinden oluşur. Prostat kanseri büyüme hızı, tümörün davranışına göre, çok yavaş büyüyen ve multifokal olmaya eğilimli bir kanser olarak bilinir. Prostat kanserinin en sık görülen histolojik tipi

ise, %98 oranında adenokarsinomdur. Geriye kalan prostat kanserleri %1-2 epitel hücreli kanser, %0,5-1 skuamoz hücreli kanser tiplerindedir (Eble, 2004; Epstein, 2007). Prostat adenokarsinomu ile ilişkili iki tip prekanseröz lezyon olduğu gösterilmiştir. Bunlar; transizyonel zon tümörleri için atipik adenomatöz hiperplazi (adenozis) ve periferik zon tümörleri için periprostatik intraepitelial neoplazidir (Young ve diğ., 2000). PIN, prostat karsinomunun öncül lezyonu olarak kabul görse de, adenozis bu açıdan tartışmalıdır (Epstein, 2006). PIN, düşük ve yüksek dereceli olarak ikiye ayrılır. Prostat kanseri gibi multisentriktir, yaş ile birlikte görülme sıklığı artmakta ve %70'i periferik zondan kaynaklanmaktadır. Prostat adenokanserlerinin %80-100'ünde PIN odaklarının mevcut olduğu bildirilmiştir (Qian ve diğ., 1997).

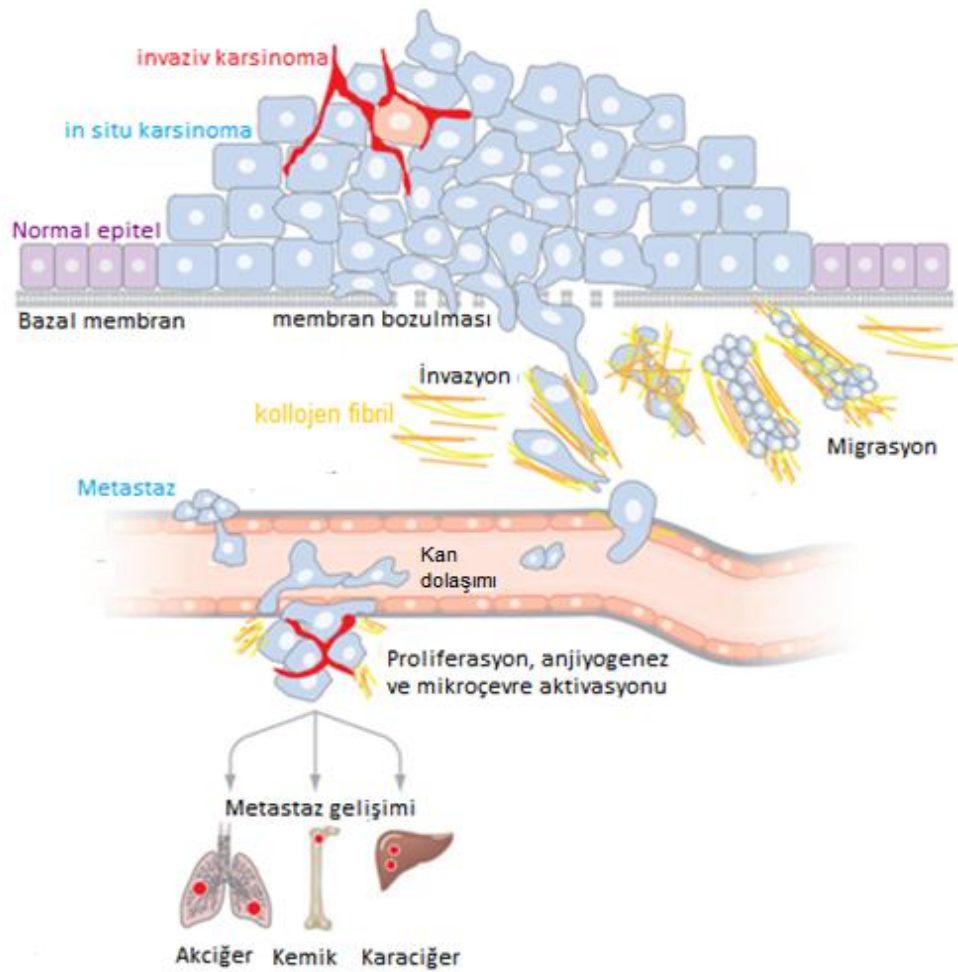
Biyopsi örneklerinde saptanan kanser hücrelerinin çoğalma ve yayılım hızı hakkında bilgi sahibi olmak için kanser hücrelerinin değişim derecelerine bakılmaktadır. Bu derecelendirme Gleason Skorlama olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2-6). Hızlı çoğalma kapasitesine sahip Gleason Skoru yüksek olan tümörlerin teşhis esnasında prostat dışına yayılma ihtimalinin yüksek olduğu bilinmektedir. Gleason Skoru düşük olanlar az agresif ve daha iyi bir prognoza sahip iken, yüksek Gleason Skoru'nda agresif kanser hücreleri nedeniyle uzun dönem bir prognoz ile metastazsız yaşam süresi sınırlı oranlarda kalmaktadır (McNeal, 1988, Weinstein ve Epstein, 1993).



Şekil 2.6: Prostat kanser hücrelerindeki farklılaşmayı gösteren Gleason skorum dereceleri.

Günümüz teknolojisiyle birlikte kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılması, tedavi ve korunmada kayda değer gelişmeler sağlamış olsa da, gelişmiş ülkelerde kanserden kaynaklanan ölümler halen yüksek düzeylerde bulunmakta ve toplumdaki tüm ölümlerin %25'ini oluşturmaktadır (Brooks, 2001). Prostat kanserinden meydana gelen ölümlerin %90'ı ise, metastaz gelişiminden kaynaklanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Brackenbury ve Djamgoz, 2006; Fairhurst ve diğ., 2015). Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları yerden, vücudun farklı doku ve organlarına yayılarak yeni tümörleri oluşturmalarıdır. Bu, angiogenez, invazyon, migrasyon-motilite, extravazasyon ve proliferasyon gibi, birbirleriyle ilişkili bir dizi kompleks ve çok basamaklı olaylar zinciri ile gerçekleşmektedir (Şekil 2-7) (Poste ve Fidler, 1980; Khanna ve Hunter, 2005; Djamgoz ve diğ., 2013). İlk olarak, tümör hücreleri çoğalır, yeni damar oluşumunu uyarak besin ve O_2 ihtiyaçlarını sağlarlar, daha sonra komşu hücrelerle olan bağlarını kopararak ve bazal membranı bozarak, primer tümör dokusundan ayrılırlar. Ekstraselüler matrikse geçen tümör hücreleri burada ilerlerler ve çevre dokulara ulaşırlar ya da dolaşım sistemine (kan veya lenf) girerek uzaktaki dokulara yerleşerek çoğalırlar. Bu sayede yaşamlarını ve çoğalmalarını sürdürürler (Poste ve Fidler, 1980; Khanna ve Hunter, 2005; Tapon ve Ziebold, 2008; Djamgoz ve Onkal, 2013). Metastatik potansiyele sahip hücrelerin, taşıdıkları genetik ve epigenetik değişikliklerin getirdiği genomik kararsızlık, bulundukları çevredeki fiziksel engelleri

aşarak, metastatik yayılım göstermelerine ve uzak bir bölgede/dokuda koloni oluşturmaları yönünde fonksiyon kazanmalarına yol açmaktadır (Chiang ve Massague, 2008). Farklı kanser türlerinin, farklı organlara ait mikroçevreye uyum sağlayarak spesifik organlara metastaz yapabildikleri bilinmektedir. Prostat kanserli bireylerin otopsi sonuçlarından elde edilen verilere göre, prostat kanseri %90 oranla en çok kemiklere, ardından akciğer, karaciğer, plevra ve adrenal bezlere metastaz yapabilmektedir (Şekil 2-7) (Bubendorf ve diğ., 2000; Patel ve Brackenburry, 2014)



Şekil 2.7: Metastatik süreç boyunca meydana gelen basamaklar ve prostat kanserinde metastaz gelişiminin gerçekleştiği organlar (Onkal ve Djamgoz 2009).

2.5. KANSERDE VGSC EKSPRESYONU

Voltaj kapılı sodyum kanalları, hücre membranının depolarizasyonu sonrasında açılarak sodyum iyonlarının hücre içine girişine izin veren; nöron, kalp kası ve iskelet kası gibi elektriksel olarak uyarılabilen hücreler de aksiyon potansiyelinin oluşmasını sağlayan kanal proteinleridir. Yapılan çalışmalar, VGSC'lerin elektriksel olarak uyarılabilir olmayan ve bunun yanı sıra çeşitli kanser türlerine ait hücreler tarafından da ekspresse edilebildiğini ortaya koymuştur (Djamgoz, 2007; Prevarskaya ve diğ., 2007; Brackenbury ve diğ., 2008; Onkal ve Djamgoz, 2009). Elektriksel olarak uyarılmayan ancak, VGSC ekspresyonuna sahip hücrelere örnek olarak endotel hücrelerini, lenfositleri, fibroblastları ve glia hücrelerini saymak mümkündür (Nilius ve Droogmans, 2001; Brackenbury ve diğ., 2008; Brackenbury, 2012).

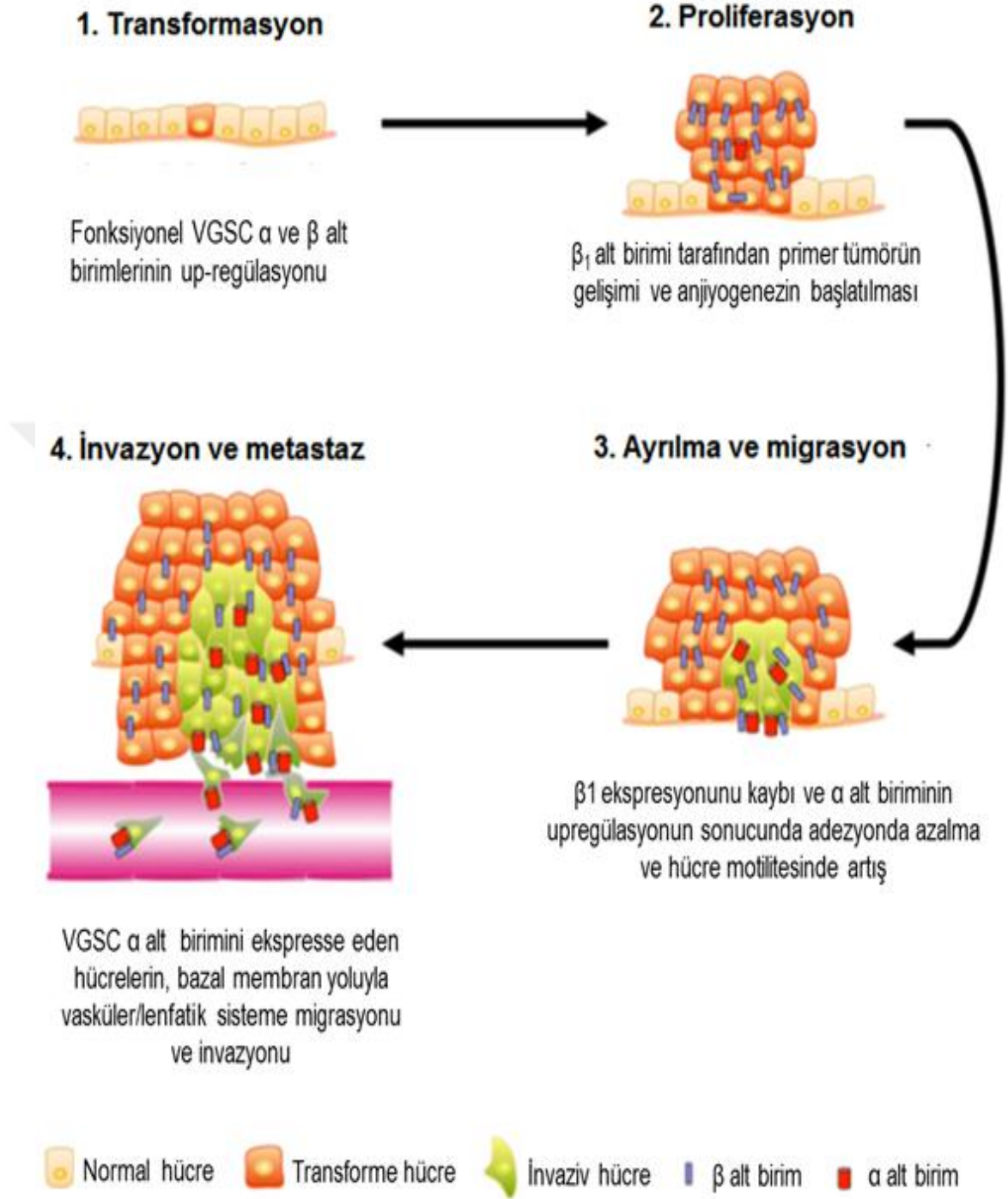
VGSC'lerin kanser hücrelerindeki upregülasyonunun mekanizması halen iyi bilinmemektedir. Bazı çalışmalar büyüme faktörlerinin rol oynayabileceğini gösterirken (Fraser ve diğ., 2014), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve sinir büyüme faktörü (NGF), protein kinaz A (PKA)'nın ikinci aktivasyonu ile prostat kanser hücrelerinde Na^+ akımını artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Brackenbury ve Djamgoz, 2007; Ding ve diğ., 2008). Fraser ve diğ. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada meme kanseri hücrelerindeki steroid hormonların VGSC ekspresyon/aktivasyonlarında da regüle olabileceği saptanmıştır. Kanser hücrelerinde VGSC ekspresyonu, otoregülasyon pozitif feedback yolu ile de elde edilmektedir. Metastatik hem meme hem de prostat kanser hücrelerinde Na^+ akım aktiviteleri PKA'nın, sırasıyla $\text{Na}_v1.5$ ve $\text{Na}_v1.7$ 'nin fonksiyonel ekspresyonunu teşvik ettiği saptanmıştır (Brackenbury ve Djamgoz, 2006; Chioni ve diğ., 2010).

Bir sonraki adım, farklı α ve β alt birimlerinin kesin katılımı ve terapötik potansiyelini kullanma amacı ile tümör türlerine karşı VGSC'lerin ekspresyonunun dağılımı ve büyüklüğünün ayarlanmasıdır (Patel ve Brackenbury, 2015).

VGSC'ler ve özellikle α ve β alt birimleri ile yapılan çalışmalar; VGSC'lerin farklı tipteki kanser hücrelerinde upregüle olduğunu α ve β alt birimlerinin ise kanserin hem ilerlemesinde hem de metastatik aktivitesinde rol aldığını, ancak bu durumun tümörden çok tümörün oluşum mekanizmalarında değişiklik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Genellikle α alt birim upregülasyonu, Na^+ akımı aracılı olarak invazyonu,

migrasyonu (Besson ve diğ., 2015) ve anjiyogenezi artırır (Andrikopoulos ve diğ., 2011). Ayrıca, mezenşimal fenotip düzenlenmesinde (Brisson ve diğ., 2013; Nelson ve diğ., 2014) proteazların aktivasyonunda (Gillet ve diğ., 2009) ve primer tümördeki hücrelerin lokal invazyonunda ekspresse olurlar (Roger ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005; Brackenbury ve diğ., 2007). β alt birimleri ise adezyona katkı sağlarken (Chioni ve diğ., 2009), β_1 anjiyogenezi teşvik etmede, apoptoza karşı koymada ve *in vivo* tümör büyümesinin (Nelson ve diğ., 2014) artması yönünde etkili olmaktadır (Şekil 2-8).

VGSC'ler kanserin farklı tiplerinde ve çeşitli alt birimleri ile upregüle olabilmektedir. VGSC'lerin α ve β alt birimlerinin, hem kanser ilerlemesinin çeşitli yönlerini artırmada hem de metastazda önemli rol oynadığını ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır (Patel ve Brackenbury, 2015). Spesifik alt tiplerin oynadığı rol veya roller, karmaşık gözükülebilmekte ve tümör türüne bağlı olabilmektedir. Ortak tema olarak, α alt birimler Na^+ akımı aracılığıyla invazyonu düzenlerken, β alt birimler adezyon etkileşimlerini düzenlemektedir. Bundan sonraki çalışmalar farklı α ve β alt birimlerinin kesin katılımı ve terapötik potansiyelini kullanma amacı ile tümör türlerine karşı, VGSC ekspresyonunun dağılımı ve büyüklüğünün ayarlanması yönünde olmaktadır (Patel ve Brackenbury, 2015).



Şekil 2.8: Kanser ilerlemesinde VGSC alt birimlerinin rolü (Brackenbury ve diğ., 2008).

2.5.1. VGSC'lerde α Alt Birimleri

VGSC'nin epitel orjinli kanserlerde baskın olduğu belirlenmiş olup, (Brackenbury, 2012) $\text{Na}_v1.5$ gibi, α alt birimlerin up-regülasyonunu; proteazların aktivasyonunu (Gillet ve diğ., 2009), mezanşimal fenotipleri (Brisson ve diğ., 2013, Nelson ve diğ., 2014), ve primer tümörlerin lokal invazyonunu artırmaktadır (Roger ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005; Brackenbury ve diğ., 2007). VGSC α alt birimlerinin, meme kanseri (Roger ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005), rahim ağzı kanseri (Diaz ve diğ., 2007; Hernandez-Plata ve diğ., 2007), kolon kanseri (House ve diğ., 2010), glioma (Schrey ve diğ., 2002, Joshi ve diğ., 2011), lenfoma (Fraser ve diğ., 2004), melanoma (Allen ve diğ., 1997; Carrithers ve diğ., 2009), mezotelyoma (Fulgenzi ve diğ., 2006), nöroblastoma (Ou ve diğ., 2005), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Roger ve diğ., 2007), yumurtalık kanseri (Gao ve diğ., 2010), prostat kanseri (Grimes ve diğ., 1995; Laniado ve diğ., 1997; Smith ve diğ., 1998; Diss ve diğ., 2001) ve küçük hücreli akciğer kanseri (Blandino ve diğ., 1995; Onganer ve Djamgoz, 2005) dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde eksprese edildiği saptanmıştır (Tablo 2-3) (Brackenbury, 2012). Elde edilen bulguların çoğunluğu *in vitro* hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalara dayanmasına rağmen, *in vivo* olarak yürütülen çalışmalarda da, tümörlerde α alt birim ekspresyonlarının bulunduğu doğrulanmıştır (Gao ve diğ., 2010; House ve diğ., 2010; Hernandez-Plata ve diğ., 2011). Hatta bazı kanser türlerinde birden fazla α alt birimin eksprese edildiği tespit edilmiştir. Örneğin; lenfomada ve MDA-MB-23 gibi meme kanseri hücrelerinde en baskın α alt birimi $\text{Na}_v1.5$ (SCN5A geni) (Fraser ve diğ., 2004-2005) iken, MAT-LyLu ve PC-3 gibi prostat kanser hücrelerinde ise, $\text{Na}_v1.7$ (SCN9A geni) gen ekspresyonunun baskın olduğu tespit edilmiştir (Diss ve diğ., 2001; 2004).

Ancak, α ve β alt birimlerinin özgün rolleri bu durumun karmaşık yapıda olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte yaygın ana fikir, Na^+ akımı α alt birimleri tarafından taşıyor iken, β alt birimleri adezyonu regüle edebilmektedir (Patel ve Brackenbury, 2015).

Tablo 2.3: VGSC'lerin farklı alt birimleri tarafından metastatik hücre davranışları regülasyonu (Brackenbury, 2012).

Hücresel aktivite	Kanser Tipi	Eksprese olan alt birimler*
Aşırı büyüme süreci	Meme, Prostat	Na _v 1.5, Na _v 1.7, <i>β1</i>
Galvanotaksi	Meme, Prostat	Na _v 1.5, Na _v 1.7,
Lateral motilite	Meme, Prostat, Mezotelyoma	Na _v 1.5, Na _v 1.7, <i>β1, β2</i>
Migrasyon	Meme, Prostat,	Na _v 1.5, Na _v 1.7,
Endokrin membran aktivite	Meme, Prostat, Küçük-hücreli akciğer kanseri	Na _v 1.5, Na _v 1.7,
Vesikular model	Meme, Prostat	Na _v 1.7
Adezyon	Meme, Prostat	Na _v 1.5, Na _v 1.7, <i>β1, β2</i>
Gen ekspresyonu	Meme, Prostat, Kolon	Na _v 1.5, Na _v 1.7, <i>β1</i>
İnvazyon	Meme, Rahim ağzı, Kolon, Lenfoma, Küçük-olmayan hücreli akciğer kanseri	Na _v 1.5, Na _v 1.6, Na _v 1.7, <i>β1, β2</i>

* α alt birimleri normal, β alt birimleri koyu renkte yazılmıştır.

Farklı kanser türlerinde VGSC α alt birimleri arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir (Diss ve diğ., 2004). Lenfoma, nöroblastoma, meme ve prostat kanser hücrelerinde, SCN5A ve SCN9A genlerinin neonatal DI:S3 formlarında birlikte ekspresse edildiği gösterilmiştir (Fraser ve diğ., 2004; Diss ve diğ., 2005; Fraser ve diğ., 2005; Ou ve diğ., 2005; Brackenbury, 2012). Ancak, bu birleşme modeli tüm tümör türlerine karşı korunmamıştır ve HEK-293 gibi kolon kanseri hücrelerinde neonatal DI:S3 birleşme formu bulunmamaktadır (House ve diğ., 2010). Ayrıca, α alt birim ekspresyonu ile metastatik eğilim arasında, kanser tipleri bakımından spesifik ilişkilerin olduğu gözlemlenmiştir. Neonatal Na_v1.5 geninin, zayıf metastatik MCF-7 hücrelerine kıyasla güçlü metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde daha fazla ekspresse olduğu saptanmıştır (Roger ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2012). Prostat, kolon ve yumurtalık kanserlerinde de α alt birim ekspresyonları için benzer durumları görmek mümkündür (Bennet ve diğ., 2004; Patel ve Brackenbury, 2015).

VGSC aktivitesinin metastazla ilişkili hücresel davranışlar üzerindeki etkileri, TTX gibi spesifik VGSC blokerleri kullanılarak, ve/veya gen düzeyinde inhibisyon sağlanarak ortaya çıkarılmıştır. *In vitro* olarak yürütülen çalışmalarda, VGSC aktivitesinin baskılanması ile inhibe olduğu gösterilen α alt birimlerin; endositoz (Mycielska ve diğ., 2003), galvanotaksis (Djamgoz ve diğ., 2001; Fraser ve diğ., 2005), gen ekspresyonu (Mycielska ve diğ., 2005b), invazyon (Carrihers ve diğ., 2009; Nakajima ve diğ., 2009; House ve diğ., 2010; Hernandez-Plata ve diğ., 2011), migrasyon (Fraser ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005; Brackenbury ve Djamgoz, 2006; Fulgenzi ve diğ., 2006; Brackenbury ve diğ., 2007; Uysal-Onganer ve Djamgoz, 2007; Gao ve diğ., 2010), ve aşırı büyüme gibi (Fraser ve diğ., 1999) çeşitli hücresel davranışları artırmasının metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tablo 2-3). Bunun yanı sıra, α alt birimlerin, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde etken olup olmadığını tartışan çalışmalar da bulunmaktadır (Fraser ve diğ., 2000; Abdul ve Hoosein, 2002; Roger ve diğ., 2003). Bazı çalışmalarda, belirli α alt birimlerinin farklı kanser hücre türlerinin invaziv kapasitesi üzerinde katkısının bulunduğu belirtilmiştir. Na_v1.5'in neonatal DI:S3 birleşmiş varyantı metastatik meme kanseri hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu artırmaktadır (Brackenbury ve diğ., 2007). Ancak bu çalışmaların aksine Na_v1.6, rahim ağzı kanser hücrelerinin sadece invazyonunu artırırken (Hernandez-Plata ve diğ., 2011),

Na_v1.6 ve Na_v1.7 prostat kanser hücrelerinin hem endositozunun hem de invazyonunun artmasına sebep olmaktadır (Nakajima ve diğ., 2009). Na_v1.4'ün aşırı ekspresyonu ise, LNCaP prostat kanser hücrelerinin yayılmasını arttırdığı gibi (Bennett ve diğ., 2004) herhangi alt türün ekspresyonunu ve/veya invazyonunu artırmak için de yeterli olabilmektedir.

2.5.2. VGSC'lerde β Alt Birimleri

Kanser hücrelerinde β alt birimlerinin ekspresyonu üzerinde, α alt birimlerine oranla daha az çalışma yapılmıştır. β alt birimleri primer tümör proliferasyonunda eksprese edilmektedir ve hücre adezyonuna katkı sağlamaktadır (Chioni ve diğ., 2009). β 1 ise, anjiyogenez ve apoptoz direncini yükseltmektedir (Nelson ve diğ., 2014).

β alt birimleri, prostat (Diss ve diğ., 2008; Jansson ve diğ., 2012), meme (Chioni ve diğ., 2009), akciğer (Roger ve diğ., 2007), ve rahim ağzı kanserlerinde (Hernandez-Plata ve diğ., 2011) tespit edilmiştir (Tablo 2-3) (Brackenbury, 2012). VGSC'nin α alt birimleri gibi, β alt birimleri de bazı spesifik kanser türleri arasında çeşitlilik göstermektedir. β 3, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinde olmasına karşın, (Roger ve diğ., 2007; Diss ve diğ., 2008) meme ve rahim ağzı kanser hücrelerinde bulunmamaktadır (Chioni ve diğ., 2009; Hernandez-Plata ve diğ., 2011). Fakat, β 1 meme, prostat ve rahim ağzı kanser hücrelerinde baskın olarak yer alır (Diss ve diğ., 2008; Chioni ve diğ., 2009; Hernandez-Plata ve diğ., 2011). Prostat kanserinde β 1 ve β 2 ekspresyonunun seviyesi metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmiş (Diss ve diğ., 2008; Jansson ve diğ., 2012) ancak, bu durum ile meme kanserinde karşılaşılmamıştır (Chioni ve diğ., 2009; Nelson ve diğ., 2014).

Son zamanlardaki çalışmalar, LNCaP prostat kanseri ilerlemesinde hücrenin metastatik potansiyeli ile paralel olarak, β 2 ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Jansson ve diğ., 2012). Bu artış, daha çok bir invazyon ve motiliteye yol açabilmektedir. Aşırı eksprese olan β 2, kontrol hücrelerine kıyasla hücrelerin migrasyon kapasitesini de artırabilmektedir. β 2'nin aşırı ekspresyonu ile invazyon ve proliferasyonun artmasının, prostat kanser hücreleri ve organotipik kültürlerde sinir uçları arasındaki ilişkiyi artırdığı dolayısıyla β 2'nin, prostat kanser hücreleri ve sinir matrisleri arasındaki ilişkiye izin verdiği ileri sürülmektedir (Jansson ve diğ., 2014).

