

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
Prof. Dr. Fehmi AKÇİÇEK

**PROSTAT KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
ZOLEDRONİK ASİT UYGULAMASININ SİTOTOKSİK VE
ANTI-ANJİOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Cenk GÖKALP

**TEZ DANIŞMANI:
Prof. Dr. F. Rüçhan USLU**

İzmir - 2011

ÖNSÖZ

İç Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim boyunca bana tüm çalışmalarında her zaman maddi ve manevi destek olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Fehmi Akçiçek'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İç Hastalıkları ihtisasım süresince klinik çalışmalarda ve özellikle laboratuvar araştırmalarında hem teknik hem teorik bilgi yönünden eğitimime sağladığı büyük katkı ve bu tezin hazırlanmasındaki yol göstericiliğinden dolayı tez hocam sayın Prof. Dr. F.Rüçhan Uslu'ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimin her döneminde verdiği destek ve eğitimime katkısı nedeniyle sayın Uzm. Dr. Ş.Burçak Karaca'ya teşekkür ederim.

Amerikan Kanser Cemiyeti tarafından 2007 yılında hazırlanan raporda tüm dünyada yaklaşık 12 milyondan fazla yeni kanser vakası olacağı, bunların 5,4 milyonunun ekonomik açıdan gelişmiş ülkelerde ve geri kalan 6,7 milyonun ise ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde görüleceği tahmin edilmektedir (1). Yine aynı raporda 2007 yılı içinde global total kanser ölümlerinin 7,6 milyon kişi olacağı, bu rakamın 2050 yılında 17,5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de 2001 yılı kanser isidansı 60,5/100,000'dir (2).

Günümüzde prostat kanseri batı ülkeleri ve Türkiye'de erkekler arasında en sık görülen kanser türleri arasındadır. Tedavide sağlanan pek çok ilerlemeye rağmen hala yüksek bir ölüm oranıyla seyretmektedir. İleri evre prostat kanseri vakalarında hastanın hayat kalitesini bozan çok önemli semptomlar bulunur. Bu nedenlerle prostat kanseriyle ilgili olarak yapılacak temel çalışmalar kliniğe uygulanabilir yeni yöntemlerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma tümüyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın prostat kanserli hastaların tedavisine katkıda bulunmasını diliyoruz.

İÇİNDEKİLER:

Giriş ve Amaç.....	1
Genel Bilgiler	2
Materyal ve Metod	16
Sonuçlar.....	23
Tartışma.....	33
Kaynaklar	42

I- GİRİŞ VE AMAÇ:

Gelişmiş ülkelerde, prostat kanseri, erkeklerde ikinci en sık tanı konan kanser türü olup kanserden ölüm sebeplerinde üçüncü sırada yer almaktadır. Yaş ve etnik köken gibi faktörler bir yana, pozitif aile öyküsü bilinen muhtemel en güçlü risk faktörüdür. Klinik olarak prostat kanseri, lokal veya ileri evre prostat kanseri olarak karşımıza çıkmakta ve tedavi seçenekleri medikal takipten androjen-ablasyon tedavisine kadar değişebilmektedir. Erken evre prostat kanseri için sağkalım oranı yüksek olmakla birlikte nükseden tümörler için yeterli bir kurtarma tedavisi bulunmamaktadır. Androjen-ablasyon tedavisi ilerlemiş prostat kanseri hastalarının yaklaşık %70-80'inde semptomlarda azalma sağlamakta, fakat tümörlerin çoğu takipteki 2 yıl içerisinde androjen bağımsız duruma gelmektedir. Hormon refrakter hastalarda ortalama sağkalım 12 ile 18 ay arasında değişmektedir ve bu dönemde en etkili kemoterapötik ajan dosetakseldir.

Özellikle kemik metastazları varlığında hastalık sıklıkla iskelet sistemiyle ilgili morbiditeyle seyreder. Bugün genellikle kemik metastazlarının palyasyonu için osteoklastları inhibe edici etkileri nedeniyle bifosfonatlar tercih edilmektedirler.

Bir bifosfonat olan zoledronik asit kemiğe metastaz yapmış prostat kanserli olgularda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte kemik metastazıyla sınırlı bir kullanım alanı bulunan zoledronik asitle ilgili yapılan çalışmalar bu hastalığın tedavisine yönelik daha geniş bir kullanım alanı ve fayda vaat etmektedir.