2.6. KANSER ARAŞTIRMALARINDA KULLANILAN DENEYSEL MODELLER

Kanser alanında uygulanan tedaviler önceki dönemlerin öğreti ve tekniklerini kullanarak, sistemli ilaç uygulamaları ile günümüze kadar gelişerek devam etmiştir. Ancak hangi teknik kullanılırsa kullanılsın, araştırmaların belli aşamalarında deneysel hayvan modellerinden yararlanılmak zorunda kalınmıştır. Son yıllarda ön plana çıkan hücre kültürü ve/veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen, uygulanan ajanlara karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler, hayvan modeli kullanımından vazgeçilmesine engel olmuştur.

Prostat kanseri heterojen bir hastalıktır. Hastada, kanser hücrelerinin büyüme oranları, histolojik özellikleri, metastatik yetenekleri ve tedaviye yanıtları farklılık göstermektedir. Bu kompleks hastalığın araştırılması hayvan modellerinin kullanımı ile kolaylaştırılmaya çalışılmaktadır. Günümüzde, prostat kanseri çalışmalarında, genellikle fare, sıçan, köpek ve insan kaynaklı modeller kullanılmaktadır (Royai ve diğ., 1996; Tennant ve diğ., 2000; Anisimov ve diğ., 2005). Isaacs ve ark. (1978) Dunning model üzerinde yapmış olduğu çalışmalarında, prostat kanserli hayvanların karakteristik olarak taşınması gereken histolojik ve biyokimyasal özellikleri belirtmişlerdir.

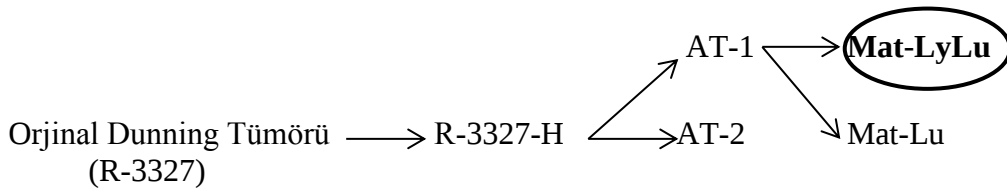
Prostat kanseri araştırmaları için sıçanlarda dört model sistem oluşturulmuştur. Bunlar, Dunning, Noble, ACI ve Pollard tümör modelleridir (Pollard, 1980). Bunlardan, Dunning sıçan prostat kanser modeli, kanser çalışmalarında geniş bir kullanım alanına sahip etkili bir modeldir. W.F. Dunning tarafından geliştirilen bu model, başlangıçta karsinogenezin hormonal yönlerini araştırmada kullanılmakta iken, daha sonraları kanser araştırmalarının pek çok farklı alanındaki çalışmalarda kullanılan bir model olmuştur.

Dunning sıçan prostat kanser modeli, ilk kez 1961 yılında W.F.Dunning tarafından yaşlı bir Copenhagen ırkı sıçanın dorsal prostatında spontan olarak gelişen, iyi farklılaşmış, yavaş büyüyen, metastatik olmayan ve androjen duyarlı bir adenokarsinoma şeklinde ortaya çıkmıştır. Elde edilen R-3327 orijinal primer prostat tümöründen alınan parçaların, Copenhagen ve Copenhagen X Fischer çaprazlamasından sağlanan sıçanlara deri altı inokülasyonu ile *in vivo* olarak devam ettirilmiştir. Parental R-3327 tümörünün,

1974 yılında John Hopkins Tıp Okulu'na verilmesinden itibaren R-3327-H tümörü olarak söz edilmeye başlanmıştır.

R-3327-H tümörünün sıçanlara seri pasajı sonucunda AT-1 ve AT-2 adı verilen hızlı büyüyen ancak, düşük metastaz yeteneğine sahip, iki anaplastik tümör meydana gelmiştir (Şekil 2-9). AT-1'in *in vivo* olarak yapılan seri pasajından iki farklı yüksek metastatik özelliğe sahip hücre soyu ortaya çıkmıştır. Bunlar hem akciğere hem de, lenf sistemine metastaz yapan Mat-LyLu ile sadece akciğere metastaz yapan Mat-Lu hücreleridir (Isaacs ve diğ., 1978; Isaacs ve diğ., 1981; Wenger ve diğ., 1984; Tennant ve diğ., 2000).

R-3327-H tümöründen elde edilen AT-2 hücreleri düşük metastaz yeteneğine sahipken, Mat-LyLu hücreleri oldukça yüksek metastaz yeteneğine sahiptir ve deri altı olarak sıçanlara inoküle edildiğinde spesifik olarak akciğere metastaz yapmaktadır (Fraser ve diğ., 1999, Yıldırım ve diğ., 2012). Morfolojik olarak ince, uzun, iğ şeklinde ve büyük bir nukleusa sahip olan yüksek metastatik karakterli Mat-LyLu hücrelerinin, *in vitro* ortamda iki kat olma süreleri 19,7 saat olarak tespit edilmiş ve kromozom sayılarının 58 olduğu belirlenmiştir (Wenger ve diğ. 1984).



Şekil 2.9: Dunning modeline ait MAT-LyLu hücrelerinin orijini.

2.7. KANSERDE TERAPÖTİK POTANSİYEL VE YENİ STRATEJİLER

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, metastaz gelişiminde rol alan pek çok basamak ve moleküler ajan bulunmuş olsa dahi, metastazın mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak, son yıllarda kanser tedavisi için yapılan yoğun araştırmalarla metastaz mekanizmalarının kısmen de olsa aydınlatılmasıyla bu mekanizmaları hedef alan tedaviler geliştirilmeye başlanmış ve anti-metastatik tedaviler gündeme gelmiştir. Metastaz biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmaların ürünü olarak anti-

metastatik tedavilerin eklenmesiyle kansere yönelik savaşta yeni umutlar doğmuştur. Konvansiyonel tedavilere dirençli olup, prognozun kötüleşmesine sebep olarak, yaşam sürecini kısaltan metastaz gelişimi, yoğun ilgi çekerek, moleküler mekanizmasının kısmen aydınlatılması ile metastaz basamaklarını hedefleyen yeni tedavi stratejilerini gündeme getirmiştir.

İyon kanalları, onkolojide yeni bir araştırma sahası açmaktadır. Bu alan, tüm kanal tipleri araştırılmadığı için hala çok yeni bir alanı oluşturmakta ve çalışmaların çoğu iyon kanallarının kanserin farklı tiplerindeki spesifik rollerini araştırmaya yöneliktir. Ayrıca, Hannahan ve Weinberg (2000) tarafından tanımlanan kanser özellikleri, son zamanlarda yapılan çalışmalar ile içeriğine ‘İmmün denetiminden kaçan’ (Kroemer ve Pouyssegur, 2008) ve ‘stres bağlı fenotip’ gibi yeni özellikler katılarak genişletilmiştir. Bunlar, strese bağlı fenotipler, metabolik stres, mitotik stres, prototoksik stres, oksidatif stres ve DNA hasarına bağlı streslerdir (Becchetti, 2011; Urrego ve diğ., 2014). Bu sayede iyon kanalları, teşhis ve tedavi için moleküler hedefli araçların geliştirilmesini sağlayan uzun bir sürece yol açmıştır (Arcangeli ve Becchetti, 2015) .

Eksprese edildikleri dokular olan merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi ve kas dokularında, ilaçlar veya toksinlerin etkisine bağlı olarak VGSC’leri kodlayan genlerde gelişen mutasyonlar sonucunda kanal fonksiyonunda bozukluklar meydana gelebilmektedir. Bu bozukluklar ‘kanalopati’ olarak adlandırılan pek çok hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. Kanalopatik olarak isimlendirilen bu hastalıklar; epilepsi, miyotoni, periyodik paralisis, ailesel atriyal fibrilasyon ve ağrı algısında bozulma gibi çeşitli sorunları içermektedir (Kim, 2014).

VGSC’lerin metastatik hücrelerde pro-invaziv olarak rol oynadığı görüşleri ve α alt birim ekspresyonu ile ilgili hasta verileriyle beraber, VGSC’lerin metastatik ortamlarda tanı ve/veya tedavi hedeflerinde önemli bir yer alabileceği ve aynı zamanda α alt birimleri ile kanal iletkenliğinin farmakolojik blokajının, VGSC bağımlı metastatik hücre davranışlarını engellemek için ideal bir girişim olabileceği ileri sürülmektedir. (Brackenbury, 2012). Son çalışmalarda görüldüğü gibi, Copenhagen sıçanlarda Mat-LyLu hücreleri ile deri altında oluşturulan Dunning prostat kanserinde tümör içine TTX’in lokal enjeksiyonunun, akciğer metastazını önemli ölçüde azalttığı gözlenirken, hayvanların sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir (Yıldırım ve diğ., 2012).

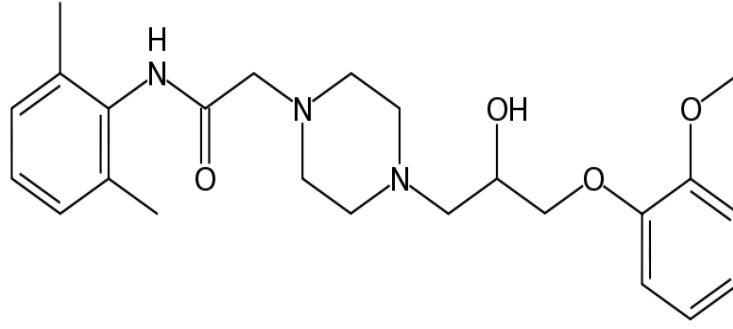
Tedavi için FDA onaylı VGSC blokajı yapan, antikonvülsanlar, antiaritmikler, lokal anestetikler ilaçlar ve trisiklik antidepresanlar gibi ilaçlar, metastatik hastalıklarda kullanılmak üzere araştırmaları destekleyebilmektedir (Yang ve diğ., 2012). Bu ajanların bir çoğu *in vitro* modellerde metastatik hücre davranışlarını inhibe etmektedir (Abdul, 2001; Fraser ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005; Onganer ve Djamgoz, 2005; Yang, 2012; Martin ve diğ., 2015).

Açık prostatektomi ameliyatlarında genel anestezi amacıyla kullanılan anestetik maddelerin, ameliyat sonrasında kanserin tekrarlama riski ile bağlantılı olabileceğine dikkat çekilmektedir (Biki ve diğ., 2008). Buna ek olarak, son retrospektif vaka-kontrol analizi Genel Uygulama Araştırma Veritabanı kullanılarak trisiklik antidepresan kullanımının, prostat kanseri, glioma ve kolorektal kanserin önlenmesinde etken olabileceği ileri sürülmektedir (Walker ve diğ., 2011). Ayrıca, ALS hastalığının kullanılan VGSC bloklayıcısı ve metabotropik glutamat reseptör inhibitörü olan riluzole (200 mg), farelerde meme kanseri tümör hacmini ve III.-IV. evre melanom hastalarında tümörün aktivitesini inhibe etmektedir (Yip ve diğ., 2009; Speyer ve diğ., 2012).

2.8. RANOLAZİNE

Ranolazine, Ranexa/Latixa ticari adı altında satılan, ilk olarak Gilead Sciences tarafından Ocak 2006'da kronik anjina tedavisi için FDA'den onay alan, kronik anjina pectoris (kalbi besleyen damarların daralması/tıkanması ile ortaya çıkan göğüs ağrısı) kardiyak instabilite (istikrarsızlık), aritmi ve azaltılmış kontraktibilite (kasılabilirlik) tedavisinde kullanılan antiaritmik veya antianjinal bir ilaçtır (Belardinelli ve diğ., 2006; Pham ve Mehta, 2007; Kahlig ve diğ., 2010; Savarese ve diğ., 2013; Zuchi ve diğ., 2013; Banon ve diğ., 2014; Cattaneo ve diğ., 2014; Khera ve diğ., 2014).

Yeni nesil antianjinal ilaçlardan Ranolazine (RNL) ([®]Ranexa/[®]Latixa), (N-(2,6-dimetilfenil)-2-[4-[2-hidroksi-3-(2-metoksifenoksi)-propil]-piperazin-1-il] asetamid dihidroklorid) (C₂₄H₃₃N₃O₄) formu ile 1986 yılında patenti alınan hem intravena hem de, oral biçimde kullanılabilen 427,537 g/mol molekül ağırlığına sahip bir ilaçtır (Şekil 2-10) (Cavallino ve diğ., 2015).



Şekil 2.10: Ranolazine'in kimyasal formülü.

RNL'nin yaklaşık % 65'i plazma proteinine (esas olarak α -1 asit glikoproteinine) bağlanır ve çoğunlukla biyotransformasyonu sitokrom P450 (CYP) 3A4 aracılı yol ile sağlanmaktadır (Jerling ve Abdallah, 2005). RNL, beta-blokerleri, nitratlar, kalsiyum kanal blokerleri, anti-platetler, lipid düşürücü tedavi, ACE inhibitörleri ve anjiyotensin blokerleri ile birlikte de kullanılabilir (Stone ve diğ., 2006; Minotti, 2013; Cavallino ve diğ., 2015). RNL diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında, bradikardi veya hipotansiyon gibi hemodinamik değişiklikler olmadan, antiiskemik olayı gerçekleştirebilmektedir (Stone, 2008).

RNL'nin mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Başlangıçta bir grup araştırmacı, yağ asidi oksidasyonunun RNL ile kısmi inhibisyon yoluyla tedavi edici etkinliği üzerinde çalışmalar yürütmüşlerdi (Zacharowski ve diğ., 2001; Chaitman, 2002; Wolf ve diğ., 2002; Chaitman ve diğ., 2004a). Ancak elde edilen farmakolojik etkiler, klinikteki ($>10 \mu\text{mol/L}$) terapötik plazma konsantrasyonlarını aşan, konsantrasyonlarda saptanmıştır (Matsumura ve diğ., 1998; MacInnes ve diğ., 2003). MacInnes ve diğ., (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, $100 \mu\text{mol/L}$ konsantrasyonda RNL'nin sadece %12 yağ asidi oksidasyonunu engelleyebildiği tespit edilmiştir. Böylece, antianjinal ilaç olarak RNL'nin terapötik etkinliği için substrat kullanımının katkısı (yağ asidi oksidasyonunun kısmi inhibisyonu) kanıtlanamamıştır. Ancak RNL, araştırmacılar için yeni ve farklı alanlar sunmaktadır.

RNL, kronik anjina tedavisinde etkili bir ilaçtır ve akut miyokard infarktüsünde infarkt alanının azaltılmasında ve reperfüzyon hasarının önlenmesinde de etkili olabilmektedir (Hale ve diğ., 2006). İlaç özellikle, sitokrom P450 sisteminin üyesi olan sitokrom

CYP3A enzimi tarafından karaciğerde metabolize olmaktadır (Jerling, 2006). RNL, aynı zamanda geç sodyum akımının inhibitörüdür (Antzelevitch ve diğ., 2004) ve bu mekanizma aracılığıyla iskemi ve reperfüzyon sırasında Na^+ bağımlı hücre içi Ca^{+2} 'un aşırı yüklenmesini azaltır (Sakata ve diğ., 1997; Belardinelli ve diğ., 2006; Fraser ve diğ., 2006). Akut miyokardiyal iskemi sırasında, RNL uygulanmasının kardiyoprotektif bir etki meydana getirdiği, düşük akışlı iskemiye maruz bırakılan izole kobay kalbinde gösterilmiştir. İskemi sırasında RNL uygulanması, miyokardiyal hücre ölümünü azaltmakta ve sol ventrikül fonksiyonunun düzeltilmesini sağlamaktadır (Sossalla ve diğ., 2008; Filardi, 2011). Global iskemi modelinin kullanıldığı Langerdorff perfüze tavşan kalbinde de RNL'nin iskemi öncesinde uygulanmasının, kreatin kinaz salınmasını anlamlı olarak azalttığı ve reperfüzyon sırasında, sol ventrikülde gelişen basınç ile kasılma-gevşeme hızını düzelttiği gösterilmiştir (Gralinski ve diğ., 1994).

Antzelevitch ve diğ., (2004) kardiyak iyon akımı üzerinde etkili olan RNL'nin geç/ısrarlı sodyum akımı (I_{NaP}) üzerindeki IC_{50} değerinin $5,9 \mu\text{M}$ olduğunu, voltaj clamp testi ve depolarizasyon frekansına göre, bu dozun $5\text{-}21 \mu\text{M}$ arasında değişim gösterdiğini, günlük $20 \mu\text{M}$ 'lık dozu aşmayan bir tedavinin planlanması gerektiğini belirtmektedir. Ayrıca hızlı potasyum akımını (IKr) ($12 \mu\text{M}$), geç kalsiyum akımını (ICa) ($50 \mu\text{M}$), pik ICa ($296 \mu\text{M}$), sodyum kalsiyum değiştirici akımını (INa-Ca) ($91 \mu\text{M}$) ve yavaş potasyum akımını (IKs) ($30 \mu\text{M}$ da %17) da içeren diğer iyon akımlarını da inhibe ettiği gösterilmiştir (Antzelevitch ve diğ., 2004; Stone, 2008). İsrarlı akımların, eşikaltı salınımlarının üretiminde ve sinaptik potansiyellerin amplifikasyonlarında artışa yol açabildiği belirtilmiştir (Sciria ve diğ., 2007; Mantegazza ve diğ., 2010).

İlacın farmakokinetiği erkek ve dişi sıçanlarda araştırılmış olup, $12,5$, 25 ve 50 mg/kg RNL'nin oral uygulanmasından sonra plazma konsantrasyonu (C_{max}) belirlenmiştir. Dokulardaki konsantrasyonlar idrar ve safrada RNL'nin düzeltici etkisi 25 mg/kg 'de oral dozu analiz edilmiştir. Dişi sıçanlardaki RNL'nin plazma konsantrasyonu erkek sıçanlarınkinden önemli ölçüde yüksek olduğu belirlenmiştir. Dişi sıçanlardaki C_{max} ' dayanan ilaç maruziyeti erkek sıçanlarından yaklaşık olarak $2\text{-}3$ misli olmaktadır. Erkek ve dişiler arasındaki farklardan bir diğerinin de ilacın vücuttaki yarı ömrü olduğu ve erkeklerde bu sürenin daha kısa olduğudur. Bu sonuçlar sayesinde, sıçanlarda RNL farmokinetiklerinde cinsiyetlerde farklılık gösterdiği Liu ve diğ. (2003) tarafından tespit

edilmiştir. RNL, maksimum plazma konsantrasyonuna genellikle uygulandıktan 4-6 saat sonra ulaşmakta ve 3 gün boyunca günde iki kez kullanıldığında kararlı duruma geçmektedir. Yarılanma ömrü ortalama terminal eliminasyon, günde iki kez 500'den 1000'e kadar değişen düzenli çoklu doz sonrasında yaklaşık 7 saat olarak belirlenmiştir (Gordon, 2005; Jerling ve Abdallah, 2005; Jerling ve diğ., 2005).

Plazma konsantrasyonu 2-6 μM doz aralığında olan RNL'nin, kronik angina için tedavi edici etki gösterdiği (Chaitman ve diğ., 2004b) belirlenen klinik çalışmalarda, kalp atım hızını ya da sistemik kan basıncını etkilemeksizin, antiiskemik ve antianjinal etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. (Antzelevich ve diğ., 2004; Song ve diğ., 2004).

Fare ve sıçanlarda yapılan çalışmaya göre, ilacın kanserojen potansiyeli olduğuna dair kanıtlar bulunmamaktadır. Sıçanlarda ($900\text{mg}/\text{m}^2/\text{gün}$) 21 ay boyunca $150\text{ mg}/\text{kg}/\text{gün}$, farelerde ise, ($150\text{mg}/\text{m}^2/\text{gün}$) 24 ay boyunca $50\text{ mg}/\text{kg}/\text{gün}$ kullanılan en yüksek oral dozlarda, kanserojen bir etki tespit edilememiştir (European Medicines Agency, 2008). Maksimum önerilen insan dozu (MRHD) mg/m^2 cinsinden, yüzey alanında 2 gr olmakta ve tolere edilen doz, sıçanlarda 0,8 ve farelerde 0,1 katına karşılık gelmektedir. Ancak yayınlanan bir başka çalışmaya göre ise, RNL'nin spontan ince bağırsak tümörigenez modeli olan transgenik APC (min/+) farelere günde iki kere $30\text{ mg}/\text{kg}$ olarak uygulandığında, RNL'nin tümör oluşumunu teşvik ettiği ve ince bağırsaktaki neoplastik lezyonların gelişiminde stimülasyon meydana getirdiği Suckow ve diğ., (2004) tarafından saptanmıştır. Fakat bu durum klinik olarak ispatlanmamıştır.

Kahlig ve diğ., (2010) epilepsi ve ailesel hemilejik migren ile ilişkili $\text{Na}_v1.1$ mutasyonlarında ısrarlı akımın artışı üzerine RNL'nin etkilerini araştırmış ve $30\text{ }\mu\text{M}$ RNL tedavisi sonucunda sodyum akımını baskıladığını saptamışlardır. Epileptik $\text{Scn2}\alpha^{\text{Q54}}$ fare modeli kullanılarak RNL'nin ($40\text{ mg}/\text{kg}$) ısrarlı sodyum akımı üzerindeki etkisinin araştırıldığı *in vivo* bir araştırmada da, mutant $\text{Na}_v1.2$ transgeni tarafından üretilmiş anormal nöronal ısrarlı sodyum akımının baskılanması sonucu farelerdeki epileptik nöbet sıklığının RNL tedavili farelerde önemli ölçüde (yaklaşık olarak %50) azaldığı belirlenmiştir (Anderson ve diğ., 2014).

Peters ve diğ., (2013) beyin sodyum kanalı $\text{Na}_v1.2$ üzerinde RNL'nin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında, $10\text{ }\mu\text{M}$ veya $100\text{ }\mu\text{M}$ RNL varlığında kararlı durum

yavaş inaktivasyonunun stabilizasyonunu gözlemlemişlerdir. Yavaş inaktivasyon durumunun termodinamik stabilizasyonu en önemli etki olabilmektedir. 10 μ M (terapötik aralık) RNL ilavesi ile yavaş inaktivasyonunda -8mV'lik kayma eğrisi, kanalların zamanında önemli bir azalma meydana gelebileceğini öne sürmektedirler.

İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK 293) ekspresse edilen Na_v1.7 (hNa_v 1.7) ve sıçan ND7/23 hücre hattından ekspresse edilen Nav1.8 (rNa_v1.8) iyon kanallarında patch-clamp tekniği kullanılarak RNL'nin etkisinin belirlendiği bir çalışmada; RNL'nin kliniğe uygun konsantrasyonlarda (2-8 μ M) Na_v1.7 ve Na_v1.8 VGSC'leri blokladığı tespit edilmiştir (Rajamani ve diğ., 2008). Wang ve diğ., (2008) tarafından yürütülen bir çalışmada ise, insan embriyonik böbrek hücrelerinden HEK293 hattında ekspresse edilen nöronal Na_v1.7, iskelet kası Na_v1.4 ve kalp kası Na_v1.5 izoformları üzerinde RNL'nin Na⁺ akımını bloklayarak etki gösterdiği belirlenmiştir.

Literatürde meme kanseri hücreleri MDA-MB231 ile *in vitro* olarak yürütülen çalışmada, % 2 oksijen içeren akut hipoksik ortamda yetiştirilen MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinin transvers hareketini hem TTX (10 μ M) hem de, RNL (300 μ M)'nin tamamen baskıladığı ve bu baskılamanın Na⁺ kanallarını bloke ederek gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Djamgoz ve Onkal, 2013).

İnsan meme kanser hücrelerinde (MDA-231) yapılan *in vitro* bir çalışma da, RNL (50 μ M)'nin meme kanseri hücrelerinde Na_v1.5 akımını ve kanal üzerinden kanser hücrelerinin giriciliğini Na_v1.5 kanal ekspresyonu inhibe ederek gerçekleştirdiğini saptamışlardır. *In vivo* olarak ise; MDA-231 hücreleri ile oluşturulan meme kanserli immündefresif farelerde (NMRI nüde) görülen akciğer kolonizasyonunu, RNL (50 mg/kg/gün) tedavisi ile, insan meme kanser hücrelerindeki ekspresse edilen Na_v1.5 kanal blokasyonu yoluyla önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Driffort ve diğ., 2014).

Grubumuz tarafından yürütülen bir çalışmada, 2 $\times$ 10⁴ Mat-LyLu hücresi ile oluşturulan Dunning modeli prostat kanserinin RNL ile tedavisi sonucunda, kontrol ve RNL (2,5 μ M, 5 μ M dozları) gruplarındaki hayvanların akciğerlerindeki metastaz sayısını anlamlı olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca RNL'nin metastaz büyüklükleri üzerinde de anlamlı bir azalma (~%50 oranında) meydana getirdiği gözlemlenmiştir (Altun ve diğ., 2014).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MAT-LYLU HÜCRELERİNİN YETİŞTİRİLMESİ

Sıçan prostat kanseri hücre soylarından, Dunning tümör modeline ait, yüksek metastatik, yoğun VGSC karaktere sahip Mat-LyLu ve düşük metastatik AT-2 hücreleri; "Imperial College, Division of Cell and Molecular Biology" (Londra)'dan temin edilmiş ve laboratuvarımızda düzenli olarak pasajları gerçekleştirilmektedir. Hücreler, %1 Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) ve 2 mM L-glutamin (Gibco) ilave edilerek hazırlanan Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Gibco) medyum ile 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂'li inkübatörde yaşatılmaktadır. (Grimes ve diğ., 1995).

3.2. RANOLAZİNE'İN HAZIRLANMASI

RNL (Sigma), steril saf su içerisinde çözülerek, 100 mM'lık stok solüsyon elde edilmiş ve -21 °C'de saklanmıştır. Stok solüsyon deneyler esnasında %0,9'luk steril fizyolojik su (FTS) ile sulandırılarak 2,5 µM ve 5 µM'lık RNL konsantrasyonları elde edilmiştir.

3.3. SIÇANLARDA DUNNING MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Copenhagen ırkı sıçanlarda, VGSC'nin biyolojisini araştırmak amacıyla, yüksek metastatik özelliğe ve yoğun VGSC aktivitesine sahip olduğu bilinen Mat-LyLu hücreleri ile Dunning modeli prostat tümörü oluşturulmuştur. Bu amaçla, yaklaşık 2,5-3 aylık ve ağırlıkları 180-250 gr arasında değişen Copenhagen erişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır (TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü). Çalışmalar süresince, Copenhagen sıçanların deneysel kullanımlarında İstanbul Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İ.Ü., HADYEK) ilkelerine (Karar no: 2013/56) bağlı kalınmıştır.

Primer tümör oluşturmak üzere sıçanların sağ ön ekstremitelerinin üst kısmında deri altına, 2×10^4 Mat-LyLu hücresi inoküle edilmiştir. Sıçanlara enjekte edilecek hücre süspansiyonunun hacmi 0,15-0,20 ml'yi geçmeyecek şekilde ayarlanmış ve uygulanmıştır (Lokeshwar ve diğ., 1999; Yıldırım ve diğ., 2012; Altun ve diğ., 2014).

3.4. TEDAVİ VE DOKU PROSEDÜRLERİ

3.4.1. Tedavi Planı ve Tedavi

VGSC'nin sıçan prostat kanserindeki biyolojik rolünü araştırmak için yapılan bu çalışmada; sağlıklı, kontrol ve iki farklı RNL dozunun verildiği toplam dört grup oluşturulmuştur (Tablo 3-1). Kontrol grubuna %0,9'luk steril FTS verilirken, deney grubuna 2,5 μ M ve 5 μ M dozlarında RNL uygulanan bir tedavi protokolü hazırlanmıştır. Sağlıklı gruba ise, tümör inokülasyonu yapılmamış ancak paralellik açısından, 22 gün boyunca kontrol grubunda olduğu gibi, düşük anestezi altında %0,9'luk steril FTS, gavaj yolu ile verilmiştir.

Tablo 3.1: Gruplar ve tedavi planı.

Uygulamalar Gruplar	Tümör enjeksiyonu	Tedavi
Sağlıklı	Yok	%0,9 FTS
Kontrol	Var	%0,9 FTS
2,5 μ M RNL	Var	2,5 μ M RNL
5 μ M RNL	Var	5 μ M RNL

Tedavi, Mat-LyLu hücrelerinin sıçanlara deri altı inokülasyonundan 48 saat sonra başlamak üzere gün aşırı olarak, FTS ve ilaç uygulaması şeklinde yürütülmüştür. İlaç tedavisi sırasında, hayvanlar düşük anestezi altında iken, sağlıklı ve kontrol grubundaki hayvanlara 1 ml FTS, deney grubundaki hayvanlara 2,5 μ M ve 5 μ M dozlarından 1 ml RNL gavaj yolu ile verilmiştir. Tedavi her iki günde bir olmak üzere 22 gün boyunca devam ettirilmiş ve bu süre sonunda sıçanlar, inhalasyon yoluyla İzofluran (Abbott) anestezi altında servikal dislokasyon yapılarak kurban edilmiştir.

Çalışmamızda, hücrede Na^v1.7'nin varlığını ortaya koyabilmek amacıyla, Mat-LyLu hücresi ile *in vitro* bir çalışma da yürütülmüştür. Kontrol ile iki farklı RNL dozunun (2,5 μ M ve 5 μ M) uygulandığı bir deney grubu oluşturulmuştur. Mat-LyLu hücresi

3×10^5 olacak şekilde petrilere ekilmiş ve kültür ortamında gün aşırı medyum değişimi yapılmıştır. Kontrol grubu sıçanlara Bölüm 3.1’de açıklanan normal medyum, deney grubuna ise, $2,5 \mu\text{M}$ ve $5 \mu\text{M}$ dozlarında RNL uygulaması yapılmıştır. 48 saatlik inkübasyonun ardından medyumlar çıkarılmış ve trizol eklenerek hücreler toplanmıştır. Ayrıca protein düzeyinde yapılacak olan çalışmada kontrol amacıyla kullanılmak üzere, düşük metastatik özellikte olan AT-2 hücresinin de 3×10^5 hücre olarak petriye ekilmesi ve deneye uygun şekilde yetişmesi sağlanmıştır.

3.3.2. Dokuların Diseksiyonu

Primer tümör örnekleri için; kontrol ve deney gruplarından sakrifiye edilen sıçanların sağ ekstremitelerinin üst bölgesinde oluşan primer tümör, kılılı deri açılarak çıkartılmış ve makroskopik olarak incelenmiştir. Peritümöral kistler halinde yoğun ve kanlı bir sıvı birikiminin gözlemlendiği primer tümörlerde sıvı drenajı sağlandıktan sonra nekrotik bir görünüme sahip olmayan, mümkün olduğu kadar kılcal damar içermeyen bölgeler özenle tespit edilerek, yaklaşık $2-3 \text{ mm}^3$ büyüklüğünde doku parçaları bistüri yardımı ile alınmıştır.

Akciğer metastaz örnekleri için; öncelikle hayvanların göğüs kafesleri açılarak akciğerleri total olarak çıkarılmıştır. Akciğerin yüzeyinde genellikle kenarlara yakın kısımlarda saptanan metastaz odakları alınmıştır. Özellikle her sıçanın akciğerinden alınan metastatik odakların yaklaşık olarak aynı boyutta olmasına dikkat edilmiş ve nötral tamponlu formaldehit ile tespit edilmiştir.

Prostat bezi dokuları için; sıçanların peritonları açılarak, idrar kesesinin hizasında görülen prostat bezinden $2-3 \text{ mm}^3$ boyutunda alınan doku, nötral tamponlu formaldehit ile fikse edilmiştir.

Histolojik olarak hematoksilen & eosin (H&E) boyaması için; kontrol ve deney gruplarındaki sıçanlardan çıkarılan primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezi ile sağlıklı sıçanlardan alınan akciğer ve prostat örnekleri, nötral tamponlu formaldehit ile 18 saatlik fiksasyon işleminden sonra çıkan alkol serilerinden geçirilerek, dokulardan suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ksilen ile saydamlaştırılan dokular 42°C ’lik parafinde 24 saat bekletildikten sonra 52°C sıcaklıktaki parafinde dört saat tutulmuştur. Gerekli sertleşme işlemi sağlandıktan sonra dokular parafine gömülmüştür. Parafine

gömülen dokulardan mikrotomda (Leica) 5 µm kalınlıkta kesitler alınarak, Poly-L-lizin kaplı lamlara yapıştırılmıştır.

İmmünohistokimyasal analizler için; örnekler nötral tamponlu formaldehit ile 18 saatlik fiksasyondan sonra yukarıda açıklandığı şekilde gerekli dehidratasyon ve saydamlaştırma işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömülmüş ve daha sonra beş mikron kalınlıkta kesitler alınıp, Poly-L-lizin kaplı lamlara yapıştırılarak, +4 °C’de saklanmışlardır.

İmmünfloresan çalışması için; alınan tüm dokular soğuğa dayanıklı bir cam içerisinde izopentan (Bright-slide, BS01-128) ile hızla dondurularak sertleşmesi sağlanmış ve -86 °C’de bir gün saklanmıştır. İmmünfloresan çalışmalar için dondurulmuş olan dokulardan kriyostat ile beş mikronluk kesitler alınarak, lam üzerine dikkatlice yapıştırılmış ve işlem yapılana kadar preparatlar buzdolabında saklanmıştır.

Western Blott analizi için; *in vitro* olarak Mat-LyLu hücrelerinin yanı sıra Na_v1.7 varlığının gösterilmesinde kontrol amaçlı olarak düşük metastatik AT-2 hücreleri Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Buffer ile toplanıp ependorfa alınmış ve oda ısısında saklanmıştır.

PCR çalışmalarında kullanılacak olan tüm dokular ise, alındıkları gibi sıvı azot içerisinde hızlı bir şekilde dondurulduktan sonra -86 °C’de saklanmışlardır.

3.4. DOKU ANALİZ YÖNTEMLERİ

Dunning modeli prostat kanserli kontrol ve deney hayvanlarından alınan primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezi doku örnekleri, sağlıklı sıçanlardan alınan akciğer ve prostat bezi doku örnekleri ile *in vitro* olarak yetiştirilen ve RNL tedavisi uygulanan Mat-LyLu hücrelerindeki; VGSC Na_v1.7’nin ekspresyonu; histomorfolojik olarak H&E boyama ile, immünohistokimyasal ve immünfloresan yöntemlerinin yanı sıra, protein düzeyinde Western blott ve mRNA düzeyinde real-time PCR metodu kullanılarak incelenmiştir.

3.4.1. Hematoksilen & Eosin Boyama

Lam üzerine yerleştirilmiş olan kesitler parafinden arındırıldıktan sonra Harris Hemotoksilen ile 5-10 dakika boyanmıştır. Çeşme suyunda hafifçe yıkanıp, asit-alkol

ile çalkalanarak fazla boya akıtılmıştır. Nükleuslar mor renk alıncaya kadar (ışık mikroskobunda incelenerek) eşme suyunda bekletildikten sonra, eosin eriyiğinde 2-5 dakika süre ile tutulmuştur. Sonuçta, eşme suyunda kısa süre yıkanan preparatlar %70, %90, %96 ve %100'lk alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulanmıştır. Boyanan preparatlar entellan ile kapatılmıştır.

3.4.2. İmmünohistokimyasal Analiz

VGSC Na_v1.7 alt tipinin immnekspresyonu polimer bazlı horseradish peroksidaz (HRP) immünohistokimya boyama yöntemi ile gösterilmiştir. Bu amaçla, doku kesitlerinin bulunduğu preparatlar immünohistokimyasal boyama öncesinde deparafinize edilmek üzere, 37 C'de bir gece tutulmuş ve üç kez 5'er dakika ksilende bekletilmiştir. Ardından %96'lık iki ayrı etanolde 10'ar dakika tutulmuş ve dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi, metanol içerisinde hazırlanmış %3'lk hidrojen peroksit ile 20 dakika boyunca baskılanmıştır. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra, maskelenen antijenleri açığa çıkarmak amacıyla, preparatlara mikrodalga fırında 400 W güçte pH:9 Tris-EDTA (ScyTek) zeltisi ile antijen geri kazanım işlemi uygulanmıştır. Oda ısısında 20 dakika soğutulan lamalar, fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 5'er dakika yıkanıp, non-spesifik boyanmayı engellemek için dokulara 10 dakikalık protein blokajı (Histostain Bulk Kit, İnvitrogen LAB-SA Detection System, UK) yapılmıştır. Blokajın ardından 1:100 dilüsyon oranında fare monoklonal anti-sodyum kanal Na_v 1.7 (clone N68/6, Milipore) primer antikoru damlatılarak oda ısısında 60 dakika inkübe edilmiştir. Srenin sonunda kesitler iki kez PBS ile 5'er dakika yıkandıktan sonra, önce post primer tavşan anti-fare IgG, daha sonra da polimer anti-tavşan poli-HRP-IgG (Bond™ Polymer Refine Detection System, DS9800, Wetzlar, Germany) manuel olarak damlatılarak her birinde 20 dakika inkübe edilmiştir. Tekrar 5'er dakikalık iki kez PBS ile yıkanan preparatlara 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromojeni damlatılarak, 4-5 dakikalık inkübasyon sonunda boyanma kontrol edilmiştir. Distile su ile yıkanan preparatlara Mayer Hematoksilen ile nükleer zıt boyama yapılmış ve etanol ile dehidratasyondan sonra entellan ile kapatılmıştır.

3.4.2.1. Skorlama

Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait her dokunun ışık mikroskobu altında 20X büyütmede incelenmesi ile yapılan değerlendirme sonucu, Na_v1.7 kanal proteinin varlığı

ve immünekspresyonunun şiddetine yönelik olarak, boyanmayan örnekler, 0 (negatif); zayıf, fokal membranöz boyanma gösteren örnekler, 1 (+); orta derecede boyanma gösteren örnekler, 2 (++); kuvvetli boyanma gösteren örnekler ise, 3 (+++) şeklinde kabul edilerek skorum yapılmıştır (Cerit ve diğ., 2013).

3.4.2.2. *Image-J*

Kontrol ve deney gruplarına (2,5µM - 5µM RNL) ait primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokuları ile sağlıklı gruba ait akciğer dokusundan alınan örneklerin immünohistokimyasal boyanmaları sonucunda her gruptan en az 5 preparat ışık mikroskobu (Olympus CX 41) ile incelenmiş eşit yoğunluktaki ışık şiddetinde ve 40x büyütmede (Olympus DP71) dijital kamera ile fotoğrafları çekilmiştir. Hataları en aza indirmek için, her bir preparatın rastgele farklı yerlerinden beşer görüntü alınmış ve her bir görüntünün aynı alandaki pozitif sinyallerin ortalama optik yoğunluğu *ImageJ* programı ile ölçülmüştür (Nguyen ve diğ., 2013). İmmünohistokimyasal boyanarak görüntülenen preparatlardan primer tümör, akciğer ve prostat dokuları için rastgele 5 alan seçilip her alanda ekspresyon yapan ve yapmayan hücreler sayılıp ortalamaları alınarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sayımların her biri kör olarak yapılmış ve her grupta yaklaşık 2000-3000 hücrenin ekspresyonuna bakılmıştır.

3.4.2. İmmünofloresan Analiz

Buzdolabından alınan preparatlar 10 dakika asetonda bekletilmiştir. Lamlar, fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile 10'ar dakika yıkandıktan sonra nonspesifik boyanmayı engellemek üzere dokulara 15 dakikalık protein blokajı (Histostain Bulk Kit, Invitrogen LAB-SA Detection System, UK) yapılmıştır. Blokajın ardından 1:50 sulandırarak fare monoklonal anti-Sodyum kanal Na_v1.7 (S68-6) [Alexa Fluor ® 488]) antikoru damlatılarak oda sıcaklığı ve karanlıkta 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kesitler tekrar PBS ile 10'ar dakika yıkanmış, tamponlu gliserin ile kapatıldıktan sonra floresan mikroskop altında incelenmiş ve dijital kamera (Olympus DP71) ile fotoğraflanmıştır (Mohan ve diğ., 2008).

3.4.3. Western Blott Analiz

Yüksek metastatik özellikte olan Mat-LyLu hücreleri ve RNL (2,5 µM – 5 µM) tedavisi görmüş hücrelerle, kontrol amacıyla zayıf metastatik özellikte olan AT-2 hücreleri, RIPA tamponunda ependorfa toplanarak lizis edilmiştir. Hücrelerin daha iyi

parçalanması için 5 defa -196 °C sıvı azotta dondurma ve 37 °C ultrasonik katör çözme işlemi uygulanmıştır. Hücre lizatları 11000g'de +4 °C sıcaklıkta 15 dakika santüfj edilerek üst faz toplanmıştır ve proteinler PAGE ile ayrıştırılmıştır. Jeller, 10 cm'lik kasetlerde, %10'luk ayırma jeli, %6'lık paketleme jeli olarak hazırlanmıştır. Hücre lizatları 3'e 1 oranında x4 SDS-örnek tamponu ile karıştırılmış ve 5 dakika 95-100 °C'de bekletilmiştir. Daha sonrası örnekler uygulanmıştır. Elektroforez işlemi 50 V'da 15 dakika, sonrasında 100 V'da 60-75 dakikada tamamlanmıştır.

Elektroforez işleminden sonra jel de ayrıştırılan proteinler nitroselüler membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi 45 V'da 30 dakika, 90 V'da 60 dakikada gerçekleştirilmiştir. Membranlar 2 saat %5'lik bloklama çözeltisinde (% 5 yağ olup süt tozu) bekletilmiştir. Sonrasında membran bir gece boyunca 1/750 oranında sulandırılan Na_v1.7 (clone N68/6, Millipore) primer antikoru etkisinde bırakılmıştır. Sekonder antikor olarak TBS içerisinde 1/3500 oranında seyreltilen anti-mouse IgG-Biyotin (Milipore AP124B) kullanılmıştır. Protein bantlarının görüntülenmesi için membran TBS içerisinde 1/3500 oranında seyreltilen Streptavidin Alkalın Fosfataz (Milipore SA204) ile 20 dakika işleme konmuştur.

3.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi

Hem *in vitro* olarak kontrol ve 2,5 µM ile 5 µM RNL tedavi grubu Mat-LyLu hücrelerindeki, hem de *in vivo* deneyler sonucunda alınan primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezi dokularındaki VGSC'lerin Na_v1.7 alt tipinin mRNA transkript düzeyi, eş zamanlı PCR ile araştırılmıştır. Na_v1.7 geninin çoğaltılması için SPN1 ve SPN3 primerleri ve deney protokolünün RNA izolasyonu ve cDNA sentez verimi yönünden kontrolünü sağlayacak olan β-aktin genlerinin çoğaltılmasında ise, β-aktin (F) ve β-aktin (R) primerlerinden yararlanılmıştır (Tablo 3-2) (Diss ve diğ., 2001; 2005).

Tablo 3.2: PCR analizlerinde kullanılan primerler.

Primer adı	Baz dizisi
SPN1 (F)	5'- TTCATGACCTTGAGCAACCC-3'
SPN3 (R)	5'-TCTCTTCGAGTTCCTTCCTG-3'
β -Actin (F)	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'
β -Actin (R)	5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'

Na_v1.7 transkripti üzerinden SPN1-F ve SPN1-R primerleri ile çoğaltılan DNA fragmenti 424 bc boyutunda olup, dizisi aşağıda verilmektedir (Tablo 3-3). Na_v1.7 geni; PN1, SCN2A ve SCN9A olarak da isimlendirilmektedir.

Tablo 3.3: Na_v 1.7 gen dizisi

```

TCCAGAATGGACCAAAAATGTAGAGTACACTTTTACTGGGATATATACTTTTGA
ATCACTCATAAAAATCCTTGCAAGAGGCTTTTGCGTGGGAGAATTCACCTTCCT
CCGTGACCCTTGGAAGTGGCTGGACTTTGTTGTCATTGTTTTTGCGTATTTAACA
GAATTTGTAAACCTAGGCAATGTTTCAGCTCTTCGAACCTTTCAGAGTCTTGAGA
GCTTTGAAAATCTTTCTGTAATCCCAGGACTAAAGACCATCGTGGGGGCCCTG
ATCCAGTCAGTGAAGAAGCTCTCTGACGTCATGATCCTCACTGTGTTCTGTCTC
AGTGTGTTTGCACATAATTGGACTACAGCTGTTTATGGGCAACTTGAAGCATAAA
TGTTT

```

3.4.4.1. RNA Ekstraksiyonu ve Pürifikasyonu

Total RNA izolasyonu için; dokulara ve hücrelere guanidin tiyosiyanat eklenerek, TRIzol Reagent (Invitrogen) kullanılmıştır. Dokuların ve hücrelerin TRIzol ile muamelesinden sonra homojenizasyon işlemi gerçekleştirilerek üzerine önceden soğutulmuş olan kloroform ilave edilmiş, kloroform ve fenol fazlarının ayrılması için +4 °C'de 11000 g'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst bölgede toplanan su fazı ayrı bir ependorf tüpe alınıp, eşit miktarda isopropanol (Sigma) ilavesi yapılarak, -20 °C'de 60 dakika RNA çöktürme işlemi uygulanmıştır. Ardından RNA pelleti elde etmek amacıyla 4 °C'de 11000g'de 30 dakika santrifüj işleminden geçirilmiş ve elde edilen pellet 2 kez %70 etanol ile yıkanıp, santrifüj işleminin ardından etanolün uçması sağlanmıştır. RNA pelleti, RNase/DNase free su içerisinde çözünmüştür. Elde edilen RNA'yı saflaştırmak için DNaseI uygulaması yapılmıştır ve ardından total RNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi kantitatif olarak Nanodrop (BioSpec-nano, Shimadzu Biotech) cihazı ile 260/280 nm'lik absorbansta spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Ayrıca %0,8'lik agaroz jel elektoroferezinde etidyum bromür görüntüleme yöntemiyle RNA zincirinin bütünlüğü kontrol edilmiştir.

3.4.4.2. cDNA Sentezi

Konsantrasyonları belirlenen total RNA örneklerinin 1µg'ı alınmış, komplementer DNA (cDNA) sentezi yapılmak üzere Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (Roche) kullanılmıştır. İlk olarak, 1µg'lık RNA örneğine random primer ve nuclease-free su ilave edilip 65 °C'de 10 dakika kuru blok ısıtıcıda inkübe edilmiştir. Ardından tampon, deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP), ribonükleaz (RNaz) inhibitörü ve dithiothreitol (DTT) ilaveleri yapılmış, son olarak reverstranskriptaz enzimi eklenerek tekrar kuru blok ısıtıcıda 48 °C' de inkübasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen 20 µl hacimdeki cDNA örnekleri 100 µl'lik (1:5) hacimde seyreltilerek PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca herhangi bir genomik kontaminasyonu belirleyebilmek amacıyla, hücre ve dokular ile yapılan her bir cDNA sentezine kontrol amaçlı, ters transkriptaz enziminin ilave edilmediği birer örnek hazırlanmış ve PCR çoğaltmalarında kullanılmıştır.

3.4.4.3. Real-Time PCR

Doku ve hücre örneklerinden yapılan RNA izolasyonu sonucu elde edilen ve Na_v 1.7 geninin çoğaltılmasında kullanılacak olan cDNA'lar için kontrol geni olarak β -aktin kullanılmıştır (Diss ve diğ., 2001; 2005). Her PCR reaksiyonunda 5 μ l cDNA örnekleri ile ilgili primerler ve SYBR Green (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad) ilave edilerek her bir reaksiyonun son hacminin 20 μ l olması sağlanmıştır. CFX96 (Bio-Rad) Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilen analizlerde; 95 °C'de 10 dakika 'Taq' polimeraz aktivasyonu; 95 °C'de 30 saniye denatürasyon; 60 °C'de 30 saniye primer bağlanma ve uzama olmak üzere 35 siklustan oluşan deney protokolü uygulanmıştır. Ayrıca her PCR analizinde, Na_v1.7 ve β -aktin için cDNA ilavesi yapılmayan negatif kontrol örnekleri ile negatif ters transkriptaz örnekleri çoğaltılmıştır.

3.4.4.4. Jel Elektroforezi

Total RNA ürünlerinin bütünlüğü %0,8'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir. 1X TAE (Ambion) Tamponunun içerisine 0,8 gr agaroz (Ambion) ilave edilerek, hazırlanan karışım mikrodalgada kaynatılmış ve agarozun çözünmesi sağlanmıştır. Kaynatılan karışım, 10 dakika oda sıcaklığında soğutulurken içerisine etidium bromid ilave edilmiştir. İyi bir karışım gerçekleştirildikten sonra hava kabarcıkları olmaksızın önceden hazırlanmış olan jel plağına dökülerek katılması sağlanmıştır. İlk kuyucuğa DNA standardı yüklendikten sonra, sırasıyla diğer kuyucuklardaki örnekler brom-fenol mavisi ile karıştırılmış ve 400A, 80V akımda 20 dakika yürütülmüştür. Bantlar ultraviyole ışık altında incelenmiş ve RNA zincirinin bütünlüğü Science UV Translüminatör ile görüntülendikten sonra işleme devam edilmiştir.

3.5. İSTATİSTİK ANALİZ

Tüm deneylerden elde edilen veriler, grupların aritmetik ortalamaları ve her bir ortalamaya ait standart hata ($\pm$ SE) şeklinde verilmiştir.

İmmünohistokimyasal image-j analiz sisteminde, gruplardan elde edilen verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendikten sonra aralarındaki farklılıklar, tek yönlü ANOVA ve Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir (Nguyen ve diğ., 2013). Ekspresyon yapan hücre yüzdelerinin hesaplanmasında oranların karşılaştırılması testi uygulanmıştır (Zar, 1999).

In vivo deneylerden alınan primer tümör, akciğer metastazı, prostat dokusu ve *in vitro* da yetiştirilen Mat-LyLu hücrelerinden elde edilen verilerin real-time PCR analizleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ ile rölâtif olarak değerlendirilmiştir. (Livak ve Schmittgen, 2001). Kontrol ve deney gruplarındaki verilerin normal dağılım gösterdikleri belirlenerek gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA karşılaştırma testi ile hesaplanmıştır.

Yapılan tüm istatistik değerlendirmelerde $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir



4. BULGULAR

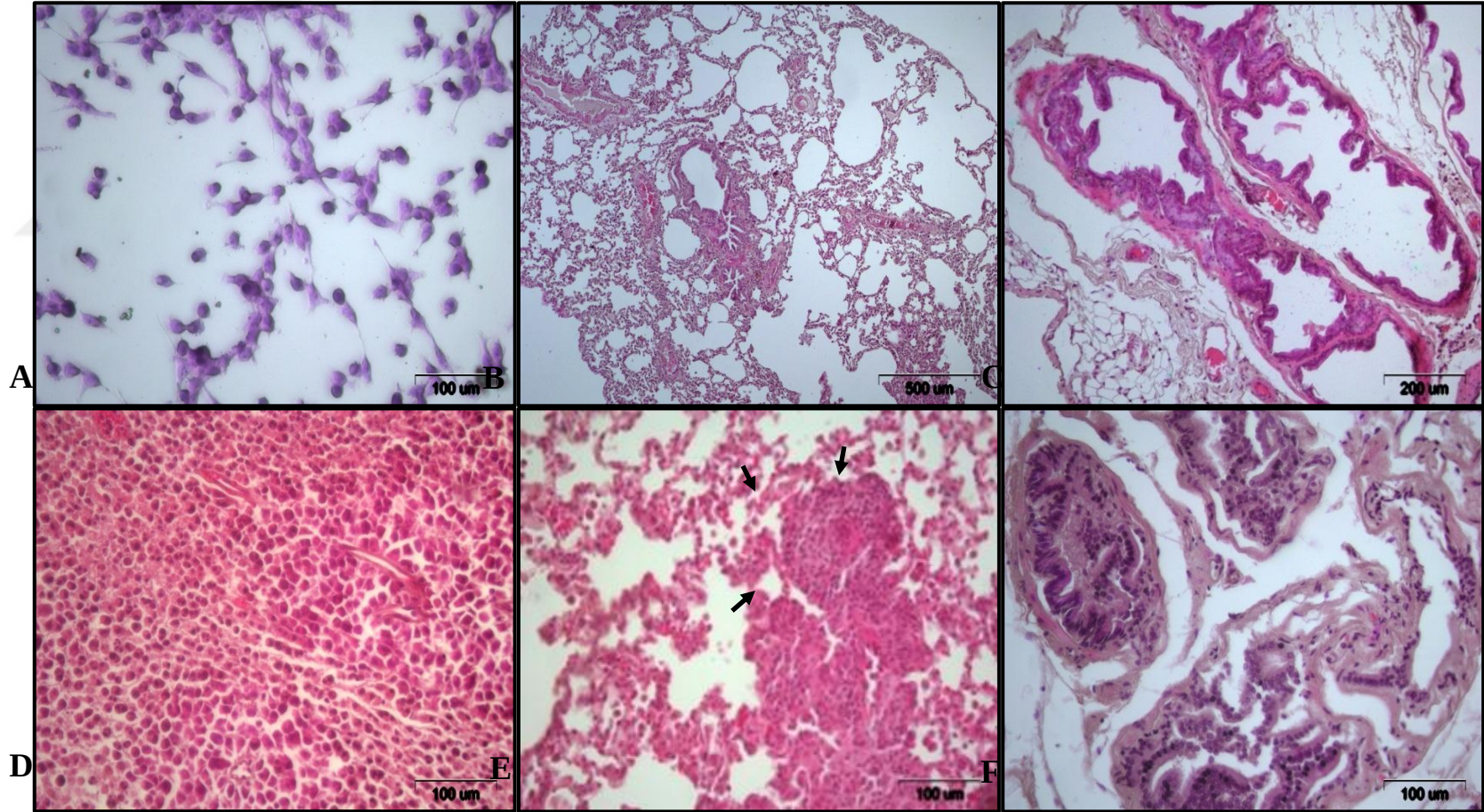
Bu çalışmada *in vivo* olarak, yüksek metastatik karakterli Mat-LyLu hücrelerinin inokülasyonu ile oluşturulan Dunning modeli prostat kanserli sıçanların RNL ile tedavi edilmesi sonucunda, kontrol ve deney grubu hayvanlardan alınan; primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokularında, *in vitro* olarak da, Mat-LyLu hücrelerinde VGSC, Na_v1.7 ekspresyonunun varlığı, immünohistokimyasal, immünfloresan, Western blott ve eş zamanlı PCR yöntemleri ile protein ve mRNA düzeyinde araştırılmıştır.