Bu çalışmada zoledronik asitin, hormon-refrakter prostat kanseri hücre hatlarında (PC-3 ve DU-145) anti-tümöral ve anjiogenik sitokin ekspresyonu üzerinde etkisinin bulunup bulunmadığının gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

II- GENEL BİLGİLER:

PROSTAT KANSERİ

Epidemiyoloji

Prostat kanseri, batı ülkelerinde erkekler arasında en sık görülen nonkütanöz kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. A.B.D.'de 2010 yılında 217.730 kişinin prostat kanseri tanısı alacağı ve bunun da erkeklerdeki kanser vakalarının % 25'ini oluşturacağı, yine 2010 yılı için ölen vaka sayısının 32.050 kişi olacağı öngörülmektedir (3). Yaşam boyu prostat kanseri tanısı alma riski 1/6; prostat kanserinden ölüm riski ise 1/30'dur (4). Prostat kanserine yakalanma riski yaşla birlikte artar. Ortalama tanı konma yaşı 72'dir. Siyah erkeklerde ortalama tanı yaşı beyazlara göre daha düşüktür. İnsidans ve mortalite ise siyahlarda beyaz erkeklere göre daha yüksektir. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi'nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre erkeklerde en sık görülen kanser türleri arasında prostat kanseri yüzde 5,5 ile 6. sırada bulunmaktadır.

Etiyoloji ve risk faktörleri

Prostat kanserinin sebebi tam olarak bilinmemektedir. Bazı faktörler risk artışından sorumlu tutulmaktadır.

- 1- Yaş: Prostat kanseri gelişimi için en güçlü risk faktörü yaştır. Prostat kanseri 40 yaş öncesi çok nadirdir, fakat 50 yaş sonrasında prostat kanseri olma şansı hızla artmaktadır. 65 yaş üstü her 3 erkekten 2'sinde prostat kanseri gelişmektedir.
- 2- Irk: Prostat kanseri, diğer ırklar ile karşılaştırıldığında Afro-Amerikan'larda daha sık görülmektedir. Afro-Amerikan'larda ileri evre prostat kanseri daha sık tanı

almakta ve beyazlara göre ölüm oranları 2 kat fazla olmaktadır. Etnik kökenin nasıl fark yarattığı bilinmemektedir.

- 3- Aile Öyküsü: Babasında veya erkek kardeşinde prostat kanseri tanısı bulunan bir erkek, prostat kanseri gelişimi için 2 kattan fazla risk taşımaktadır. Kanserli akraba sayısı arttıkça risk daha da artmaktadır.
- 4- Genler: Prostat kanseri ile ilişkili bulunan ilk gen lokusu *Hereditary Prostate Cancer Locus-1 (HPC1)*'dir. HPC1'e ek olarak altı genetik lokus daha tanımlanmıştır (5). RNASEL, MSR1, ELAC2, AR, CYP17 ve SRD5A2 prostat kanseri gelişimi ile ilişkili kalıtsal genlerdir. Prostat kanseri gelişiminde rol oynayan somatik gen değişiklikleri ise GSTP1, NKX3.1, PTEN, CDKN18 ve AR genlerinde olabilmektedir. Tam olarak anlaşılmasına rağmen TMPRSS2-ERG füzyonunun sıklığı da dikkat çekmektedir (6).
- 5- Diyet: Prostat kanseri ile diyetin ilişkisi net değildir fakat yüksek-kalorili ve yağ tüketimi fazla olan bireylerde prostat kanseri daha fazla görülmektedir. Yapılan bir meta-analizde, domates tüketimi ile prostat kanseri riski arasında negatif bir korrelasyon izlenmiştir (7). Bunun dışında selenyum, E ve D vitaminlerinin tüketilmesi de prostat kanseri risk azalması ile ilişkili bulunmuştur (6).
- 6- Egzersiz: Yapılan çoğu çalışmada egzersizin prostat kanseri gelişimini azalttığı gösterilememiştir. Buna karşın bazı çalışmalarda, egzersiz yapan ileri yaş erkeklerde ileri evre prostat kanseri gelişiminin daha az olduğu gözlenmiştir (8).

Patoloji

Prostat kanserlerinin %95'i adenokarsinomdur. Diğer nadir görülen histolojiler arasında sarkom, lenfoma, küçük hücreli karsinom ve transizyonel hücreli karsinom sayılabilir. Prostat kanseri multifokal olma eğilimindedir ve genellikle periferik bölgeden gelişir (cerrahi kapsül). Prostat adenokarsinomunun biyolojisi tümörün histolojik derecesinden (grade) önemli ölçüde etkilenir. Düşük dereceli tümörler uzun süre yayılım göstermeden kalabilmektedir. Nodal tutulum olduğunda uzak metastaz hemen hemen her zaman mevcuttur. Prostat kanseri en fazla kemiğe metastaz yapar ve çoğu zaman osteoblastik lezyonlar olarak gerçekleşir. Uzak parankimal organ metastazı ise nadiren görülür.