4.1. HİSTOMORFOLOJİK YÖNTEM

Yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin *in vitro* olarak ve Dunning modeli prostat kanserli sıçanlardan alınan primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokuları ile sağlıklı hayvanların akciğer ve prostat dokularının H&E ile boyanmaları sonucu ışık mikroskopundaki görünüşleri Şekil 4-1'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, *in vitro* da yetiştirilen Mat-LyLu hücre nükleuslarının ve bazofil kısımlarının hematoxilen ile mavi renkte, sitoplazmanın ise, eosin ile pembe renkte boyandığı izlenmektedir (Şekil 4-1.A).

Sağlıklı hayvanların akciğer dokusundan alınan histopatolojik kesitlerde; tek tabakalı hücrelerden oluşan düzenli alveolar yapıdaki akciğer dokusu gözlenmektedir (Şekil 4-1.B). Epitelin alt kısmında fibril içeren ince bir bağ dokusu tespit edilmiştir. Sağlıklı sıçanların prostat bezi dokusunda ise; duktus epididimisin kıvrıntılı bez yapısını oluşturan lümen oluşumu belirgindir (Şekil 4-1.C). Duktus epididimisin iç yüzündeki epitelin stereosilyalı psödostrafiye tipte olduğu izlenmektedir.

Mat-LyLu hücrelerinin inokülasyonu ile oluşturulan primer prostat tümöründe histomorfolojik olarak hücrelerin düzensiz bir şekilde sıralandığı, az differansiye bir karsinoma olarak dikkati çekmektedir (Şekil 4-1.D). RNL ile tedavi edilen sıçanlardan elde edilen akciğer metastazlarında, düzenli akciğer alveollerinin arasında primer tümörde olduğu gibi, düzensiz hücrelerden oluşan odaklar halindeki metastaz



Şekil 4.1: Mat-LyLu hücresi ile sağlıklı ve deney grubu sıçanlardan elde edilen dokuların H&E boyama ile histolojik görüntüleri. A) *İn vitro* olarak Mat-LyLu hücresi, (40X); B) Sağlıklı sıçanlarda akciğer, (10X); C) Sağlıklı sıçanlarda prostat, (20X); D) Deney grubu sıçanlarda primer tümör, (40X); E) RNL grubu sıçanlarda akciğer metastazı, (40X); F) RNL grubu sıçanlarda prostat dokusu, (40X) (Oklar metastaz odağını göstermektedir).

alanları görülmektedir (Şekil 4-1.E). Prostat bezi dokularında ise, düzensiz hücre bölünmelerine sahip yapısal bozuklukların varlığına rastlanmıştır (Şekil 4-1.F).

4.2. PROSTAT KANSERİNDE $Na_v1.7$ PROTEİN EKSPRESYONU

Mat-LyLu hücreleri ile oluşturulan Dunning modeli prostat kanserli ve RNL ile tedavi edilen sıçanların, primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokuları ile sağlıklı hayvanların akciğer ve prostat dokularının yanı sıra, pozitif kontrol için, sıçan kalp dokusu ve *in vitro* da yetiştirilen Mat-LyLu hücrelerinden alınan örneklerdeki $Na_v1.7$ proteininin varlığı ve düzeyi immünohistokimyasal ve immünfloresan olmak üzere iki farklı yöntem ile değerlendirilmiştir.

4.2.1. Hücre ve Dokularda $Na_v1.7$ Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Analizi

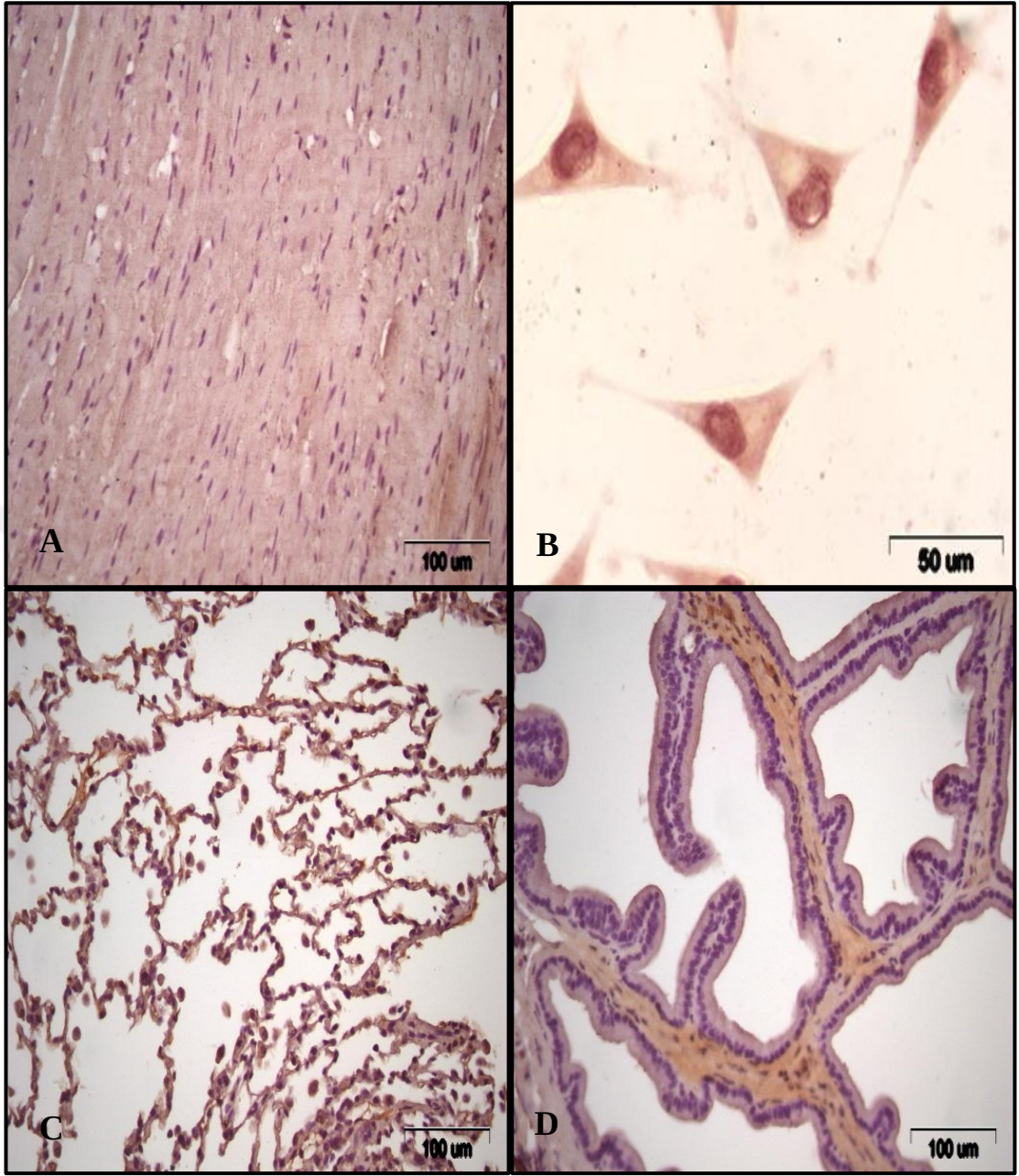
Yapılan çalışmada sağlıklı hayvanların akciğer ve prostat dokusu ile kontrol ve RNL (2,5 μ M - 5 μ M) grubu hayvanların primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokularının immünohistokimyasal boyanmaları sonrasında $Na_v1.7$ ekspresyonları histomorfolojik olarak ışık mikroskopunda incelenerek, örnekler aynı ışık yoğunluğunda ve büyütmede görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır. Alınan dokuların yanı sıra, aynı işlem *in vitro* da yetiştirilen Mat-LyLu hücrelerine de uygulanarak, $Na_v1.7$ ekspresyonunun varlığı gösterilmiştir. Değerlendirmeler, pozitif skorlama ve image-j sistemi olmak üzere iki farklı yöntem ile yapılmıştır.

4.2.1.1. İmmünreaktivitenin Skorlama ile Değerlendirilmesi

Alınan hücre ve dokulardaki değerlendirmeler, VGSC ekspresyon profili bilinen kalp dokusundaki pozitif immünreaktivite (Şekil 4-2.A) esas alınarak yapılmıştır.

In vitro olarak yetiştirilen Mat-LyLu hücrelerinde $Na_v1.7$ pozitif immünreaksiyon tespit edilmiş olup, spesifik reaksiyonun plazma zarı ve sitoplazmada lokalizasyon gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4-2.B). Reaksiyonun, bazı hücrelerde kuvvetli, bazı hücrelerde ise, göreceli olarak daha zayıf şiddette olduğu görülmüş ve bazı hücrelerin ise, perinükleer sitoplazmik bölgesinde daha kuvvetli bir immünreaksiyon belirlenmiştir.

Sağlıklı hayvanlardan alınan akciğer ve prostat dokularında da immünekspresyonunun varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4-2.C-D).



Şekil 4.2: Mat-LyLu hücresi ile sağlıklı sıçanların kalp, akciğer ve prostat dokularındaki Na_v1.7 immünreaktivitesi. A) Sağlıklı sıçanda kalp dokusu, 40X; B) *İn vitro* Mat-LyLu hücresi 100X, C) Sağlıklı sıçanda akciğer dokusu, 40X; D) Sağlıklı sıçanda prostat dokusu, 40X.

Kontrol grubu hayvanlarda gelişen primer tümörlerin az differansiye hücrelerden oluştuğu ve immünreaksiyonun hücrelerin sitoplazmasında, genellikle +1/+2 pozitif ile zayıf/orta şiddetinde olduğu gözlenmiştir (Tablo 4-1). Hayvanların akciğerlerinde gelişen ve düzensiz hücre yığınları (öbekleri) halinde dikkati çeken metastazlardaki Na_v1.7 ekspresyonlarına bakıldığında; çoğunlukla +2 pozitif ile orta şiddette bir ekspresyonun varlığı saptanmıştır. Prostat bezi dokularında ise; primer tümörde olduğu gibi, +1/+2 pozitif ile zayıf/orta şiddetteki immünreaksiyonun hücrelerin sitoplazmasında bulunduğu gözlemlenmiştir.

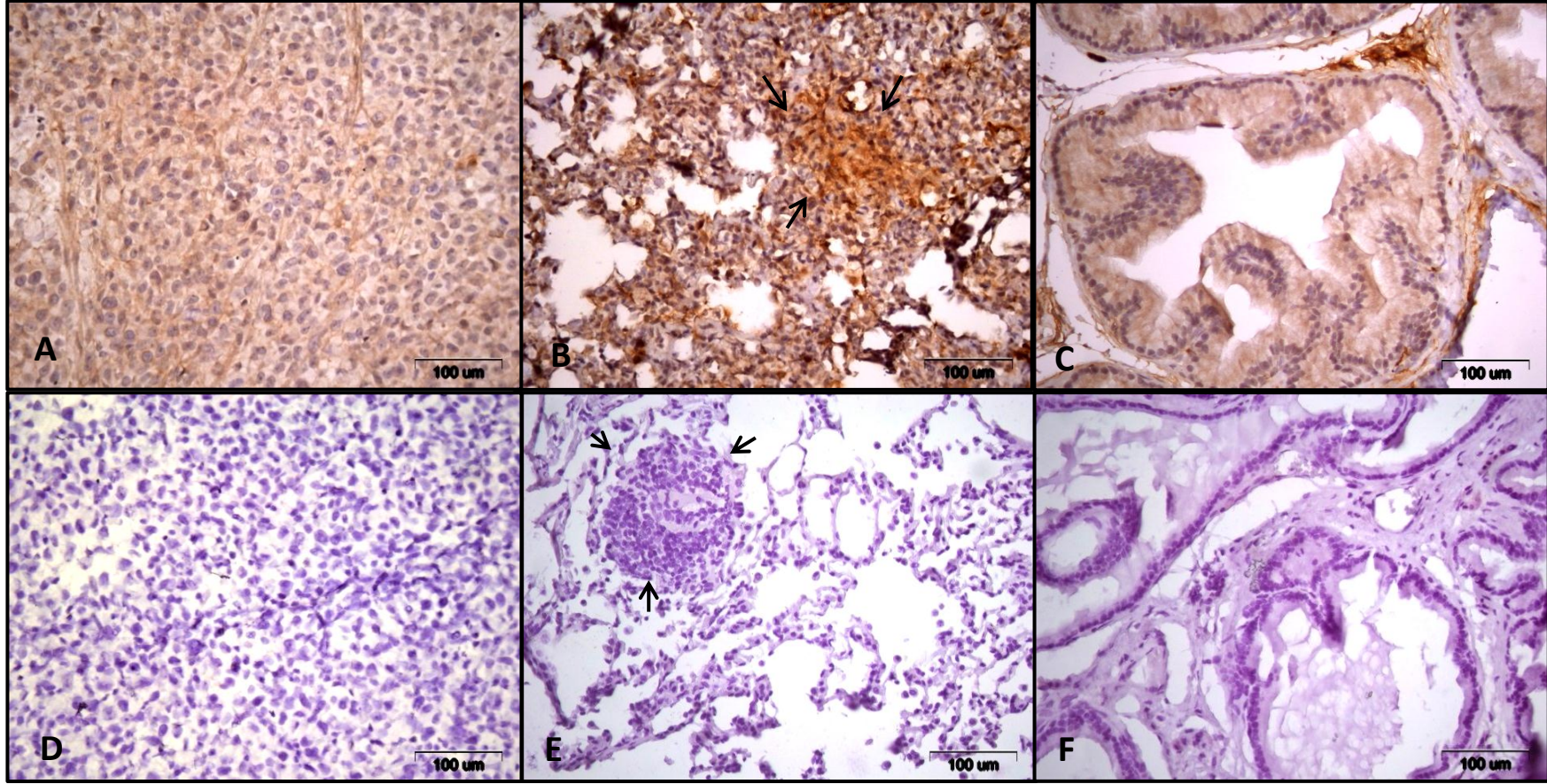
RNL (2,5 μ M – 5 μ M) tedavisi alan hayvanların Na⁺ kanal ekspresyonları değerlendirildiğinde, primer tümör hücrelerinde her iki tedavi dozu için de, kontrol grubu hayvanlarınkine benzer şekilde az differansiye olan hücrelerin sitoplazmalarında, zayıf bir ekspresyon gözlenmiştir (Şekil 4-3A, Tablo 4-1).

Tedavili hayvanların akciğerlerinde gelişen metastazlarda ise, primer tümöre göre daha şiddetli bir ekspresyon söz konusudur (Şekil 4-3B). Bu hayvanların, akciğer dokusunun tümünde dağınık halde ve +1/+2 pozitif düzeyinde bir immünreaksiyon görülmesine rağmen, metastaz odaklarındaki hücrelerde çoğunlukla +2/+3 pozitif yani, orta/kuvvetli şiddette bir immünekspresyon ile karşılaşılmaktadır (Tablo 4-1). Kullanılan her iki RNL (2,5 μ M - 5 μ M) dozunda da, akciğer metastazlarının Na_v1.7 immünreaksiyon şiddetlerinin benzer olduğu tespit edilirken, bu ekspresyon düzeyini, kontrol grubu hayvanların akciğer metastazlarındaki ekspresyon ile karşılaştırdığımızda, deney gruplarında, kontrol grubuna oranla daha şiddetli bir immünreaksiyonun olduğu saptanmıştır.

RNL (2,5 μ M - 5 μ M) grubu prostat bezi dokularındaki immünreaksiyonun primer tümörde olduğu gibi, hücrelerin sitoplazmasında ve her iki tedavi dozu için de, zayıf/orta şiddette olduğu gözlenmiştir (Şekil 4-3B) (Tablo 4-1). Kontrol ve tedavi grubu hayvanlarının prostat bezi hücrelerindeki Na_v1.7 kanalın ekspresyon şiddetleri arasında herhangi bir fark gözlenmemektedir.

Tablo 4.1: Dunning modeli prostat kanserli Kontrol ve Deney grubu (2,5 μ M, 5 μ M RNL) sıçanların farklı dokularında Na_v1.7 immünekspresyon skorları.
 0:immünekspresyon yok, +1: zayıf, +2: orta, +3: kuvvetli immünekspresyon şiddetini göstermektedir.
 (Parantez içindeki rakamlar gruplardaki n sayılarını vermektedir).

Doz/İlaç	Primer tümör	Akciğer metastazı	Prostat bezi
<i>Kontrol (FTS)</i>	0/+1/+2 (7)	0/+2 (5)	0/+1/+2 (7)
<i>2,5 μM RNL</i>	0/+1 (5)	+2/+3 (4)	0/+1 (7)
<i>5 μM RNL</i>	0/+1 (7)	+2/+3 (7)	0/+1/+2 (7)

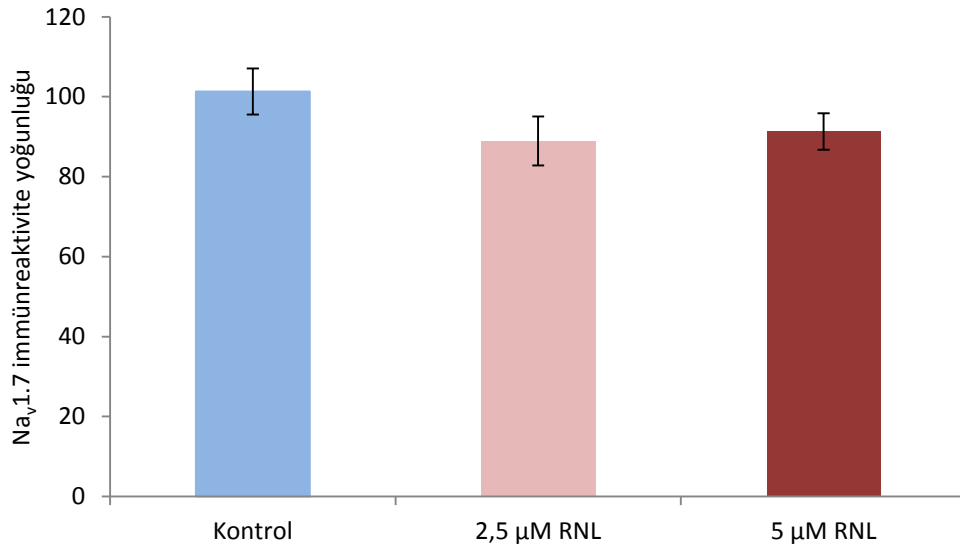


Şekil 4.3: Dunning model prostat kanserli deney grubu sıçanların farklı dokularındaki $Na_v1.7$ ekspresyonunu. A:Primer tümör, zayıf ekspresyon (+1), B: Akciğer metastazı, şiddetli ekspresyon (+3); C: Prostat dokusu, zayıf ekspresyon (+1); D: Primer tümör negatif kontrol; E: Akciğer metastazı negatif kontrol; F: Prostat negatif kontrol (40X), (oklar metastatik odağı göstermektedir).

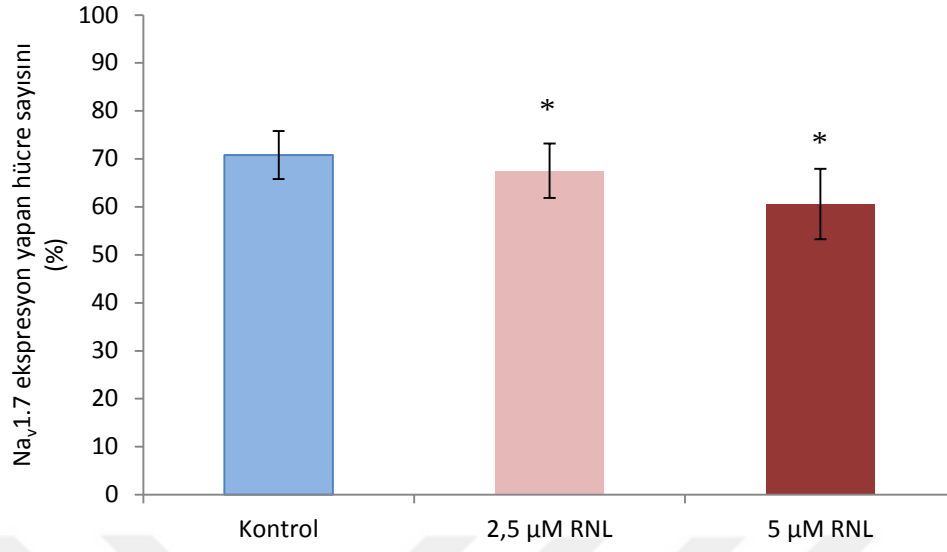
4.2.1.2. İmmünreaktivitenin İmage-J ile Değerlendirilmesi

Kontrol ve deney grubu sıçanlardan alınan primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezi dokularındaki $\text{Na}_v1.7$ ekspresyonunun immünohistokimyasal analizinde, İmage-J sistemi ile hem ekspresyon yapan hücrelerin yüzdesi hem de, ekspresyon yapan hücrelerin şiddetleri değerlendirilmiştir.

Kontrol ve deney grubu sıçanlardan alınan primer tümör dokularının image-J analizi ile değerlendirilmesi sonucunda RNL tedavisi alan hayvanlardan elde edilen primer tümörlerde, $\text{Na}_v1.7$ immün ekspresyonu yapan hücrelerin ekspresyon şiddetlerinin (Şekil 4-4) kontrol grubuna göre azaldığı izlenmekle beraber, bu farkın istatistik bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Şekil 4-5'te de ise, pozitif immünreaksiyon veren hücre sayılarının yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 4-2). 2,5 μM – 5 μM dozlarında RNL tedavisi alan gruplardaki primer tümörlerde kontrol grubu primer tümörler ile ekspresyon yapan hücrelerin yüzdeleri kıyaslandığında tedavili grupta ekspresyon yapan hücrelerin azaldığı ve doz ile ilişkili olan bu azalmanın istatistik olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.4: Kontrol ve RNL (2,5 μM – 5 μM) grubu sıçanların primer tümör hücrelerindeki $\text{Na}_v1.7$ immünreaktivite şiddetleri.

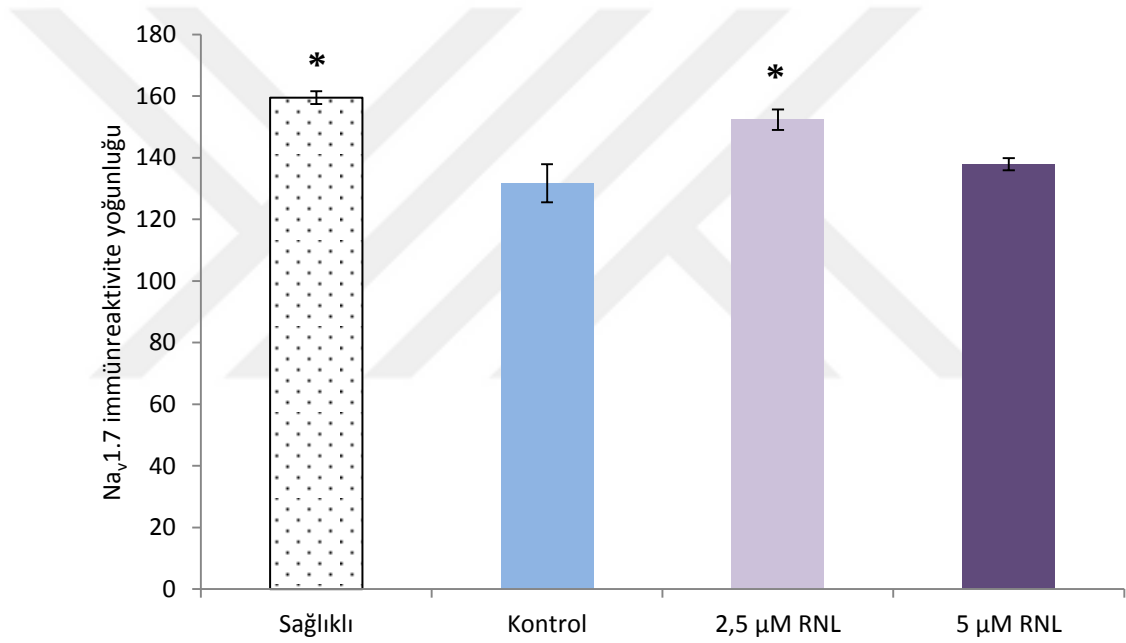


Şekil 4.5: Kontrol ve RNL (2,5 μM – 5 μM) grubu sıçanların primer tümörde Na_v1.7 ekspresyonu yapan hücre yüzdeleri (* p<0,05).

Tablo 4.2: Sağlıklı, kontrol ve RNL (2,5 μM – 5 μM) tedavili sıçanların primer tümör, akciğer ve prostat dokularında Na_v1.7 ekspresyonu yapan hücre yüzdesi (± SE).

Gruplar Dokular	Sağlıklı	Kontrol	2,5 μM RNL	5 μM RNL
Primer Tümör	-	%70,81 ±5,01	%67,55 ±5,66	%60,62 ±7,35
Akciğer	%29,35 ±4,04	%71,91 ±11,89	%45,76 ±3,96	%38,55 ±3,89
Prostat	-	%97,94 ±0,86	%98,94 ±1,07	%99,01 ±0,85

Akciğer metastazlarındaki $\text{Na}_v1.7$ immünreaktivitelerinin değerlendirilmesi sonucu, FTS verilen sağlıklı ve kontrol ile 2,5 μM - 5 μM RNL verilen deney grubu sıçanlarda immünreaksiyon veren hücrelerin ekspresyon şiddetlerinin her iki tedavi grubunda ve sağlıklı grupta kontrol grubuna oranla artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4-6). Gruplar arasında görülen bu farkın 2,5 μM RNL’de ve sağlıklı grupta istatistik bakımdan anlamlı ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. RNL tedavisi gören akciğer dokularındaki immünreaktivite yoğunluklarının sağlıklı dokulardaki yoğunluk benzerliği dikkat çekmektedir.

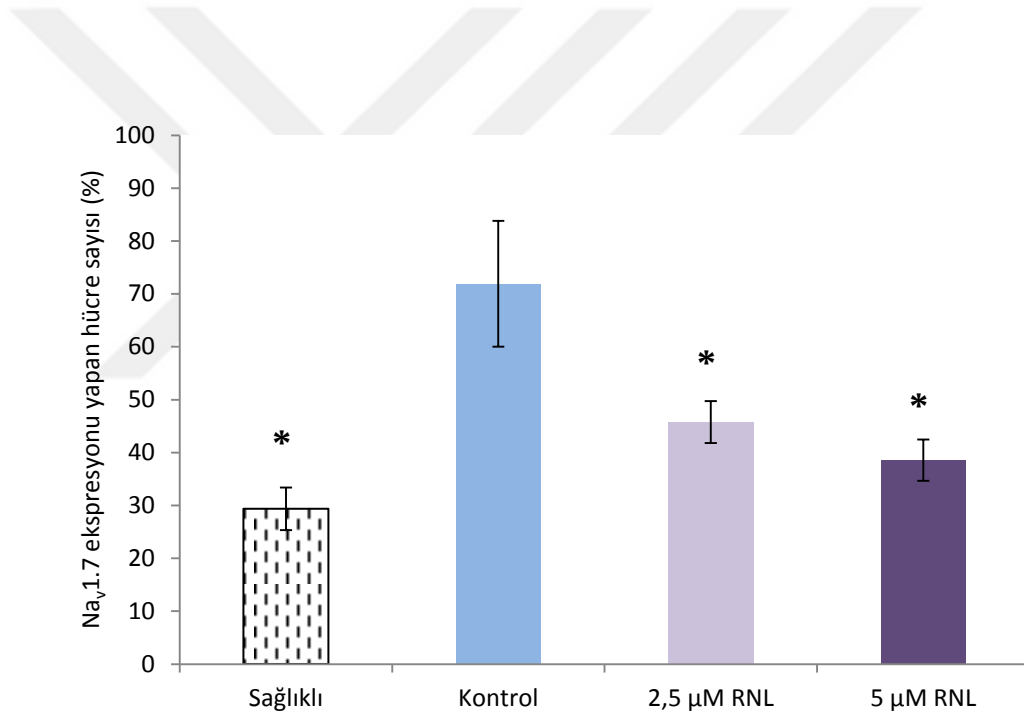


Şekil 4.6: Sağlıklı, Kontrol ve RNL (2,5 μM – 5 μM) grubu sıçanların akciğerlerindeki $\text{Na}_v1.7$ immünreaktivite şiddetleri (* $p<0,05$).

Kanser hücresi verilmemiş ancak paralellik sağlanması amacıyla tedavi süresince FTS uygulanmış olan sağlıklı, kontrol ve 2,5 μM ile 5 μM RNL verilen deney grubu sıçanlardan alınan akciğer dokularında $\text{Na}_v1.7$ immünreaksiyonu veren hücre yüzdelere bakıldığında (Tablo 4-2; Şekil 4-7) prostat tümörü içermeyen sağlıklı hayvanların akciğerlerinde $\text{Na}_v1.7$ ekspresyonu yapan hücre yüzdesi $29,35 \pm 4,04$ iken, sadece tümör ve/veya metastaz içeren kontrol grubunda ekspresyon yapan hücre yüzdesinin ($71,91 \pm 11,89$) arttığı ve bu farkın anlamlı ($p<0,05$) olduğu saptanmıştır.

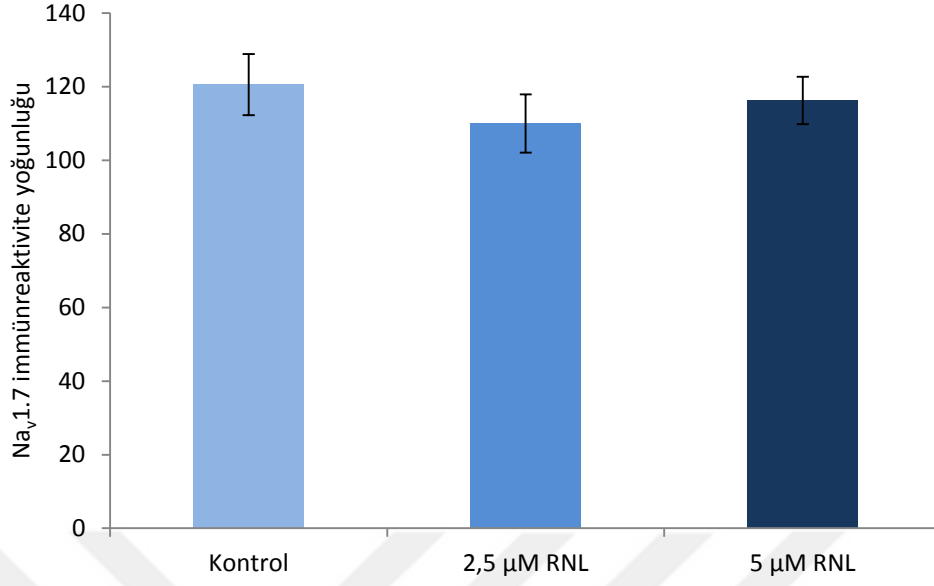
2,5 μ M ve 5 μ M RNL ile tedavi edilen hayvanlardan alınan akciğerlerde $\text{Na}_v1.7$ ekspresyonu yapan hücre yüzdeleri ise, sırasıyla $45,76 \pm 3,96$ ve $38,55 \pm 3,89$ olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçların istatistik bakımdan değerlendirilmesi ile hem 2,5 μ M hem de 5 μ M RNL'deki farkın anlamlı ($p < 0,05$) olduğu bulunmuştur. Hem RNL uygulanması hem de, uygulanan RNL dozunun artışı ile, $\text{Na}_v1.7$ ekspresyonu yapan hücre yüzdesinde dikkat çekici bir azalmanın meydana geldiği saptanmıştır.

RNL tedavisi alan hayvanların akciğerlerinde $\text{Na}_v1.7$ ekspresyonu şiddetlerinin hem de ekspresyon yapan hücre yüzdelerinin azalması, VGSC $\text{Na}_v1.7$ kanalının RNL ile baskılandığını edildiğini göstermektedir.

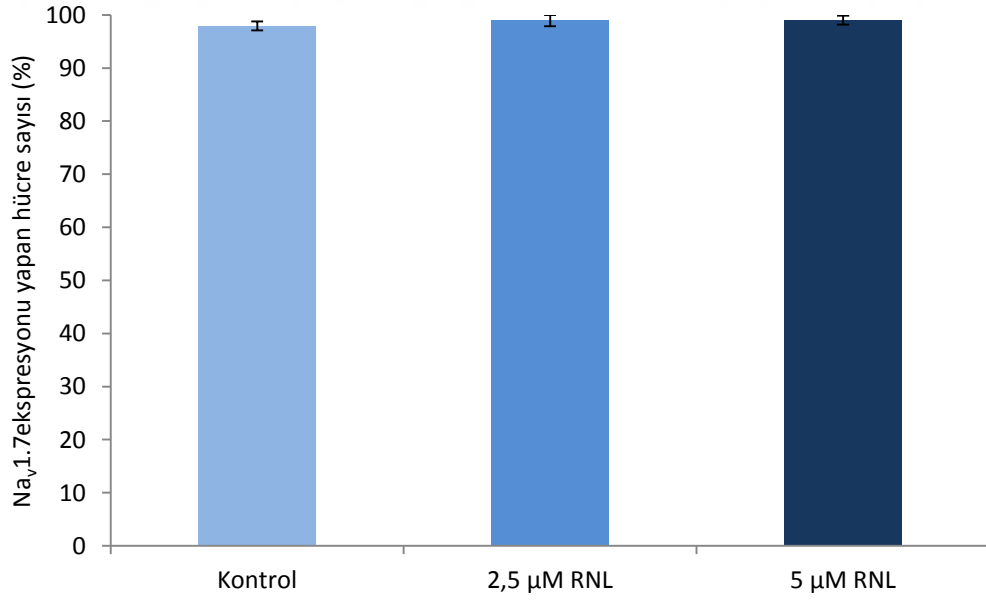


Şekil 4.7: Sağlıklı, Kontrol ve RNL (2,5 μ M – 5 μ M) grubu sıçanların akciğer metastazlarında $\text{Na}_v1.7$ ekspresyonu yapan hücre yüzeleri (* $p < 0,05$).

Prostat bezi hücrelerinin $\text{Na}_v1.7$ immünreaktivitesi değerlendirildiğinde, kontrol ve 2,5 μ M ile 5 μ M RNL tedavisi alan gruplar arasında hem hücrelerin ekspresyon şiddetleri (Şekil 4-8) hem de immünekspresyon yapan hücre yüzdeleri (Tablo 4-2; Şekil 4-9) bakımından bir fark izlenmemektedir.



Şekil 4.8: Kontrol ve RNL (2,5 μM – 5 μM) grubu sıçanların prostat bezi hücrelerindeki Na_v1.7 immünreaktivite şiddetleri.

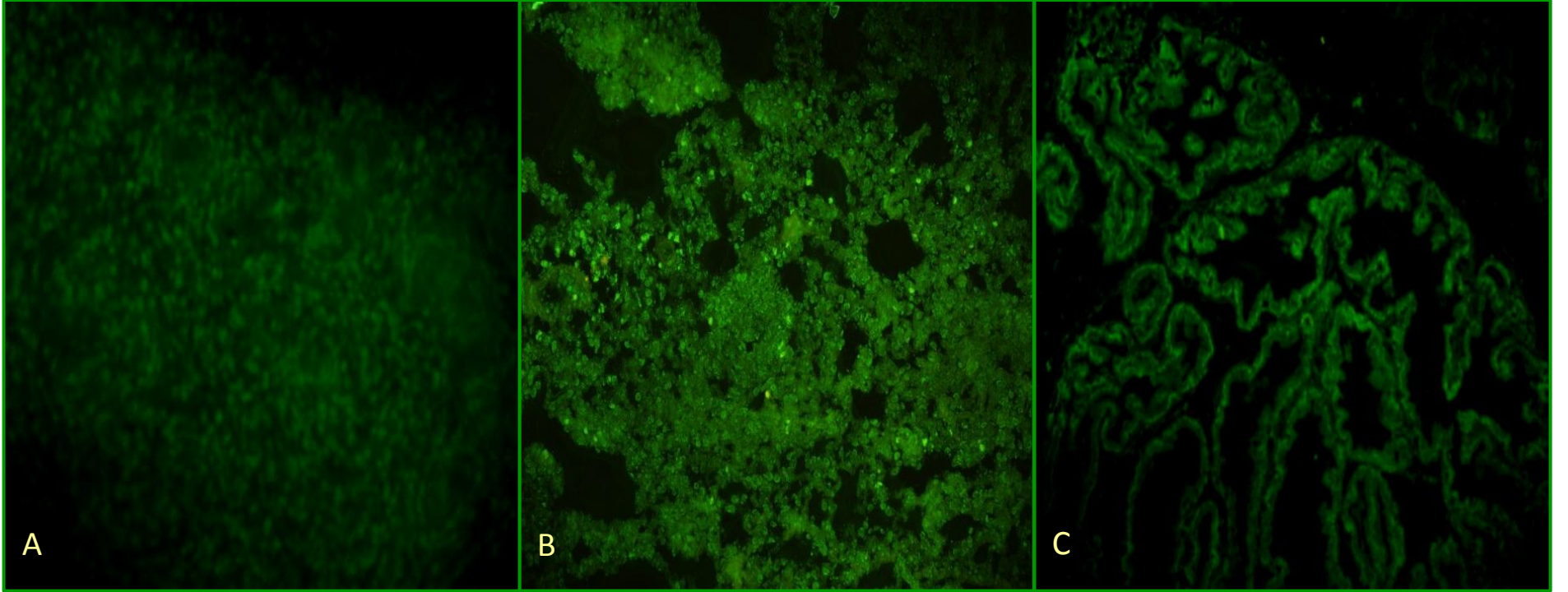


Şekil 4.9: Kontrol ve RNL (2,5 μM – 5 μM) grubu sıçanların prostat bezinde Na_v1.7 ekspresyonu yapan hücre yüzdeleri.

4.2.2. Dokularda Na_v1.7 Protein Ekspresyonunun İmmü floresan Analiz

Dunning modeli prostat kanserli kontrol ve deney grubu (2,5 μ M - 5 μ M RNL) hayvanlardan alınan primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokularında VGSC α proteini immü floresan yöntem ile değerlendirilmiş ve Na_v1.7 proteininin ekspresyonu gözlemlenmiştir (Şekil 4-10).

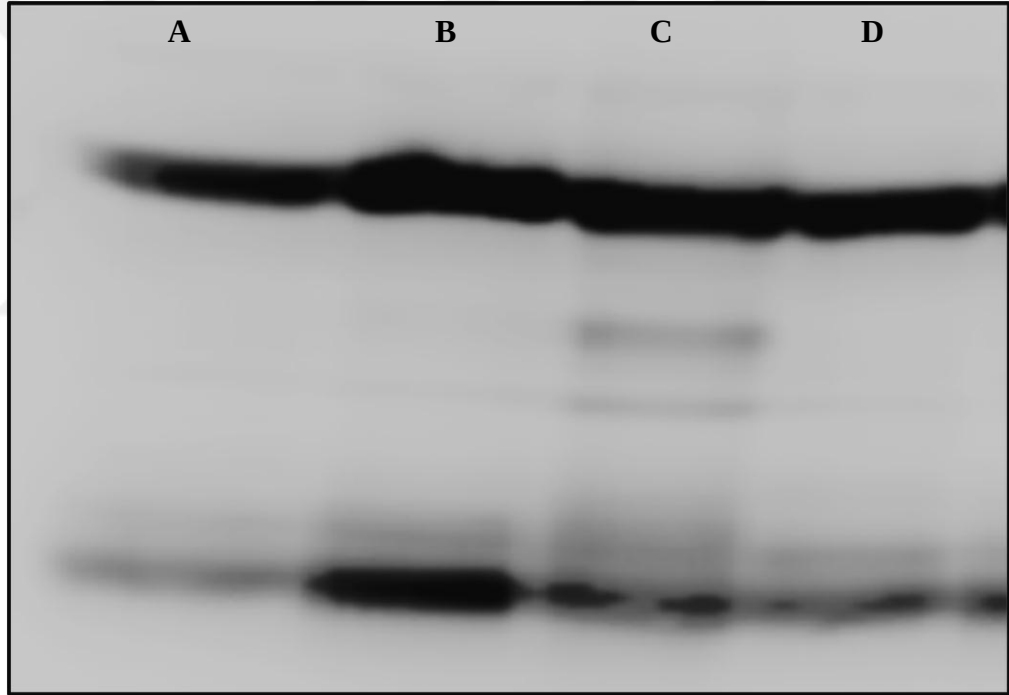
İmmü floresan analiz ile tüm dokularda VGSC protein ekspresyonu görülmesine karşın, ekspresyonun bazı hücrelerde daha kuvvetli iken, bazılarında daha zayıf bir floresan etki meydana getirdiği belirlenmiştir. Primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokularından alınan örneklerde tespit edilen hücre sinyalinin özellikle hücre sitoplazmasında ve hücrelerin uzantılarında yerleşim gösterdiği ve bazı yerlerde immünaktivitenin daha şiddetli olduğu gözlemlenmiştir. İmmü floresan analiz ile kontrol ve RNL (2,5 μ M - 5 μ M) grupları arasında belirgin bir farklılık izlenmemiş olup, sadece Na_v1.7 protein kanalının varlığı gösterilmiştir.



Şekil 4.10: Dunning modeli prostat kanserli ve 5 μ M RNL ile tedavi edilen sıçanların farklı dokularında immünfloresan ile VGSC α Na $_v$ 1.7 protein ekspresyonu. A) Primer tümör; B) Akciğer metastazı; C) Prostat bezi dokusu.

4.3. WESTERN BLOTT ANALİZİ

Metastatik yayılım ile ilişkili olduğu bilinen VGSC $\text{Na}_v1.7$ kanal proteininin gösterilmesinde yüksek metastatik Mat-LyLu hücresinin yanı sıra, kontrol amaçlı olarak düşük metastatik olan AT-2 hücresi de kullanılmıştır. *In vitro* da kontrol ve 2,5 μM - 5 μM RNL tedavisi alan Mat-LyLu hücreleri ile AT-2 hücrelerinin $\text{Na}_v1.7$ kanal proteini yönünden değerlendirilmesi amacıyla, Western Blotting yöntemi ile incelenmesi sonucu elde edilen bant görüntüleri Şekil 4-11'de verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi, elde edilen protein bantlarından, yüksek metastatik olan Mat-LyLu hücrelerinde, düşük metastatik AT-2 hücrelerine kıyasla daha fazla miktarda $\text{Na}_v1.7$ kanal proteininin bulunduğu izlenmektedir.

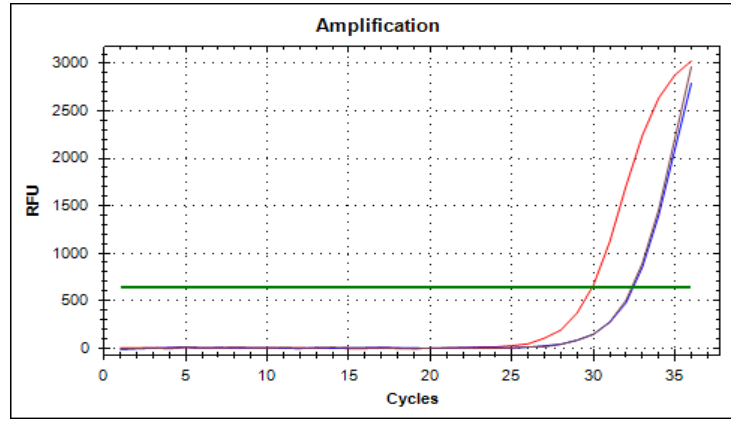


Şekil 4.11: Western Blott analizi ile membran protein bantları. A: AT-2 hücresi; B: Mat-LyLu hücresi; C: 2,5 μM RNL; D: 5 μM RNL

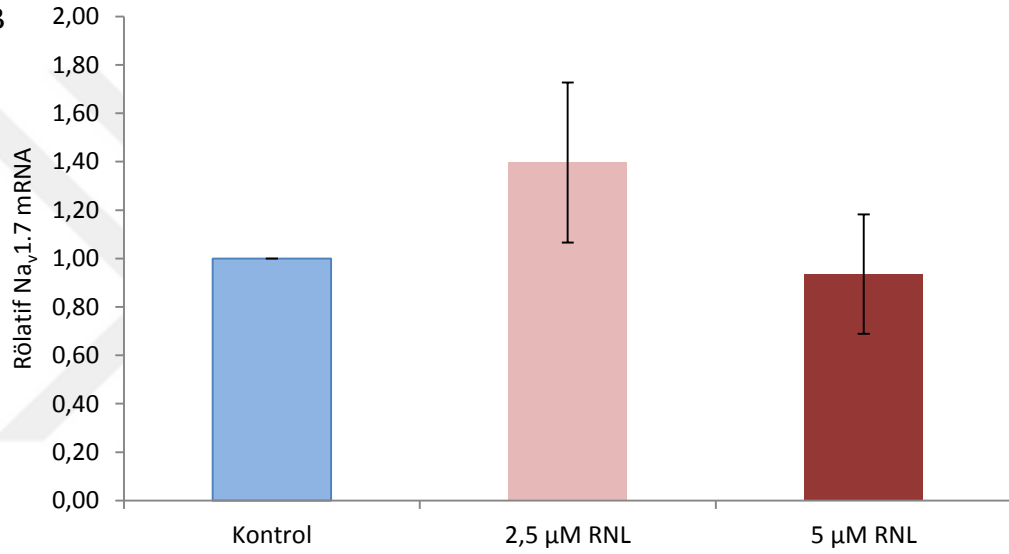
4.4. PCR ANALİZİ

Mat-LyLu hücreleri ile oluşturulan Dunning model sıçan prostat kanserli ve RNL tedavili hayvanlardan elde edilen primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokularındaki Nav1.7 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yapılan analizde kontrol geni olarak β -aktin kullanılmış ve melt curve de peakler kontrol edildikten sonra değerlendirme yapılmıştır. Prostat kanserli kontrol ve RNL (2,5 μ M - 5 μ M) tedavisi alan hayvanların primer tümör dokularına real-time PCR analizi uygulanması sonucu elde edilen amplifikasyon ve rölatif Nav1.7 mRNA miktarındaki değişim Şekil 4-12'de verilmiştir. Kontrol ile normalize edilen verilere göre, RNL tedavi grubundaki primer tümörlerin rölatif mRNA miktarı sırasıyla, $1,40 \pm 0,33$ ve $0,94 \pm 0,25$ olarak saptanmıştır. Kontrol grubu ile RNL gruplarına ait primer tümörlerdeki ekspresyon karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$).

A

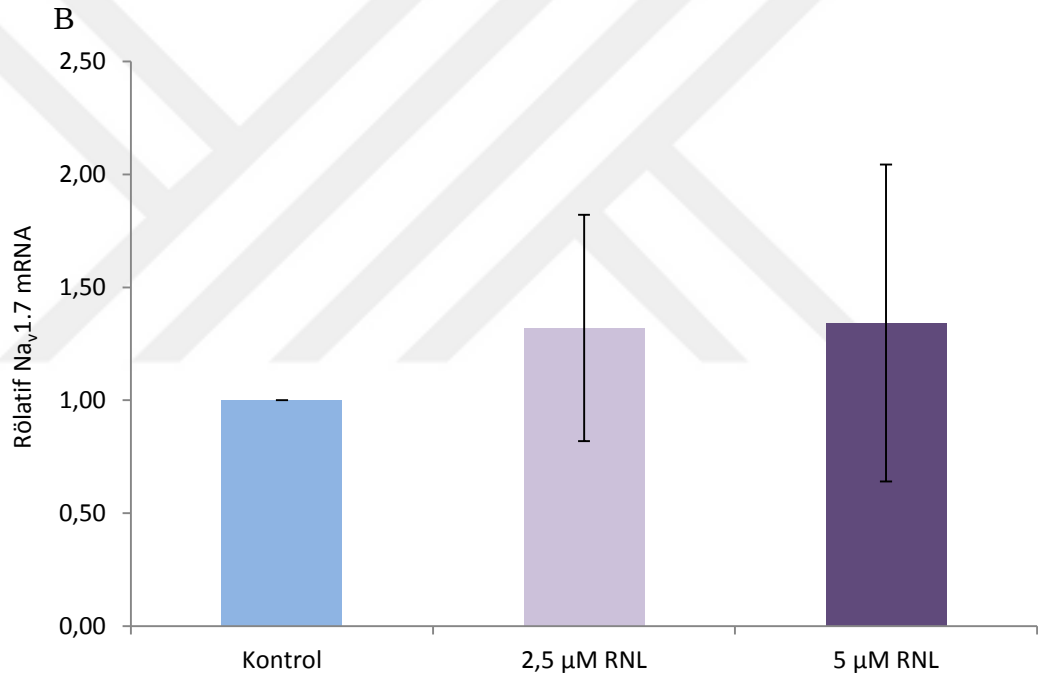
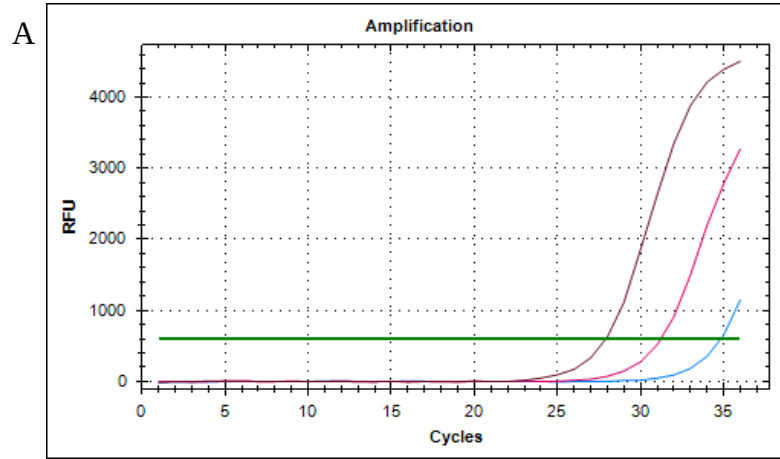


B



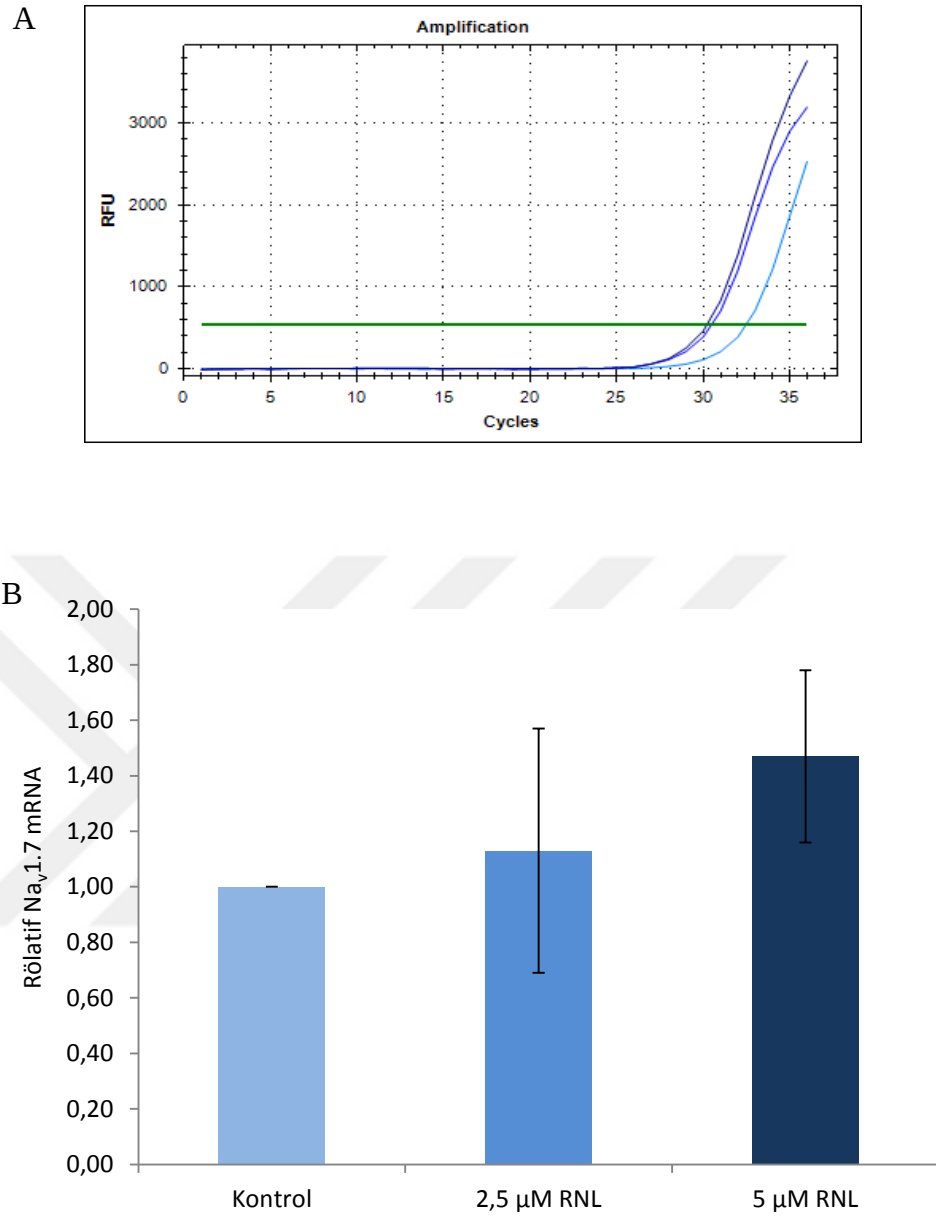
Şekil 4.12: Kontrol ve farklı dozlarda RNL uygulanan hayvanların primer tümörlerindeki. A: amplifikasyon, B: rölatif $Na_v1.7$ mRNA miktarları.