Gleason skoru biyopsi ile alınan dokunun histolojik yapısının incelenmesiyle primer ve sekonder olarak belirlenir. Primer puan dominant histolojik yapıyı; sekonder puan nondominant doku miktarını ya da fokal yüksek dereceli bir alanı derecelendirir. Primer ve sekonder puanlar 1'den (iyi diferansiye) 5'e (kötü diferansiye) kadar değişir. İki değer toplamıyla 2 ile 10 arasında Gleason skoru elde edilir ve bu skorun prognostik bir önemi vardır (Tablo 1) (9).

Tablo 1. Metastatik hastalık riski

<u>Gleason skoru</u>	<u>Metastatik hastalık geliştirme riski (%)</u>
2-4	20
5-7	40
8-10	75

Semptom ve Bulgular

Lokalize hastalığı olan erkekler asemptomatik olabilir veya benign prostat hipertrofisi benzeri alt üriner sistem semptomlarıyla seyredebilir. Bölgesel hastalığı olanlarda hematüri sık

görülür. Metastatik hastalık varlığında ise kemik ağrısı, alt ekstremitede ödem, patolojik kırık, anemi, kilo kaybı ve nadiren spinal kord basısı bulguları izlenebilir.

Tanı

Tanı genellikle anormal PSA düzeyi ve/veya dijital rektal muayeneyi takiben transrektal ultrason eşliğinde yapılan kor biyopsi ile konmaktadır.

Tarihsel olarak 4 ng/mL üzerinde bir PSA değeri biyopsi endikasyonu olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte daha düşük PSA değerlerinde de kanser görülebildiğine dair veriler mevcuttur. Biyopsi ile tanı konmuş prostat kanserli vakaların % 25'inde PSA değeri 4 ng/mL'nin altında bulunmuştur. PSA, prostat ile ilgili hastalıklara spesifik belirteç olarak kullanılan bir serin proteazdır. Serbest PSA; PSA'nın plazma antiproteazları olan α 1-antikimotripsin ve α 2-makroglobulin'e bağlı olmayan fraksiyonunu oluşturur. Serbest PSA'nın total PSA'ya oranındaki bir düşme prostat kanseri bulunma ihtimalinin arttığını göstermektedir. Transrektal ultrason (TRUS) ve prostatik biyopsilerle birlikte ele alındığında PSA değerleri 4-10 ng/mL arasında olan vakaların % 20'sinde; 10 ng/mL'nin üzerinde olanların ise % 60'ında prostat kanseri saptanmaktadır.

Günümüzde prostat kanserinin kesin tanısı prostattan alınan histopatolojik veya sitolojik örneklerin incelenmesi ile konmaktadır. Yeterli doku örneğinin alınması en iyi TRUS eşliğinde yapılacak kor biyopsi ile olmaktadır. Alınması gereken örnek sayısı ile ilgili evrensel bir rakam bulunmamaktadır fakat 50 mL hacmindeki bir prostattan alınacak 10 örnek ve daha büyük bir prostattan alınacak 12-14 örnek anlamlı olacaktır (10). Transrektal biyopsinin en ciddi komplikasyonu % 0,5-1 vakada izlenebilen idrar yolu enfeksiyonu ve sepsistir. Bu nedenle antibiyotik profilaksisi önerilmektedir.

Bunların dışında tanıya yönelik olarak hemogram, böbrek ve karaciğer fonksiyon testleri, alkalen fosfataz ve göğüs grafileri yapılması gerekli diğer testlerdir.

Evreleme

Prostat Kanseri için TNM Evreleme Sistemi sıklıkla kullanılmaktadır (2002 American Joint Committee on Cancer-AJCC).