Kontrol ile 2,5 μ M ve 5 μ M RNL ile tedavi edilen gruplardaki sıçanların akciğer metastazlarındaki amplifikasyon ile $Na_v1.7$ ekspresyonları Şekil 4-13'de gösterilmektedir. Elde edilen veriler, FTS verilen kontrol grubuna göre normalize edildiğinde, RNL tedavi grubu akciğer metastazlarında rölatif mRNA miktarı 2,5 μ M RNL'de $1,32 \pm 0,50$ ve 5 μ M RNL'de $1,34 \pm 0,65$ olarak bulunmuştur. mRNA miktarında kontrol grubuna göre az da olsa, bir artış görülmesine karşın, gruplar arasında istatistik bakımdan anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.13: Kontrol ve farklı dozlarda RNL uygulanan hayvanların akciğer metastazlarındaki, A: amplifikasyon, B: rölatif Na_v1.7 mRNA miktarları.

Tüm grupların prostat bezi dokularındaki Na_v1.7 miktarının mRNA düzeyinde değerlendirilmesi sonucu elde edilen amplifikasyon grafiği ile Na_v1.7 mRNA ekspresyonları Şekil 4-14’de izlenmektedir. Normalize edilen sonuçlara göre 2,5 µM ve 5 µM RNL ile tedavi edilen sıçanların prostat dokusundaki rölatif mRNA miktarı sırasıyla; $1,13 \pm 0,44$, $1,47 \pm 0,31$ olarak bulunmuştur. Tedavi dozu ile paralel olarak mRNA miktarı artmasına karşın istatistik olarak bir anlam gözlenmemiştir.



Şekil 4.14: Kontrol ve farklı dozlarda RNL uygulanan hayvanların prostat bez dokularındaki
A: Amplifikasyon, B: Rölafif $Na_v1.7$ mRNA miktarları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada, bazı kanser hücrelerinin proliferasyonunda ve özellikle metastatik potansiyelinde VGSC'lerin kuvvetlendirici bir role sahip olduğunun bilinmesi ve bu kanalın bloklanmasıyla metastatik sürecin baskılanabileceği hipotezine dayanarak, Dunning model prostat kanserindeki $Na_v1.7$ kanalının varlığı ve RNL'nin kanal üzerindeki dolayısıyla da, metastatik potansiyel üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, Dunning sıçan prostat tümör modeline ait, yüksek metastatik karakterli Mat-LyLu hücrelerinin Copenhagen ırkı sıçanlara deri altı inokülasyonu ile oluşturulan deneysel prostat kanseri modelinde, sıçanların, ısrarlı/geç akım inhibitörü olarak Na^+ akımını bloke eden RNL ile tedavi edilmesi sonucunda; hem primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezi dokularındaki hem de, *in vitro* olarak yetiştirilen Mat-LyLu hücrelerindeki $Na_v1.7$ kanal proteininin varlığı/düzeyi immünohistokimyasal ve moleküler analizlerle protein ve mRNA düzeyinde incelenmiştir. Tez çalışması, hipotezin test edilmesinin yanı sıra, VGSC biyolojisinin anlaşılmasına ve RNL'nin prostat kanserinde yeni bir tedavi yöntemi olma potansiyeli taşımasını araştırmaktır.

Israrlı akım inhibitörü olan RNL'nin $Na_v1.7$ kanalı üzerindeki etkisinin ilk kez araştırıldığı bu çalışmada hücre ve sıçanlardan elde edilen dokulardaki $Na_v1.7$ kanal proteininin immünohistokimyasal analizinin skorlanması ile yapılan semikantitatif değerlendirilmede, primer tümör ve prostat dokularının, kontrol ile RNL (2,5 μ M - 5 μ M) gruplarında nadir hücrede zayıf şiddette immünoekspresyon gösterdiği saptanmıştır. Akciğer metastazlarında ise; deney gruplarında her iki dozda da immünreaksiyonun kontrole oranla daha kuvvetli bir immün boyanma gösterdiği belirlenmiştir.

İmmünohistokimyasal analizin image-J sistemi ile değerlendirilmesi sonucunda ise, semikantitatif değerlendirme olan skorlamadakine benzer şekilde, primer tümör ve prostat dokularına ait tüm grupların $Na_v1.7$ immünoekspresyon şiddetinde herhangi bir farklılık görülmezken; RNL tedavili sıçanların akciğer hücrelerinde $Na_v1.7$ ekspresyon şiddetinin hem primer tümör ile prostat dokularında hem de kontrol grubu akciğer hücrelerindeki ekspresyona oranla arttığı belirlenmiştir.

Kontrol grubuna oranla RNL tedavisi alan hayvanların akciğerlerinde ekspresyon yapan hücre sayısının azaldığı, artan RNL dozuna paralel olarak azalmanın kontrol grubunun ~%50'sine kadar inhibe olduğu ve böylece RNL'nin her iki dozda da $Na_v1.7$ kanallarını farklı oranlarda bloke ettiği tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular ile, RNL'nin $Na_v1.7$ ekspresyonunu bloke ettiği ilk kez ortaya konulmaktadır.

Antiepileptik bir ilaç olan fenitoin ile meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada $Na_v1.5$ ekspresyonunun normal meme dokusuna oranla meme kanserinde daha yüksek olduğu saptanmış ve fenitoinin etkileri değerlendirilmiştir (Nelson ve diğ., 2015). Yapmış olduğumuz çalışma Nelson ve diğ. (2015)'nin elde ettiği bulgularla benzerlik göstermekte olup, RNL, prostat kanserinde aktif olan $Na_v1.7$ kanalını bloke ederek, kanal ekspresyonunu azaltmıştır.

İmmünfloresan yöntemi ile primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezi dokularında $Na_v1.7$ proteininin varlığı saptanmıştır. $Na_v1.7$ kanal protein düzeyinin *in vitro* olarak araştırıldığı western blott analizi ile çalışmada kullandığımız Dunning modeli yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerindeki protein miktarının, zayıf metastatik özelliğe sahip olan AT-2 hücrelerinininkine oranla daha fazla olduğu gösterilmektedir.

Çalışmamızdaki bir diğer yöntem olan real-time PCR ile tüm hücre ve dokulardaki mRNA miktarı araştırılarak $Na_v1.7$ kanalı değerlendirildiğinde, hem Mat-LyLu hücrelerinde hem de primer tümör, akciğer metastazı ve prostat bezinde $Na_v1.7$ kanalının varlığı saptanmakla birlikte, elde edilen $Na_v1.7$ mRNA miktarları bakımından anlamlı bir fark belirlenememiştir. Bu durum, mRNA'ya giden tüm yolların bilinmemesinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde, $Na_v1.7$ kanalı üzerinde, ısrarlı sodyum kanal blokeri olan RNL'nin etkilerinin *in vitro* olarak Mat-LyLu hücrelerinde ve *in vivo* olarak ise ; Dunning model prostat kanserli sıçanlardaki metastatik potansiyel üzerindeki etkilerinin farklı yöntemler ile ayrıntılı bir şekilde incelendiği herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada günümüzde anjina pectoris tedavisinde kullanılan 5 μM 'lık RNL'nin *in vitro* daki Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği ancak, metastaz oluşumunda rol oynayan hücrelerin lateral hareketlerini anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Altun ve diğ., 2014). Aynı araştırmada *in vivo*

olarak, sıçanlarda oluşturulan prostat kanserinin akciğer metastazlarının hem sayılarında hem de büyüklükleri üzerinde 2,5 μM ve 5 μM dozlarındaki RNL'nin inhibisyon meydana getirdiği bildirilmiştir. Hücrelerin akciğer metastazında önemli rol oynayan $\text{Na}_v1.7$ kanal ekspresyonunu RNL'nin bloke/inhibe ettiğine yönelik elde edilen bu sonuç, Altun ve diğ., (2014)'nin çalışması ile paralellik göstermektedir.

RNL ile kanser arasındaki etkileşimin *in vitro* ve *in vivo* olarak meme kanserinde ve $\text{Na}_v1.5$ kanalları üzerinde araştırıldığı bir çalışmada Driffort ve diğ. (2014), 50 μM RNL'nin fonksiyonel $\text{Na}_v1.5$ kanallarına sahip olduğu bilinen yüksek metastatik MDA-MB-231 hücrelerinde $\text{Na}_v1.5$ akımını ve $\text{Na}_v1.5$ ile ilişkili olan hücre giriciliğini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. RNL ve kanser ilişkisinin VGSC ve metastatik potansiyel üzerindeki etkilerinin ilk kez araştırıldığı bu çalışmada ayrıca, NMR1 nude farelerde MDA-MB-231 hücreleri ile oluşturdukları meme kanseri üzerine 50 mg/kg/gün olarak 8 hafta süresince uygulanan RNL'nin, farelerin akciğerlerindeki metastaz kolonizasyonu üzerinde inhibisyon oluşturduğunu belirterek, RNL'nin meme kanseri metastazı için kullanılabilecek güçlü bir bloker olduğunu ileri sürmüşlerdir. Driffort ve diğ. (2014)'nin kullandığından çok daha düşük doz RNL (2,5 μM - 5 μM) ile Dunning modeli prostat kanserinde aktif olan $\text{Na}_v1.7$ kanalını bloke ettiğini gösteren bu çalışmamızın sonuçları, meme kanseriyle elde edilen sonuçlar ile uyum içerisindedir.

Bu çalışmalardan farkı olarak, 30 mg/kg RNL'nin günde iki kez, APC (min/+) farelerine intraperitonel olarak, 30 gün gibi uzun süreli uygulanması sonucunda, 40. günden itibaren ince bağırsakta tümör lezyonlarının görüldüğü ve farelerde farklı derecelerde insitu ve invaziv karsinomaların geliştiği Suckow ve diğ., (2004) tarafından ifade edilmektedir.

İlaç geliştirme ve prelinik eğerlendirmeler esnasında RNL ile yapılan kanserojenite araştırmalarında, oral dozlarda, sıçanlarda (900 mg/m²/gün) 21 ay boyunca 150 mg/kg/gün ve farelerde (150 mg/m²/gün) 24 ay boyunca 50 mg/kg/gün kullanıldığı ve tümör oluşumuna yönelik bir etkinin tespit edilemediği bildirilmektedir. Bu dozlar mg/m² cinsinden, maksimum önerilen insan dozu (MRHD) yüzey alanında 2 gr olmakta ve tolere edilen doz, sıçanda 0,8 katına ve farede 0,1 katına karşılık gelmektedir (European Medicines Agency, 2008).

VGSC'leri inhibe eden ilaçların *in vivo* etkilerini araştıran preklinik çalışmalar da yürütülmüştür. Bunlardan metastatik meme kanserinde, $\text{Na}_v1.5$ α alt biriminin migrasyon ve invazyon üzerindeki potansiyeli araştırılmıştır. Bu çalışmada VGSC'leri inhibe eden antiepileptik ilaç olan fenitoinin meme kanserli farelerde tümör büyümesi ve metastazı inhibe ettiği saptanmıştır (Nelson ve diğ., 2015). Ancak, $\text{Na}_v1.5$ 'in fonksiyonel aktivitesi ve *in vivo* daki tümör büyümesi üzerinde spesifik bir katkısı belirlenememiştir. Nelson ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada, normal meme dokusu ile meme kanseri dokusunu protein düzeyinde karşılaştırdığında, fenitoinin meme kanseri dokusundaki $\text{Na}_v1.5$ 'in upregüle olduğunu ortaya koymuşlardır. *In vitro* da, $\text{Na}_v1.5$ down-regülasyonu, hücre morfolojisini değiştirmiş ve CD44 ekspresyonunu indirmişti. Araştırmaya göre, $\text{Na}_v1.5$ 'in meme tümörlerindeki kanser hücrelerinin, metastatik yayılımı ve bu metastazların büyümesinde fonksiyonel role sahip olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, $\text{Na}_v1.5$ kanalının metastatik potansiyeli azaltmada faydalı olabileceğini desteklemektedir. Nelson ve diğ. (2015), TTX tarafından bloklanan Na^+ akımı, tümör dokularındaki kanser hücrelerinde tutulduğu ve böylece *in vivo* fonksiyonel VGSC aktivitesini teyit etmişlerdir. $\text{Na}_v1.5$ ekspresyonunun ısrarlı down-regülasyonu, ortotopic meme kanseri modelinde, tümör büyümesini, doku çevresindeki lokal invazyonunu ve akciğer, karaciğer, dalak metastazını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. $\text{Na}_v1.5$ 'in down regülasyonu sonucu hücrelerin proliferasyonu ve anjiyogenezi üzerinde bir etki meydana getirmezken, apoptozu arttırdığı tespit edilmiştir (Nelson ve diğ., 2015).

Metastaz ile ilgili çalışmalara paralel olarak ısrarlı akım blokeri olan RNL'nin, *in vitro* ortamda hücre hareketleri üzerine olan etkilerinin incelendiği başka bir çalışmada, %2 oksijen içeren akut hipoksik ortamda yetiştirilen MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin transvers hareketini hem TTX (10 μM) hem de RNL (300 μM)'nin tamamen baskıladığı ve bu baskılamanın Na^+ kanallarını bloke ederek gerçekleştirdiği tespit edilmiş ve RNL'nin hücre proliferasyonunu etkilemeksizin, hücrelerin invazyonu üzerinde inhibisyon meydana getirdiği belirlenmiştir (Djamgoz ve Onkal, 2013).

Bunlardan başka RNL'nin kardiyak hücrelerde bulunan geç sodyum akımının inhibisyonu yoluyla bazı antianjinal etkilerine yönelik (Antzelevich ve diğ., 2004) veya epilepsi (Anderson ve diğ., 2014) üzerindeki cevapları hakkında yapılmış *in vivo* ve *in*

vitro çalışmalar bulunmaktadır. RNL'nin kardiyak hücrelerde bulunan geç sodyum akımının inhibisyonu ile bazı antianjinal etkilere sahip olduğundan bu durum hücre içi sodyum akümüülasyonunu azaltmakta ve böylece hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesini önlemektedir. Anderson ve diğ. (2014) tarafından yapılan *in vivo* çalışmada, Scn2aQ54 fareler kullanarak, mutant Na_v1.2 transgenin epileptik nöbet sıklığını, 40 mg/kg RNL'nin etkisi intraperitonel uygulama öncesinde ve sonrasında 30 dakika boyunca izlenmiş ve tedavi hayvanlarla kıyaslandığında, nöbet sıklığında ~%50 oranında azalma meydana geldiği saptanmıştır.

Kanser ve metastatik potansiyel dışında RNL ile yapılan çalışmalar, diastolik ve sistolik kalp yetmezliği veya iskemi esnasında iyon kanallarının (Na⁺) paralel olarak da hücrede Na⁺'ın arttığını, pozitif feedback yolu ile Ca⁺² artışı sonucu kalpte oluşan ağrı, kasılma, fonksiyon bozuklukları üzerine ilacın terapötik bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Sossalla ve diğ., 2008). Na⁺ iyon kanallarını bloke ederek etki gösteren RNL, kalpteki diastolik fonksiyonları iyileştirmekte ve iskemi sonrasındaki bozuklukları azaltmaktadır (Filardi, 2011).

RNL'den başka VGSC'lerin kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini değerlendiren ve sıçan/insan kökenli prostat kanseri veya diğer kanser türlerine ait hücre soylarının kullanıldığı çok sayıdaki *in vitro* çalışmada, VGSC aktivitesinin farmakolojik olarak VGSC'lere karşı yüksek spesifiteye sahip bir nörotoksin olan TTX gibi blokerler kullanılarak ya da siRNA yöntemi ile mRNA düzeyinde sağlanan inhibisyon ile baskılanmasının hücre çoğalmasını etkilemediğine dair *in vitro* ve *in vivo* bulgular bulunmaktadır (Roger ve diğ., 2003; Fraser ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2012; Nelson ve diğ., 2015).

VGSC'nin kanserdeki özellikle de metastatik potansiyel üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Sodyum kanallarına karşı yüksek spesifitedeki TTX ile, tedavi edilen ve edilmeyen sıçanlarda, ortalama primer tümör ağırlıklarının karşılaştırılması yoluyla primer tümör gelişiminin incelendiği çalışmada, VGSC aktivitesinin primer tümör gelişimi üzerinde bir etkisinin bulunmadığı ancak, TTX ile intratümöral tedavi uygulanması sonucunda, hayvanların akciğerdeki metastaz sayılarını %44 azaltırken, yaşam süresini %22 oranında anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır (Altun ve Djamgoz 2008; Yıldırım, 2011; Yıldırım ve diğ., 2012). Ayrıca

metastatik potansiyelde etkin rol oynadığı bilinen hücresel invazyon yeteneğini farklı şekillerde değerlendirebilen “wound healing/yara iyileşmesi” ve “transverse migration” yöntemleri ile de yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinde ve bu hücrelerin yanı sıra PC-3 gibi, insan prostat kanseri hücrelerinde de TTX’in inhibe edici etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (Fraser ve diğ., 2003; Ding ve diğ., 2008).

Mat-LyLu yüksek metastatik sıçan prostat kanseri hücrelerinde VGSC’lerin eksprese olduğu ve TTX ile bloklanması sonucu, invaziv özelliklerinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir (Grimes ve diğ., 1995). Bu da VGSC ekspresyonunun kanser hücrelerinin metastaz ve invazyonundaki önemini vurgulamaktadır (Shan ve diğ., 2014).

Etki mekanizmaları VGSC inhibisyonu yolu ile olan bazı ilaçların kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri üzerindeki rollerine ilişkin çeşitli *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır. Prostat kanseri hücre soyları üzerinde, riluzole, sodyum valproat, karbamazepin, fenitoin ve bunların türevlerinin, klinikle ilişkili dozlarının hücre çoğalmasını/proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Abdul ve Hoosein, 2001, 2002; Anderson ve diğ., 2003). Yapılan diğer bir *in vitro* çalışmada ise, VGSC inhibisyonunda Class Ib antiaritmik ajan ve epileptik ilaç olan fenitoinin meme kanseri MDA-MB-231 hücre soylarında Na⁺ akımını önemli ölçüde azaltarak, migrasyon ve hücre invazyonunu baskıladığı belirlenmiştir (Yang ve diğ., 2012).

VGSC’leri inhibe eden ilaçların *in vivo* etkilerini araştıran preklinik çalışmalar da yürütülmüştür. VGSC inhibisyonu sağlayan tipik terapötik ajanlar arasında sayılamamakla beraber, resveratrol ve dokosaheksanoik asit gibi bileşiklerin, VGSC-bağımlı hücre migrasyonu ve invazyonunu azalttığı gösterilmiştir (İşbilen ve diğ., 2006; Fraser ve diğ., 2014b; Wannous ve diğ., 2015).

Resveratrol (üzüm), capsaicin (kırmızı biber), curcumin (zerdeçal) ve genistein (soya fasülyesi) gibi bazı biyolojik aktif doğal fenoller, sürekli inaktivasyon sırasında artan hiperpolarize potansiyelleri gibi, VGSC üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Harikumar ve Aggarwal, 2008; Prasad ve diğ., 2010). Curcumin dışında diğer fenoller, VGSC ısrarlı akım inaktivasyonunun voltaj bağımlılığını daha hiperpolarize potansiyele değiştirmektedir (Ingolfsson ve diğ., 2014). Resveratrol’un, VGSC üzerinde inhibitör

etkileri bulunmakta ve böylece metastatik hücrelerin davranışlarını değiştirmektedir. Fraser ve diğ., (2014) tarafından, TTX ve resveratrol'un ayrı ayrı ve birlikte etkisinin araştırıldığı çalışmada, 20 μ M resveratrol, yüksek metastatik Mat-LyLu hücrelerinin proliferasyonunu etkilemeksizin, hücrelerin VGSC'lerini bloke ederek, lateral ve transvers hareketleri ile invazyonunu inhibe ettiği ve böylece doğal bir antimetastatik ajan olabileceği ortaya konmuştur.

İlaveten, VGSC'leri hedef alan ropivacaine gibi bazı anestetiklerin de kanser hücrelerinde invazyonu inhibe edebileceği öne sürülmektedir (Baptista-Hon ve diğ., 2014). Ayrıca, öncelikle voltaj kapılı kalsiyum kanal blokeri olarak aktivite gösteren ve antiepileptik ilaç olarak geliştirilmesine karşın günümüzde güçlü ağrı kesici olarak kullanılan gabapentin, VGSC'leri de inhibe edebilmektedir (Zhang ve diğ., 2013). Gabapentinin *in vitro* ve *in vivo* olarak doza bağımlı şekilde hücre invazyonu üzerinde etki gösterdiği ve Dunning modeli prostat kanserli sıçanlarda akciğer metastazlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (Budan ve diğ., 2015).

Kuvvetli metastatik Mat-LyLu hücreleri ile zayıf metastatik AT-2 hücreleri kıyaslandığında, yapılan real-time PCR çalışmaları sonucu SCN9A geninin 1000 kat daha fazla ekspresye olduğu ve sahip olduğu VGSC'lerin %80 gibi büyük bir kısmını SCN9A kontrolünde oluşturulan Na_v1.7 alt tipi olduğu gösterilmiş olan hücrelerdir. Ayrıca Mat-LyLu hücrelerinde, Na_v1.7'nin yanısıra Na_v1.1, Na_v1.2 ve Na_v1.6 alt tiplerinin ekspresyonunun yapıldığı da belirlenmiştir (Diss ve diğ., 2001; Nakajima ve diğ., 2009). Yapılan elektrofizyolojik çalışmalar ile de Mat-LyLu hücrelerinde fonksiyonel VGSC'lerin ekspresyonunun gerçekleştiği ortaya konmuştur (Grimes ve diğ., 1995; Grimes ve Djamgoz, 1998; Fraser ve diğ., 2000; Fraser ve diğ., 2003; Ding ve Djamgoz, 2004; Brackenbury ve Djamgoz, 2006, 2007; Ding ve diğ., 2008; Nakajima ve diğ., 2009). Hücrelerde yer alan VGSC'nin protein düzeyinde varlığı ise yapılan immünohistokimyasal çalışmalar ile belirlenmiştir (Brackenbury ve Djamgoz, 2006, 2007; Nakajima ve diğ., 2009). Brackenbury ve Djamgoz (2006) tarafından *in vitro* olarak Mat-LyLu hücreleri ile yapılan çalışmada, 48 saat süre ile 1 μ M TTX uygulanmasına maruz kalan hücrelerdeki rölatif Na_v1.7 mRNA miktarında ve zarda yer alan fonksiyonel kanal proteini miktarında azalma meydana gelirken, sitoplazmada bulunan VGSC proteininde artış olduğunu ancak, hücredeki total VGSC protein

miktarının aynı kaldığını göstermişlerdir. Bu bulgularla ilişkili olarak, hücrelerdeki VGSC'lerin aktivite bağımlı pozitif feed back mekanizması ile düzenlendiğini öne sürmüşlerdir.

Günümüzde klinikte, Gleason skor biyopsisi ve PSA, prostat kanserinin tanısında ve izlenmesinde kullanılmaktadır (Diamandiz ve diğ., 1997; Foster ve diğ., 1999). Ancak bu güne kadar, prostat kanserini erken tanımlayan ve onun invaziv etkisini belirleyen özel ve hassas tümör markırları eksikliği giderilememiş ve bu nedenle de prostat kanseri hücrelerinin genotip ve fenotipinin değerlendirilebileceği yeni moleküler biyomarkır çalışmaları büyük önem kazanmıştır. Prostat kanseri için sodyum kanalları önemli bir tanı belirteci olma özelliği taşımakta ve bazı çalışmalarda prostat kanseri için, Na_v1.6 ve Na_v1.7'nin potansiyel biyomarkır olabileceği ileri sürülmektedir (Koltai, 2015). Prostat ameliyatı esnasında klasik sodyum kanal blokerleri/anestezik ilaçlar kullanarak, prostat kanserinin yayılmasını ve nüks etmesinin engellenebileceği rapor edilmiştir (Biki ve diğ., 2008). Böylece sodyum kanal blokerleri, özellikle de Na_v1.6 ve Na_v1.7 α alt birime yönelik spesifik blokerlerin, prostat kanserinin teşhis ve tedavisinde görev alabilecek potansiyelde olduğu görülmektedir (Shan ve diğ., 2014).

Giderek artan çalışmalar, kanserin korkutucu durumu olan metastaza yönelik olarak, VGSC'lerin önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Farklı kanser tiplerinde VGSC'lerin rolünü, miktarını ve etki potansiyelini özellikle de α ve β alt birimlerin etkilerini anlamaya yönelik değerlendirmelerin yapılması gerekliliği Brackenbury (2012) tarafından vurgulanmıştır. Esas amaç, VGSC'lerin hem α hem de β alt birimleri için diagnostik ve terapötik bir ajan olma potansiyellerinin yanı sıra VGSC ekspresyonunun dağılımının ve büyüklüğünün değerlendirilmesi olmaktadır (Patel ve Brackenbury, 2015). Bu amaçla, pek çok yeni VGSC blokerleri üzerinde araştırmalar yürütülmektedir.

Çeşitli ajanlar ya da ilaçlar aracılığı ile sağlanacak VGSC inhibisyonunun, kanser metastazında terapötik bir değer taşıyacağı yönünde umut verirken, bu alanda kullanılacak klinikle bağlantılı *in vivo* modeller; anti-metastatik ajanlar olarak faydalanılabilecek en etkili ve en güvenli VGSC blokerleri ilaçların ortaya konulmasında ihtiyaç duyulan deneysel sistemler haline geleceği Martin ve diğ., (2015) tarafından ileri sürülmektedir.

Na_v1.7 kanalı içeren yüksek metastatik karaktere sahip Mat-LyLu hücreleri ile oluşturulan *in vivo* Dunning sıçan prostat kanseri modelinde, immünohistokimyasal, immunfloresan, western blott ve eş zamanlı PCR gibi yöntemlerle, primer tümör, akciğer metastazı ve prostat dokularında Na_v1.7 kanalının varlığının gösterilmesi kullanılan modelin amaca uygunluğunu bir kez daha ortaya koymuştur. *İn vitro* olarak hücrelerde, *in vivo* olarak primer tümörlerin yanı sıra, akciğer metastazlarında Na_v1.7 kanalının varlığı, kanal gen aktivitesinin metastatik hücrelerde de devam ettiğini göstermekte ve VGSC'lerin metastatik yayılımındaki önemine işaret etmektedir. RNL'nin Dunning model prostat kanserli sıçanların primer tümör ve özellikle akciğer metastazlarının sayı ve büyüklükleri üzerindeki etkisi ilk kez grubumuz tarafından değerlendirilmiş olup, akciğerdeki metastaz sayı ve büyüklükleri üzerinde inhibe edici bir etki meydana getirdiği saptanmıştır (Altun ve diğ., 2014). Benzer şekilde Na_v1.7 kanalının varlığını araştırmak ve RNL'nin, Na_v1.7 kanalının ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, ilk kez yürütülen bu çalışmada ise, primer tümör ve metastazlarında Na_v1.7 kanal ekspresyonu/aktivitesi saptanırken, akciğer metastazlarında immünreaktivitenin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 2,5 µM ve 5 µM RNL ile tedavi edilen grupta, Na_v1.7 ekspresyonu yapan hücre yüzdesi hem primer tümörde hem de akciğerde azalma göstermiş ve doz artışına bağlı olarak, bu azalma yaklaşık ~%50 civarında olmuştur. Primer tümörde düşük olan Na_v1.7 ekspresyonuna karşın, metastazlarda yüksek bir ekspresyon görülmesi, yoğun VGSC ye sahip olan hücrelerin metastaz yapmak üzere primer tümörden ayrılmış olabileceklerini düşündürmektedir ki, benzer bir durum ile, metastatik kolon kanserinde de karşılaşılmıştır (Djamgoz, MBA., yayınlanmamış verileri). Ayrıca metastazlarda Na_v1.7 ekspresyon eden hücre yüzdesinin azalması ise, RNL tedavisi ile VGSC'lerin bloke olduğunu göstermektedir. Tüm bu bulgular ile, RNL'nin Na_v1.7 ekspresyonunu bloke ettiği ilk kez ortaya konulmaktadır.

Djamgoz ve diğ., (2014) tarafından belirtildiği gibi, kanserden meydana gelen ölümlerin primer tümörden çok, metastazlardan kaynaklandığı göz önüne alındığında, tedavide öncelik verilmesi gereken temel hedefin, metastazlar olduğu gerçeği öne çıkmaktadır. Israrlı akım blokeri olarak anjina pektoris tedavisi için kullanılan RNL ve diğer VGSC blokerlerinin metastazı önlemede anahtar rolü oynadığı, preklinik çalışmalara ışık tutarak, farklı bir alan olan kanser tedavisinde de kullanılma ihtimalini

kuvvetlendirerek, “kanserle birlikte yaşam” sloganının gelecekte gerçekleşebileceğinin kanıtlarını sağlamıştır.



KAYNAKLAR

- Abdul, M., Hoosein, N., 2001, Inhibition by anticonvulsants of prostate specific antigen interleukin-6 secretion by human prostate cancer cells, *Anticancer research*, 21(3B), 2045-2048.
- Abdul, M., Hoosein, N., 2002, Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer: expression and activity, *Anticancer research*, 22, 1727-1730.
- Aidley D.J., Stanfield P.R., 1996, Ion channels: Molecules in action, *Cambridge university press*, 59-100.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008, *Hücrenin moleküler biyolojisi*, TÜBA, Ankara, ISBN: 978-9944-252-22-5.
- Allen, D. H., Lepple-Wienhues, A., Cahalan, M.D., 1997, Ion channel phenotype of melanoma cell lines, *The journal of membrane biology*, 155, 27-34.
- Altun S., Djamgoz M.B.A., 2008, Sodyum kanalını bloke eden ajanların anormal karakterli sıçan prostat hücreleri üzerindeki etkisinin *in vivo* olarak araştırılması. Tübitak Proje Raporu, Proje No:104T031 (TBAG 2422).
- Altun, S., Kaya, H., Gümüşhan, H.; 2014, *İn vivo* sıçan prostat kanser hücreleri ve voltaj kapılı sodyum kanal ekspresyonu: metastatik potansiyelin değerlendirilmesinde yeni stratejiler ve moleküler yaklaşımlar, Tübitak Proje Raporu, Proje No:110T890.
- Anderson, L.L., Thompson, C.H., Hawkins, N.A., Nath, R.D., Petersohn, A.A., Rajamani, S., Bush, W.S., Frankel, W.N., Vanoye, C.G., Kearney J.A., George, A.L., 2014, Antiepileptic activity of preferential inhibitors of persistent sodium current, *Epilepsia*, 55(8):1274-83.
- Andrikopoulos, P., Fraser, S.P., Patterson, L., Ahmad, Z., Burcu, H., Ottaviani, D., Diss, J.K., Box, C., Eccles, S.A., Djamgoz, M.B.A., 2011, Angiogenic functions of voltage-gated Na⁺ channels in human endothelial cells: modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling, *The jurnal of biological chemistry*, 286(19):16846–16860
- Anisimov, V.N., Ukraintseva, S.V., Yashin, A.I., 2005, Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans?, *Nature reviews*, 5, 807-819.
- Antzelevitch C., Belardinelli L., Zygmunt A.C., Burashnikov A., Di Diego J.M., Fish J.M., Cordeiro J.M., Thomas G., 2004, Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. *Circulation*, 110:904–910. axon of *Loligo*. *The journal of physiology* 116, 497–506.

- Arcangeli, A., Becchetti, A., 2015, Novel perspectives in cancer therapy: Targeting ion channels, *Drug resistance updates.*, 21-22:11-9.
- Banon, D., Filion, K.B., Franck, C., Eisenberg, M.J., 2014, The usefulness of ranolazine for the treatment of refractory chronic stable angina pectoris as determined from a systematic review of randomized controlled trials, *American journal of cardiology*, 113(6):1075-82.
- Baptista-Horn, D.T., Robertson, F.M., Robertson, G.B., Owen, S.J., Rogers, G.W., Lydon, E.L., 2014, Optimal inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and Na_v1.5 channel function, *British journal of anaesthesia*, 113(1): 39-48.
- Becchetti, A., 2011, Ion channels and transporters in cancer, ion channels and cell proliferation in cancer, *The american journal of physiology- cell physiology*, 301:255-265.
- Belardinelli L., Shryock J.C., Fraser H., 2006, Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine, *Heart*, 92, 4-6.
- Ben-Ari Y., Khazipov R., Leinekugel X., Caillard O., Gaiarsa J.L., 1997, "GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'", *Trends neurosciences journal*, 20 (11), 523–9.
- Beneski, D.A., Catterall, W.A., 1980, Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin, *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 77(1):639-43
- Bennett, E.S., Smith, B.A., Harper, J.M., 2004, Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells, *Pflügers Archiv - European journal of physiology*, 447, 908-914.
- Bennett, M.I., Simpson, K.H., 2004, Gabapentin in the treatment of neuropathic pain, *Palliative medicine*, 18 (1), 5-11.
- Bernard, G., Shevell, M.I., 2008, Channelopathies: A review, *Pediatric neurology*, 38:73-85.
- Besson, P., Driffort, V., Bon, E., Gradek, F., Chevalier, S., Roger, S., 2015, How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells?, *Biochimica biophysica acta.*, 2493-501
- Biki B., Mascha E., Moriarty D.C., Fitzpatrick J.M., Sessler D.I., Buggy D.J., 2008, Anesthetic technique for radical prostatectomy surgery affects cancer recurrence: a retrospective analysis, *Anesthesiology*, 109, 180–7.
- Blandino, J.K., Viglione, M.P., Bradley, W.A., Oie, H.K., Kim, Y.I., 1995, Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG, *The Journal of membrane biology.*, 143 (2), 153-163.

- Brackenbury W.J., Djamgoz, M.B.A., 2006, Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line, *Journal of physiology*, 573, 343-356.
- Brackenbury, W., Djamgoz, M.B.A., 2007, Nerve growth factor enhances voltage-gated Na⁺ channel activity and Transwell migration in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line, *Journal of cellular physiology*, 210, 602-608.
- Brackenbury W.J., Chioni, A.M., Diss J.K., Djamgoz, M.B.A., 2007, The neonatal splice variant of Nav 1.5 potentiates *in vitro* metastatic behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells, *Breast cancer research and treatment*, 101, 149-160.
- Brackenbury, W.J., Djamgoz, M.B., Isom, L.L., 2008, An emerging role for voltage-gated Na⁺ channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers, *Neuroscientist*, 14 (6), 571-83.
- Brackenbury, W.J., Isom, L.L., 2008, Voltage-gated Na⁺ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets, *Expert opinion on therapeutic targets*, (9):1191-203.
- Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Chen, C., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., Ranscht, B., Isom, L.L., 2010, Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and β 1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth, *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 107:2283–8.
- Brackenbury, W.J., Isom, L.L., 2011, Na Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family, *Frontiers in pharmacology*. 28;2:53.
- Brackenbury W.J., 2012, Voltage-gated sodium channels and metastatic disease, *Channels (Austin)*, 6(5): 352–361.
- Brahimi-Horn M., Pouyssegur J., 2007, Oxygen, a source of life and stress, *FEBS letters*, 581: 3582-91.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *Journal of cell science*, 2009; 122: 1055-7.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., Forman, D., 2012, Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study., *The Lancet oncology*, 13 (8), 790-801.
- Brisson, L., Driffort, V., Benoist, L., Poet, M., Counillon, L., Antelmi, E., Rubino, R., Besson, P., Labbal, F., Chevalier, S., 2013, Nav1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia, *Journal of cell science*, 126:4835-42.
- Brooks SaS, 2001, Metastasis Research Protocols. Totowa, *Humano Press*.
- Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J., 2000, Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients, *Human pathology*, 5, 578-583.

- Bugan, I., Karagoz, Z., Altun, S., Djamgoz, M.B., 2015, Gabapentin, an analgenic used against cancer-associated neuropathic pain: effects on prostate cancer progression in an *in vivo* rat model, *Basic&clinical pharmacology&toxicology*, 118(3): 200-7.
- Cannon S.C., 2007, Physiologic Principles Underlying Ion Channelopathies. Neurotherapeutics, *The journal of the american society for experimental neuroTherapeutics*, 4: 174-18.
- Carrithers, M.D., Chatterjee, G., Carrithers, L.M., Offoha, R., Iheagwara, U., Rahner, C., Graham, M., Waxman, S.G., 2009, Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *The Journal of biological chemistry.*, 284(12):8114-26.
- Cattaneo, M., Porretta, A., Gallino, A., 2014, Ranolazine: drug overview and possible role in primary microvascular angina management, *International journal of cardiology*, 181C: 376-381.
- Catterall, W.A., 1980, Neurotoxins that act on voltage-sensitvi sodium channels in excitable membranes, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 20: 15-53.
- Catterall, W.A., 2000, From ionic currents to molecular review mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels, *Neuron*, 26, 13-25.
- Catterall, W.A., Goldin, A. L., Waxman, S.G., 2005, International union of pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relation of voltage-gated sodium channels, *Pharmacological reviews*, 57, 397-409.
- Catterall, W.A., Cestelle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F., Konoki, K., Scheuer, T., 2007, Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins, *Toxicon*, 49, 124-141.
- Catterall, W.A., 2012, Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology, *The Journal of physiology.*, 590(Pt 11):2577-89.
- Catterall, W.A., 2014, Sodium channels, inherited epileosy, and antiepileptic drugs, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 54:317-38.
- Cavallino, C., Facchini, M., Veia, A., Bacchni, S., Rosso, R., Rognomi, A., Rametta, F., Lupi, A., Bongo, A.S., 2015, New anti-anginal drugs: Ranolazine, *Cardiovascular & Hematological agents in medicinal chemistry*, 13(1):14-20.
- Center, M.M, Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., et al. 2012, International variation in prostate cancer incidence and mortality rates, *European urology*, 61(6):1079–92.
- Cerit, K.K., Karakoyun, B., Yüksel, M., Özkan, N., Çetinel, Ş., Dağlı, E.T., Yeğen, B.Ç., Tuğtepe, H., 2013, The antifibrotic drug halofuginone reduces ischemia/reperfusion-induced oxidative renal damage in rats, *Journal of pediatric urology*, 9:2, 174-183.
- Chaitman, B.R., 2002, Measuring antianginal drug efficacy using exercise testing for chronic angina: improved exercise performance with ranolazine, a pFOX inhibitor, *Current problems in cardiology*, 27: 527–555.

- Chaitman, B.R., Skettino, S.L., Parker, J.O., Hanley, P., Meluzin, J., Kuch, J., Pepine, C.J., Wang, W., Nelson, J.J., Hebert, D.A., Wolff, A.A., 2004a, for the Monotherapy Assessment of Ranolazine in Stable Angina (MARISA) Investigators. Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina, *Journal of the American College of Cardiology*, 43: 1375–1382.
- Chaitman, B.R., Pepine, C.J., Parker, J.O., Skopal, J., Chumakova, G., Kuch, J., Wang, W., Skettino, S.L., Wolff, A.A., 2004b, for the Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina (CARISA) Investigators. Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina, *The Journal of the American Medical Association*, 291:309–316.
- Chakravarti A., Zhai G.G., 2003, Molecular and genetic prognostic factors of prostate cancer, *World Journal of Urology*, 21:265–274
- Chan, J.M., Jou, R.M., Carroll, P.R., 2004, The relative impact and future burden of prostate cancer in the United States, *Journal of Urology*, 172:13-17.
- Chiang, A.C., Massagué, J., 2008, Molecular basis of metastasis, *The New England Journal of Medicine*, 359 (26), 2814-23.
- Chioni, A.M., Brackenbury, W.J., Calhoun, J.D., Isom, L.L., Djamgoz, M.B.A., 2009, A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(5):1216-27.
- Chioni, A.M., Shao, D., Grose, R., Djamgoz, M.B.A., 2010, Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42: 346-58.
- Connolly C.N., Wafford K.A., 2004, The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function, *Biochemical Society Transactions*, 32(3): 529–34.
- Cook, L.S., Goldoft, M., Schwartz, S.M., Weiss, N.S., 1999, Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *Journal of Urology*, 161(1):152–5.
- Crill W.E., 1996, Persistent sodium current in mammalian central neurons, *Annual Review of Physiology*, 58:349–62.
- Cusdin, F.S., Nietlishpach, D., Maman, J., Dale, T.J., Powell, A.J., Clare, J.J., Jackson, A.P., 2010, The sodium channel (beta) 3-subunit induces multiphasic gating in Nav1.3 and affects fast inactivation via distinct intracellular regions, *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 33404-12.
- Denac, H., Mavissen, M., Scholtysik, G., 2000, Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362, 453-479.

- Diamandis E.P., Yu H., 1997, Nonprostatic sources of prostate-specific antigen, *Urologic clinics of north america*, 24:275–282.
- Diaz, D., Delgadillo, D. M., Hernandez-Gallegos, E., Ramiraz-Dominguez, M., Hinojosa, L., Ortiz, C., Berumen, J., Camacho, J., Gomora, J., 2007, Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer, *Journal of cellular physiology*, 210,469-478.
- Ding, Y., Djamgoz, M.B., 2004, Serum concentration modifies amplitude and kinetics of voltage-gated Na⁺ current in the Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer, *The international journal of biochemistry&cell biology*, 36(7):1249-60.
- Ding, Y., Brackenbury, W.J., Onganer, P.U., Montano, X., Porter, L.M., Bates, L.F., Djamgoz, M.B.A., 2008, Epidermal growth factor upregulates motility of Mat-LyLu rat prostate cancer cells partially via voltage-gated Na⁺ channel activity. *Journal of cellular physiology*, 215: 77-81.
- Diss, J.K., Archer, S.N., Hirano, J., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A., 2001, Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines, *Prostate*, 48 (3), 165-78.
- Diss, J.K., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A., 2004, Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects, *European biophysics journal*, 33: 18-93.
- Diss J. K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., Djamgoz, M.B.A., 2005, A Potential novel marker for human prostate cancer: Voltage-gated sodium channel expression *in vivo*, *Prostate cancer & prostatic diseases*, 8, 266-273.
- Diss J.K., Fraser S.P., Walker M.M., Patel A., Latchman D.S., Djamgoz M.B.A., 2008, Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative *in vitro* and *in vivo* analyses of mRNA expression, *Prostate cancer prostatic diseases*, 11:325- 33.
- Djamgoz, M.B.A., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S.P., Korohoda, W., 2001, Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na⁺ channel activity, *Journal of cell science*, 114, 2697-2705.
- Djamgoz, M.B.A., 2007, Oncofoetal ion channels may present new targets for anticancer agents, *Pharmacy in practice*, 17, 60-64.
- Djamgoz, M.B.A., Onkal, R., 2013, Persistent current blockers of voltage-gated sodium channels: a clinical opportunity for controlling metastatic disease, *Recent patents anticancer drug discovery*.1;8(1):66-84.
- Djamgoz M.B., Coombes R.C., Schwab A., 2014, Ion transport and cancer: from initiation to metastasis, *Philosophical transactions of the royal society of london B: Biological sciences*, 369:20130092.

- Driffort, V., Gillet, L., Bon, E., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Joulin, V., Collin, C., Pagès, J.C., Jourdan, M.L., Chevalier, S., Bougnoux, P., Le Guennec, J.Y., Besson, P1, Roger, S., 2014, Ranolazine inhibits NaV1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization, *Molecular cancer*, 11;13(1):264.
- Eble J., Sauter, G., Epstein, J.I., Sesterhenn, I., 2004, Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. World Health Organization classification of tumors, *Modern pathology*, IARCC Press, 359.
- Eijkelkamp, N., Linley, J.E., Baker, M.D., Minett, M.S., Clegg, R., Werdehausen, R., Rugiero, F., Wood, J.N., 2012, Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels, *Brain*, 135 (9), 2585–2612.
- Epstein J.I., Kirby R., Partin, A., Feneley, M., 2006, Histopathology of prostate cancer and pathologic staging. Prostate Cancer: Principles and Practice, *Taylor and Francis Group*, 116.
- Epstein J.I., Walsh, P.C., Retik, A.B., Vaughan, E.D., 2007, Pathology of prostatic neoplasia. Campbell's Urology, *Ninth edition Philadelphia, W.B. Saunders Company*, Volume 3 2874-82.
- Fairhurst, C., Watt, I., Martin, F., Bland, M., Brackenbury, W.J., 2015, Sodium channel-inhibiting drugs and survival of breast, colon and prostate cancer: a population-based study, *Scientific reports*, 5:16758.
- Ferlay, J., Parkin, D.M., Steliarova-Foucher, E., 2010, Estimates of cancer incidence and mortality in Europe 2008, *European journal of cancer*, 46(4):765-81.
- Filardi, P.P., 2011, Ranolazine a new drug with a class action, *Eleven international symposium heart failure & co*.
- Foster C.S., Cornford P., Forsyth L., Djamgoz M.B., Ke Y., 1999, The cellular and molecular basis of prostate cancer, *BJU International*, 83:171–194.
- Fournier, G., Valei, A., Mangin, P., Cussenot, O., 2004, Prostate cancer. Epidemiology. Riskfactors. Pathology, *Annales d urologie*, 187-206.
- Fraser, S.P., Ding, Y., Liu, A., Foster, C.S., Djamgoz, M.B.A., 1999, Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic Mat-LyLu rat prostate cancer cell line, *Cell tissue research*, 295, 505-512.
- Fraser, S.P., Grimes, J.A., Djamgoz, M.B., 2000, Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines, *Prostate*, 44 (1), 61-76.
- Fraser, S.P., Salvador, V., Manning, E., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R., Djamgoz, M.B.A., 2003, Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviours involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility, *Journal of cellular physiology*, 169, 479-87.

- Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Lloyd, L.J., Pani, F., Chioni, A.Am., George, A.J.T., Djamgoz, M.B.A., 2004, T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity, *FEBS Letters*, 569, 191-194.
- Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Chioni, A-M., Mycielska, M.E., Pan H., Yamacı, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., Djamgoz, M.B.A., 2005; Voltage-gated sodium channel expression and potential of human breast cancer metastasis, *Clinical cancer research*, 11, 5381-5389.
- Fraser, H., Belardinelli, L., Wang, L., Light, P.E., McVeigh, J.J., Clanachan, A.S., 2006, Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 41(6):1031-8.
- Fraser, S.P., Ozerlat-Gunduz, I., Onkal, R., Diss, J.K., Latchman, D.S., Djamgoz, M.B.A., 2010, Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na⁺ channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion, *Journal of cellular physiology*, 224: 527-39.
- Fraser, S.P., Ozerlat-Gunduz, I., Brackenbury, W.J., Fitzgerald, E.M., Campbell, T.M., Coombes, R.C., Djamgoz, M.B.A., 2014a, Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation, *Philosophical transactions of the royal society of london. series B, biological sciences*, 369(1638).
- Fraser, S.P., Foo, I., Djamgoz, M.B., 2014b, Local anaesthetic use in cancer surgery and disease recurrence: role of voltage-gated sodium channels?, *British journal of anaesthesia*, 113 (6), 899-902.
- Fulgenzi G., Graciotti L., Faronato M., Soldovieri M. V., Micelli F., Amoroso, S., Annunziato L., Procopio, A., Taglialatela M., 2006, Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility, *The International journal of biochemistry & cell biology*, 38, 1146-1159.
- Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., Wang, Z., 2010, Expression of voltage-gated sodium channel subunit in human ovarian cancer , *Oncology reports*, 23, 1293-1299.
- Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G., Le, Guennec, J. Y., 2009, Voltage-gated sodium channel activity promotes cyteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells, *The Journal of biological chemistry*, 27;284(13), 8680-8691.
- Gintant, G.A., Datyner, N.B., Cohen, I.S., 1984, Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers, *Biophysical journal*, 45: 509–512.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hoffman, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandelblat, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M.,

- Waxman, S.G., Wood, J.N., Catterall, W.A., 2000, Nomenclature of voltage gated sodium channels, *Neuron*, 28, 365-368.
- Goldin, A.L., 2001, Resurgence of sodium channel research, *Annual review of physiology*, 63:871-94.
- Goldin, A.L., 2003, Mechanisms of sodium channel inactivation, *Current opinion in neurobiology*, 13, 284-290.
- Gordon M. Medical review of safety (ranolazine), 2005, Rockville, Md: *US Food and Drug Administration*.
- Gralinski, M.R., Black, S.C., Kilgore, K.S., Chou, A.Y., McCormack, J.G., Lucchesi, B.R., 1994, Cardioprotective effects of ranolazine (RS-43285) in the isolated perfused rabbit heart, *Cardiovascular research*, 28(8):1231-7.
- Grimes, J.A., Fraser, S.P., Stephens, G.J., Downing, J.E., Laniado, M.E., Foster, C.S., Abel, P.D., Djamgoz, M.B., 1995, Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro, *FEBS Letters*, 7;369 (2-3), 290-4.
- Grimes, J.A., Djamgoz, M.B.A., 1998, Electrophysiological characterization of voltage-gated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer, *Journal of cellular physiology*, 175, 50-58.
- Gültekin, M., Boztaş, G., Türkiye Kanser İstatistikleri, Ocak 2014. kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf
- Hacıbekiroğlu, İ., Kodaz, H., Türkmen, E., 2015, İleri evre prostat kanserinde hormon tedavisi, *Türk onkoloji dergisi*, 30:25-33
- Haddad, A.Q., Venkateswaran, V., Viswanathan, L., Teahan, S.J. Fleshner, N.E., Klotz, L.H., 2006, Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines, *Prostate cancer prostatic diseases*, 9, (1), 68-76.
- Hale S.L., Leeka J.A., Kloner R.A., 2006, Improved left ventricular function and reduced necrosis after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits treated with ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel, *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 318 : 418.
- Hammarstrom AK, Gage PW.; 2002, Hypoxia and persistent sodium current, *European biophysics journal*, 31: 323–330.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100(1):57-70.
- Harikumar, K.B., Aggarwal, B.B., 2008, Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases, *Cell cycle*, 15;7(8):1020-35.
- Hernandes, M.S., Troncone, L.R.P., 2009, Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review, *Journal of neural transmission*, 116: 1551-1560.
- Hernandez-Plata, E., Ortiz, C.S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martinez, I., Alfaro, I., Berumen, J., Rivera, M., Gomora, J, C., 2011, Over expression of Nav 1.6

- channels associated with the invasion capacity of human cervical cancer, *International journal of cancer*, Doi: 10.1002/ijc.26210.
- Hille B., 1992, Ionic channels of excitable membranes, *Sunderland (Massachusetts)*: Sinauer Associates Inc.
- Hodgkin AL & Huxley AF (1952a). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*, *The journal of physiology* 116, 473–496.
- Hodgkin AL & Huxley AF (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*, *The journal of physiology* 116, 449–472.
- Hodgkin AL & Huxley AF (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *The journal of physiology* 116, 497–506.
- Hodgkin AL & Huxley AF (1952d). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *The journal of physiology* 117, 500–544.
- House, C.D., Vaske, C.J., Schwartz, A.M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R.L., Hales, T.G., Stuart, J. M., Lee, N.H., 2010, Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion, *Cancer research*, 70(17), 6957–6967.
- Imamoto, T., Suzuki, H., Yano, M., Kawamura, K., et al., 2008, The role of testosterone in the pathogenesis of prostate cancer, *International journal of urology*, 15, 472 – 480.
- Ingolfsson, H.I., Thakur, P., Herold, K.F., Hobart, E.A., Ramsey, N.B., Periole, X., de Jong, D.H., Zwama, M., Yilmaz, D., Hall, K., Maretzky, T., Hemmings, H.C., Blobel, C., Marrink, S.J., Koçer, A., Sack, J.T., Anderson, O.S., 2014, Phytochemicals perturb membranes and promiscuously alter protein function, *ACS Chemical biology*, 9(8): 1788–1798.
- Isaacs, J.T., Heston, W.D., Weissman, R.M., Coffey, D.S., 1978, Animal models of the hormone-sensitive and -insensitive prostatic adenocarcinomas, Dunning R-3327-H, R-3327-HI, and R-3327-AT, *Cancer research*, 38 (11 Pt 2), 4353-9.
- Isaacs, J.T., Yu, G.W., Coffey, D.S., 1981, The characterization of a newly identified, highly metastatic variety of Dunning R 3327 rat prostatic adenocarcinoma system: the MAT LyLu tumor, *Investigative urology*, 19 (1), 20-3.
- Isbilen, B., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A., 2006, Docosahexaenoic acid (omega-3) blocks voltage-gated sodium channel activity and migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38, 2173-2182.
- Ishikawa, T., Takahashi, N., Ohno, S., Sakurada, H., Nakamura, K., On, Y.K., Park, J.E., Makiyama, T., Horie, M., Arimura, T., Makita, N., Kimura, A., 2013, Novel

- SCN3B mutation associated with brugada syndrome affect intracellular trafficking and function of Na_v1.5, *Circulation journal.*, 77: 959-67.
- Isom, L.L., De Jong, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., Catterall, W.A., 1992, Primary structure and functional expression of the bata 1 subunit of the rat brain sodium channel, *Science*, 256: 839-842.
- Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1995, Structure and function of the b2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif, *Cell*, 83: 433-42.
- Jannsson, K.H., Castillo, D.G., Morris, J.W., Boggs, M.E., Czymbek, K.J., Adams, E.L., Schramm, L.P., Sikes, R.A., 2014, Identification of beta-2 as a key cell adhesion molecule in PCa cell neurotropic behavior: a novel ex vivo and biophysical approach, *PLoS One* 9, e98408.
- Jansson, K.H., Lynch, J.E., Lepori-Bui, N., Czymbek, K.J., Duncan, R.L., Sikes, R.A., 2012, Overexpression of the VSSC-associated CAM, β -2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior, *Prostate*, 72:1080- 92.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M.J., 2006, Cancer statics 2006, *CA: Cancer journal for clinicians*, 56:106-30.
- Jerling, M., Abdallah, H., 2005, Effect of renal impairment on multiple-dose pharmacokinetics of extended-release ranolazine. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 78:288 –297.
- Jerling, M.; Huan, B.L.; Leung, K.; Chu, N.; Abdallah, H.; Hussein Z. 2005, Studies to investigate the pharmacokinetic interactions between ranolazine and ketoconazole, diltiazem, or simvastatin during combined administration in healthy subjects. *The journal of clinical pharmacology*, 45, 422-433.
- Jerling, M., 2006, Clinical pharmacokinetics of ranolazine, *Clinical pharmacokinetics*, 45 (5): 469–91.
- Johns, L.E, Houlston, R.S., 2003, A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk, *British journal of urology international*, 91, (9), 789-794.
- Josephson I.R., Sperelakis N., 1989, Tetrodotoxin differentially blocks peak and steady-state sodium channel currents in early embryonic chick ventricular myocytes, *Pflugers Archiv: european journal of physiology*, 414(3):354-9.
- Joshi A.D., Parsons D.W., Velculescu V.E., Riggins G.J., 2011, Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival, *Molecular cancer*, 10:17.
- Ju, Y.K., Saint, D.A., Gage, P.W., 1992, Effects of lignocaine and quinidine on the persistent sodium current in rat ventricular myocytes, 1992, *British journal of pharmacology*, 107(2):311-6.

- Ju, Y.K., Saint, D.A., Gage, P.W., 1996, Hypoxia increases persistent sodium current in rat ventricular myocytes, *The journal of physiology*, 497:337–47.
- Kahlig, K.M., Lepist, I., Leung, K., Rajamani, S., George, A.L., 2010, Ranolazine selectively blocks persistent current evoked by epilepsy-associated Nav1.1 mutations, *British journal of pharmacology*, 161:1414 – 26.
- Kaur, B., Khwaja F. W., Severson, E. A., Matheny, S. L., Brat, D. J., Van Meir, E. G. 2005. Hypoxia and hypoxia –inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology*. 7(2):134-53.
- Khanna, C., Hunter, K., 2005, Modeling metastasis *in vivo*, *Carcinogenesis*, 26, (3), 513-523.
- Khera, S., Kolte, D., Aronow, W.S., 2014, Use of ranolazine in patients with stable angina pectoris, *Cardiology*, 128: 251–258.
- Kim, J.B., 2014, Channelopathies, *Korean journal of pediatrics*, 57 (1), 1-18.
- Knudsen, B.S, Vasioukhin, V., 2010, Mechanisms of prostate cancer initiation and progression. *Advances in cancer research*, 109: 1-50.
- Kok, J.B., Verhaegh, G.W., Roelofs, R.W., Hessels, D., Kiemeny, L.A., Aalders, T.W., Swinkels, D.W., Schalken, L.A., 2002, DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors., *Cancer Research*, 62:2695–2698.
- Koltai, T., 2015, Voltage-gated sodium channel as a target for metastatic risk reduction with re-purposed drugs, *F1000 research*, doi: 10.12688/f1000.
- Kroemer, G., Pouyssegur, J., 2008, Tumor cell metabolism; cancer's Achilles'heel, *Cancer cell*, 13: 472-482.
- Kunzelmann K., 2005, Ion channels and cancer, *The journal of membrane biology*, 205:159–73.
- Kutluk, T., 2014, Kanserle ilgili bilgi ve davranışların araştırılması, *Türk kanser araştırma ve savaş kurumu derneği*, 12-26.
- Laniado, M.E., Lalani, E.N., Fraser, S.P., Grimes. J.A., Bhangal, G., Djamgoz, M.B.A., Abel, P.D., 1997, Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion *in vitro*, *American journal of pathology*., 150(4), 1213-1221.
- Le Guennec, J.Y., Ouadid-Ahidouch, H., Soriani, O., Besson, P., Ahidouch, A., Vandier, C., 2007, Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research, *Recent patents in anticancer drug discovery*, 2:189-202.
- Li, W.Y., Wong, F.L., Tsai, S.N., Phang, T.H., Shao, G., Lam, H.M., 2006, Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells, *Plant, cell & environment*, 29 (6): 1122–37.

- Liu, X., Xie, L., Liang, Y., Lu, T., 2003, Gender difference in ranolazine pharmacokinetics in rats, *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 28(29), 119-123.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Lokeshwar, B.L., Schwartz, G.G., Selzer, M.G., Burnstin, K.L., Zhuang, S., Block, N.L., Binderup, L., 1999, Inhibition of prostate cancer metastasis *in vivo*: A comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D (Calcitriol) and AB1089, *Cancer epidemiology*, 241-248.
- Long, S.B., Campbell, E.B., Mackinnon, R., 2005, "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel, *Science*, 309(5736):897-903.
- Lopez-Abente, G., Mispireta, S., Pollan, M., 2014, Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological features in mortality trends in Spain, *BMC Cancer*, 14:874.
- Lowe, F.J., Frazee, L.A., 2006, Update on prostate cancer chemoprevention, *Pharmacotherapy*, 26, (3), 353-359.
- MacInnes, A., Fairman, D.A., Binding, P., Rhodes, J.A., Wyatt, M.J., Phelan, A., Haddock, P.S., Karran, E.H., 2003, The antianginal agent trimetazidine does not exert its functional benefit via inhibition of mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase, *Circulation research*, 93: e26–e32.
- Madu, C.O., Lu, Y., 2010, Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer, *Journal of cancer*, 1, 150–177.
- Mantegazza M., Curia G., Biagini G., Ragsdale D.S., 2010, Avoli M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders, *Lancet neurology*, 9: 413-424.
- Martin, F., Ufodiana, C., Watt, I., Brackenbury, W.J., 2015, Therapeutic value of voltage-gated sodium channel inhibitors in breast, colorectal and prostate cancer: A systematic review, *Frontiers in pharmacology*, 6(53).
- Matsumura, H., Hara, A., Hashizume, H., Maruyama, K., Abiko, Y., 1998, Protective effects of ranolazine, a novel anti-ischemic drug, on the hydrogen peroxide-induced derangements in isolated, perfused rat heart: comparison with dichloroacetate, *The japanese journal of pharmacology*, 77:31-39.
- McNeal J.E., 1988, Normal histology of the prostate, *The american journal of surgical pathology*, 12(8):619-633
- Minotti, G., 2013, Pharmacology at work for cardio-oncology: Ranolazine to treat early cardiotoxicity induced by antitumor drugs, *Perspectives in pharmacology*, 346:343-349.

- Mohan, K.H., Pai S., Rao, R., et al., 2008, Techniques of immunofluorescence and their significance, *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 74(4):415-9.
- Mycielska, M.E., Fraser, S.P., Szatkowski, M., Djamgoz M.B.A., 2003, Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity, *Journal of cellular physiology*, 195: 461-469.
- Mycielska, M.E., Krasowska, M., Grzywna, Z., Djamgoz, MBA., 2005, Endogenous and exogenous citrate transport and release in prostatic preparations: semi-polarized two-dimensional cultures of human PNT2-C2 cells and isolated tubules and segments of rat prostate, *The prostate*, 65: 88-99.
- Mycielska, M.E., Palmer, C.P., Brackenbury, W.J., Djamgoz, M.B.A., 2005, Expression of Na⁺-dependent citrate transport in a strongly metastatic human prostate cancer PC-3M cell line: regulation by voltage gated Na⁺ channel activity, *Journal of physiology*; 563(2):393-408.
- Nakajima, T., Kubota, N., Tsutsumi, T., Oguri, A., Imuta, H., Jo, T., Oonuma, H., Soma, M., Meguro, K., Takano, H., Nagase, T., Nagata, T., 2009, Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells, *British journal of pharmacology*., 156(3), 420-431.
- Nandana, S., Chung, L.W., 2014, Prostate cancer progression and metastasis: potential regulatory pathways for therapeutic targeting, *American journal of clinical and experimental urology*, 2 (2), 92-101.
- Nelson, M., Millican-Slater, R., Forrest, L.C., Brackenbury, W.J., 2014, The sodium channel $\beta 1$ subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis, *International journal of cancer*, 135(10):2338–2351.
- Nelson, M., Todorovic, S., Perez-Reyes, E., 2006, The Role of T-Type Calcium Channels in Epilepsy and Pain, *Current pharmaceutical design*, 12 (18): 2189–2197.
- Nelson, M., Yang, M., Dowle, A.A., Thomas, J.R., Brackenbury, W.J., 2015, The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis, *Molecular cancer*, 14:13.
- Nelson, M., Yang, M., Millican-Slater, R., Brackenbury, W.J., 2015, Na_v1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination *in vivo*, *Oncotarget*, 20;6(32):32914-29.
- Nguyen, D.H., Zhou, T., Shu, Jessica, Mao, Jian-Hua, 2013, Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity, *Cancer InCytes*, 2(1):e.
- Nilius, B., Benndorf, K., Markwardt, F., 1987, Effects of lidocaine on single cardiac sodium channels, *Journal of molecular and cell cardiology*, 19(9):865-74.

- Nilius, B., Droogmans, G., 2001, Ion channels and their functional role in vascular endothelium, *Physiological reviews*, 81(4), 1415-1459.
- Ogata, N., Ohishi, Y., 2002, Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels, *Japanese journal of pharmacology*. 88(4):365-77.
- Olive F., 2009, Metabotropic glutamate receptor ligands as potential theurapeutics for addiction, *Current drug abuse review*, 2(1): 83-989.
- Onganer, P.U., Djamgoz, M.B.A., 2005, Small-cell lung cancer (human): Potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na⁺ channel expression *in vitro*, *Journal of membrane biology*, 204, 67-75.
- Onkal, R., Djamgoz, M.B.A., 2009, Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer, *European journal of pharmacology.*, 25;625(1-3), 206-219.
- Ou, S. W., Kameyama, A., Hao, L. Y., Horiuchi, M., Minobe, E., Wang, W.Y., Makita, N. And Kameyama, M., 2005, Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variant of Nav1.5/SCN5A, *The european journal of neurosciences*, 22, 793-801.
- Palmer, C. P., Mycielska, M. E., Burcu, H., Osman, K., Collins, T., Beckerman, R., Perrett, R., Johnson, H., Aydar, E., Djamgoz, M.B.A., 2008, Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression, *European biophysics journal*, 37: 359–368.
- Paoletti, P., Neyton, J., 2007, NMDA receptor subunits: function and pharmacology, *Current opinion pharmacology*, 7(1):39–47.
- Patel, A. R, Klein E. A., 2009, Risk factors for prostate cancer, *Nature clinical practice urology*, 6(2):87-95.
- Patel, F., Brackenbury, W., 2015, Dual roles of votage-gated sodium channels in development and cancer, *International journal of developmental biology*, 59: 357 – 366.
- Peters, C.H., Sokolov S., Rajamani S., Ruben P.C., 2013, Effects of the antianginal drug, ranolazine, on the brain sodium channel NaV 1.2 and its modulation by extracellular protons, *British journal of pharmacology*.
- Pham, D.Q., Mehta, M., 2007, Ranolazine: a novel agent that improves dysfunctional sodium channels, *International journal of clinical practice*, 61:864–872.
- Platz, E. A., Giovannucci, E., 2004, The epidemiology of sex steroid hormones and their signaling and metabolic pathways in the etiology of prostate cancer, *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 92, 237 – 253.
- Pollard, M., 1980, Animal models for prostate cancer, *Prostate.*, 1(2), 207-13.

- Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., 2004, *Cell biology*, 1sted., Saunders, USA, 0-7216-33609.
- Poste, G., Fidler, I.J., 1980, The pathogenesis of cancer metastasis, *Nature*, 283: 139-146.
- Prasad, S., Phromnoi, K., Yadav, V.R., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010, Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer, *Planta medica*, 76(11):1044-63.
- Prensner, J.R., Rubin, M.A., Wei, J.T., Chinnaiyan, A.M., 2012, Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers, *Science translational medicine*, 4 (127), 127rv3.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Bidaux, G., Flourakis, M., Shuba, Y., 2007, Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells, *Cell death and differentiation*, 14 (7), 1295-304.
- Purves, D., George, J., Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, Leonard E. White., 2008, *Neuroscience*. 4th ed. Sinauer Associates, 156–7.
- Qian J., Woilan P., Bostwick D.G., 1997, The extent and multicentricity of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma, *Human pathology*, 28:143.
- Rajamani, S., Shryock, J.C., Belardinelli, L., 2008, Block of tetrodotoxin-sensitive, Nav 1.7, and tetrodotoxin-resistant, Nav 1.8, Na⁺ Nav channels by ranolazine. *Channels*, 2: 449-60.
- Roger, S., Besson, P., Guennec, J., 2003, Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line, *Biochimica et biophysica acta*, 1616, 107-111.
- Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P., Iochman, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y., Le Guennec, J.Y., 2007, Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines, *International journal of biochemistry & cell biology*, 39, 774-786.
- Royai, R., Lange, P.H., Vessella, R., 1996, Preclinical models of prostate cancer, *Seminars in oncology*, 6, 35-40.
- Saint, D.A., Ju, Y.K., Gage, P.W., 1992, A sodium current in rat ventricular myocytes, *The journal of physiology*, 453:219-31.
- Sakata, Y., Kodama, K., Ishikura, F., Komamura, K., Hasegawa, S., Hirayama, A., 1997, Disappearance of the 'noreflow' phenomenon after adjunctive intracoronary administration of nicorandil in a patient with acute myocardial infarction, *Japanese circulation journal*, 61 : 455.
- Savarese, G., Rosano, G., D'Amore, C., Musella, F., Della Ratta, G.L., Pellegrino, A.M., Formisano, T., Vitagliano, A., Cice, G., Fimiani, L., del Guercio, L.,

- Trimarco, B., Perrone-Filardi, P., 2013, Effects of ranolazine in symptomatic patients with stable coronary artery disease. A systematic review and meta-analysis, *International journal of cardiology*, 169:262-270.
- Schonherr, R., 2005, Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer, *The journal of membrane biology*, 205:175-184.
- Schrey, M., Codina, C., Kraft, R., Beetz, C., Kalff, R., Wölfl, S., 2002, Molecular characterization of voltagegated sodium channels in human gliomas, *Neuroreport*, 13:2493-8.
- Schulz, D.J., Temporal, S., Barry, D.M., Garcia, M.L., 2008, Mechanisims of voltage-gated ion channel regulation: from gene expression to localization, *Cell an molecular life sciences*, 65,2215-2231.
- Scirica, B.M., Morrow, D.A., Hod, H., Murphy, S.A., Belardinelli, L., Hedgepeth, C.M., Molhoek, P., Verheugt, F.W., Gersh, B.J., McCabe, C.H., 2007, Effect of ranolazine, an antianginal agent with novel electrophysiological properties, on the incidence of arrhythmias in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome: results from the Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Thrombolysis in Myocardial Infarction 36 (MERLIN-TIMI 36) randomized controlled trial, *Circulation*, 116:1647–1652.
- Shan, B., Dong, Mei, Tang, H., Wang, N., Zhang, J., Yan, C., Jiao, X., Zhang, H., Wang, C., 2014, Voltage-gated sodium channels were differentially expressed in human normal prostate, bening prostatic hyperplas,a and prostate cancer cells, *Oncology letters*, 8:345-350.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., 2012, Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(1):10–29.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., 2013, Cancer statistics 2013, *CA: a Cancer journal for clinicians*, 63(1):11-30.
- Sikes, R.A., Walls, A.M., Brennen, W.N., Anderson, J.D., Choudhury-Mukherjee, I.,Schenck, H.A., Brown, M.L., 2003, Therapeutic approaches targeting prostate cancer progression using novel voltage-gated ion channel blockers, *Clinical prostate cancer*, 2(3): 181–187.
- Smith, P., Rhodes, N. P., Shortland, A. P., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B., Ke, Y., Foster, CS., 1998, Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS letters*,. 13;423(1):19-24.
- Song, Y., Shryock, JC., Wu, L., Belardinelli, L., 2004, Antagonism by Ranolazine of the pro-arrythmic effects of increasing late INa in guinea pig ventricular myocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 44:192–9.
- Sonn, G.A., Aronson, W., Litwin, M.S., 2005, Impact o26:603-614.f diet on prostate cancer: a review, *Prostate cancer prostatic diseases*, 8, (4), 304-310.

- Sossalla, S., Wagner, S., Rasenack, E.C., Ruff, H., Weber, S.L., Schöndube, F.A., Tirilomis, T., Tenderich, G., Hasenfuss, G., Belardinelli, L., Maier, L.S., 2008, Ranolazine improves diastolic dysfunction in isolated myocardium from failing human hearts-role of late sodium current and intracellular ion accumulation, *The journal molecular and cellular cardiology*, 45(1):32-43.
- Speyer, C.L., Smith, J.S., Banda, M., DeVries, J.A., Mekani, T., Gorski, D.H., 2012, Metabotropic glutamate receptor-1: a potential therapeutic target for the treatment of breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 132:565–73.
- Stacewicz-sapuntzakis, M., Borthakur, G., Burns, J. L., Bowen, P. E., 2008, Correlations of dietary patterns with prostate health, *Molecular nutrition & food research*, 52, 624.
- Steinlein O.K., Noebels J.L., 2000, Ion channels and epilepsy in man and Mouse, *Current opinion in genetics and development*, 10: 286, 291.
- Stone, P.H., Gratsiansky, N.A., Blokhin, A., Huang, I.Z., Meng, L., 2006, "Antianginal efficacy of ranolazine when added to treatment with amlodipine: the ERICA (Efficacy of Ranolazine in Chronic Angina) trial", *Journal of american college of cardiology*, 48 (3): 566–75.
- Stone, P.H., 2008, Ranolazine: new paradigm for management of myocardial ischemia, myocardial dysfunction, and arrhythmias, *Cardiology clinics*, 26(4):603-14.
- Suckow, M.A., Gutierrez, L.S., Risatti, C.A., Wolter, W.R., Taylor, R.E., Pollard, M., Navari, R.M., Castellino, F.J., Paoni, N.F., 2004, The anti-ischemia agent ranolazine promotes the development of intestinal tumors in APC (min/+) mice, *Cancer letters*, 209:165–9.
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R.S., Pienta, K.J., Wang, J., 2010, CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression, *Cancer metastasis reviews*, 29 (4), 709–722.
- Suzuki, M., Morita, T., Iwamoto, T., 2006, Diversity of Cl⁻ Channels. *Cellular and molecular life sciences*, 63 (1): 12–24.
- Taketo, M., Yoshioka, T., 2000, Developmental change of GABA(A) receptor-mediated current in rat hippocampus. *Neuroscience* 96 (3): 507–14.
- Tapon, N., Ziebold, U., 2008, Invasion and metastasis: stem cells, screens and survival, *EMBO Reports*, 9, (11), 1078-1083.
- Tennant, T.R., Kim, H., Sokoloff, M., Rinker-Schaeffer, C.W., 2000, The Dunning model, *Prostate*, 43 (4), 295-302.
- Terlau, H., Stuhmer, W., 1998, Structure and function of voltage-gated ion channels, *Naturwissenschaften*, 85, 437-444.
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri Yıllığı, 2013.

- Uğur, Ö., 2014, Kanser hastasının semptom yönetimi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 29;3,125-135.
- Urrego, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stühmer, W., Pardo, L.A., 2014, Potassium channels in cell cycle and cell proliferation, *Philosophical transaction of the royal society of london B; biological science*, 369.
- Uysal-Onganer, P., Djamgoz, M.B., 2007, Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel. *Molecular cancer.*, 6:76.
- Walker A.J., Card T., Bates T.E., Muir K., 2011, Tricyclic antidepressants and the incidence of certain cancers: a study using the GPRD, *British journal of cancer*, 104:193–7.
- Wang, M.C., Valenzuela, L.A., 1979, Murphy GP. Purification of a human prostate specific antigen, *Investigative urology*, 17:159-163.
- Wang, T., Huang, W., Chen, F., 2008, Baclofen, a GABAB receptor agonist, inhibits human hepatocellular carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo*, *Life sciences.*, 82(9-10):536-41.
- Wannous, R., Bon, E., Gillet, L., Chamouton, J., Weber, G., Brisson, L., Gore, J., Bougnoux, P., Besson, P., Roger, S., Chevalier, S., 2015, Suppression of PPAR β and DHA treatment, inhibit Na v 1.5 and NHE-1 pro-invasive activities, *Pflugers archive*, 467(6):1249-59.
- Weinstein, M.H., Epstein, J.I., 1993, Significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy, *Human pathology*: 24(6), 624-629
- Wenger, A.S., Mickey, D.D., Hall, M., Silverman, L.M., Mickey, G.H., Fried, F.A., 1984, In vitro characterization of MAT LyLu: a Dunning rat prostate adenocarcinoma tumor subline, *Journal of urology*, 131 (6), 1232-6.
- Whittemore, A.S., Kolonel, L.N., Wu, A.H., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., Burch, J.D., Hankin, J., Dreon, D.M., West, D.W., 1995, Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada, *Journal of the national cancer institute*, 87(9):652–61.
- Wolff, A.A., Rotmensch, H.H., Stanley, W.C., Ferrari, R., 2002, Metabolic approaches to the treatment of ischemic heart disease: the clinicians' perspective, *Heart failure reviews*, 7: 187–203.
- Yamakage, M., Namiki, A., 2002, "Calcium channels — basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels — a review", *Canadian journal of anaesthesia*, 49(2): 151–64.
- Yang, M., Kozminski, D.J., Wold, L.A., Modak, R., Calhoun, J.D., Isom, L.L., Brackenbury, W.J., 2012, Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 134:603–15.

- Yıldırım, S., Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Altun, S., Patel, A.: Djamgoz, M.B.A., 2009, Pathobiology of prostate cancer: Voltage-gated sodium channel expression and metastatic potential, *Journal of biology(IUFS)*, 68(1):1-17.
- Yıldırım, S., Altun, S., Gümüşhan, H., Patel, A., Djamgoz, M.B.A.,2012, Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis *in vivo*, *Cancer letters*, 323: 58-61.
- Yip, D., Le, M.N., Chan, J.L., Lee, J.H., Mehnert, J.A., Yudd, A., Kempf, J., Shih, W.J., Chen,S., Goydos, J.S., 2009, A phase 0 trial of riluzole in patients with resectable stage III and IV melanoma, *Clinical cancer research*, 15:3896–902.
- Young, R.H., Srigley, J.R., Amin, M.B., Ulbright, T.M., Cubilla, A.L., 2000, Tumors of theprostate gland, seminal vesicles, male urethra and penis, *Armed forces institute of pathology*, Washington, D.C, 1-344.
- Yu, F.H., Catterall, W.A., 2004, The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis, *Sci STKE*, re15.
- Yu, F.H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G.A., Catterall, W.A., 2005, Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily, *Pharmacological reviews*, 57, 387-395.
- Zacharowski, K., Blackburn, B., Thiernemann, C., 2001, Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, reduces myocardial infarct size and cardiac troponin T release in the rat., *European journal of pharmacology*, 418: 105–110.
- Zar, J.H., 1999, *Bioistatistical Analysis*, 4th ed., Prentice Hall International Inc., New Jersey.
- Zhang, F., Xu, X., Li, T., Liu, Z., 2013, Shellfish toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Marine drugs.*, 28;11(12):4698-723.
- Zorlu F., Eser S.Y., Fidaner C., 2004, İzmir ilinde ürogenital kanserlerin insidans hızları, *Üroonkoloji Bülteni*, (1):2-9.
- Zuchi, C., Tritto, I., Ambrosio, G., 2013, Angina pectoris in women: focus on microvascular disease, *International journal of cardiology*, 163:132-140.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Selma KÜÇÜK
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	20.10.1987, Amasya
Telefon	+90 (532) 206 4126
E-mail	selmaakucuk@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji/Genel Biyoloji	2016
Lisans	T.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Edremit Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2006

Makaleler / Bildiriler

"In vivo sıçan prostat kanseri hücreleri ve voltaj kapılı kanal ekspresyonu: Metastatik potansiyelin değerlendirilmesinde yeni stratejiler ve moleküler yaklaşımlar"
Tübitak Projesi, Bursiyer