Primer Tümör(T)

Tx: Tümör varlığı değerlendirilememiştir

T0: Tümör yok

T1: Klinik olarak elle veya görüntüleme ile tespit edilemeyen tümör

T1a: Diğer bir nedenle yapılan prostat ameliyatı sırasında bulunmuş ve örneklerin %5'inden azında saptanmış tümör

T1b: Diğer bir nedenle yapılan prostat ameliyatı sırasında bulunmuş ve örneklerin %5'inden fazlasında saptanmış tümör

T1c: Yüksek PSA nedeniyle yapılan prostat biopsisinde tespit edilmiş tümör

T2: Tümör prostat içinde sınırlı

T2a: Bir lobun yarısından azında tümör var

T2b: Bir lobun yarısından fazlasında tümör var

T2c: Her iki lobda da tümör var

T3: Tümör prostat kapsülünü aşmış

T3a: Ekstra kapsüler yayılım (unilateral veya bilateral)

T3b: Seminal vesikülleri tutmuş

T4: Tümör yapışık veya seminal vesiküllerin dışındaki komşu organları da tutmuş: mesane boynu, eksternal sfinkter, rektum, levator kasları ve/veya pelvik duvar tutulumu

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Nx: Bölgesel lenf bezi örnekleme yapılmamış

N0: Bölgesel lenf bezi metastazı yok

N1: Bölgesel lenf nodlarına metastaz

Uzak Metastaz (M)

Mx: Uzak organ yayılımı değerlendirilememiş

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak organ metastazı var

M1a: Bölge dışı lenf nodları tutulumu

M1b: Kemik tutulumu

M1c: Kemik dışında diğer organların tutulumu

Histolojik derecelendirme (Grade)

Gx: Histolojik grade değerlendirilemiyor

G1: İyi diferansiye (slight anaplasia) (Gleason 2-4)

G2: Orta derece diferansiye (moderate anaplasia) (Gleason 5-6)

G3-4: Kötü diferansiye veya andiferansiye (Gleason 7-10)

Evre 1: T1a N0 M0 G1

Evre 2: T1a N0 M0 G2, 3-4

T1b N0 M0 Herhangi G

T1c N0 M0 Herhangi G

T1 N0 M0 Herhangi G

T2 N0 M0 Herhangi G

Evre 3: T3 N0 M0 Herhangi G

Evre 4: T4 N0 M0 Herhangi G

Herhangi T N1 M0 Herhangi G

Herhangi T Herhangi N M1 Herhangi G

Tedavi

I.Lokal Prostat Kanseri (T1, 2)

Hastanın yaşı ve genel sağlık durumu da rol oynamakla birlikte, tedavi asıl hastalığın evresine göre yapılmaktadır. Lokal prostat kanseri için üç ana tedavi seçeneği bulunmaktadır: medikal izlem, radyoterapi ve radikal prostatektomi (11).

Medikal İzlem:

Bu yaklaşımda hasta belirli aralıklarla takip edilerek PSA yüksekliği veya rektal muayene bulgularındaki değişikliğe göre tedavi kararı alınır. Semptom gelişimi daha ileri lokal hastalığı gösterebildiğinden, tedaviye başlanması için semptomların gelişimi beklenmez. Konservatif takibin avantajı aktif tedavinin istenmeyen etkilerinden hastayı korumaktır. Çünkü çoğu hasta klinik olarak asemptomatik seyredilmekte ve kanser dışı sebepler ile ölmektedir. Konservatif tedavi, yaşam beklentisi 10 yıldan az olan orta-iyi diferansiye kanserli hastalarda önerilmektedir.

Radyoterapi:

Lokal prostat kanseri tedavisinde etkin bir yöntemdir. Prostat bezi ve komşuluğundaki dokulara 60-70 Gy dozlarında (bazı serilerde daha yüksek dozlarda) uygulanır. Radyoterapi için ideal hasta; tedavi öncesi kan PSA değeri 20 ng/mL'nin altında olan, düşük evrede ve iyi farklılaşmış tümörü olan, tedavi sonrasında PSA değerinin 1 ng/mL'nin altına düşen hasta grubudur.

Radikal Prostatektomi:

Cerrahi tekniğindeki ilerlemeler ve prostat anatomisinin tanınması radikal prostatektomiye güvenli ve etkili kılmaktadır. 955 hastalık bir seride hastaların %85'inde 10 yıllık tümörsüz sağkalım gözlenmiştir.

II. Lokal İleri Prostat Kanseri (T3)

Kapsül aşımı olan hastalarda radyoterapi, uzun zamandır standart seçenek olarak uygulanmaktadır. Lokal ileri hastalarda radyoterapinin etkinliğinin artırılması için iki yol mevcuttur. Birincisi, 70 Gy'den daha yüksek dozda radyoterapi uygulanmasıdır. İkinci seçenek ise neoadjuvan (6 ay süre ile) veya adjuvan (3 yıla kadar) hormon tedavisi uygulanmasıdır.

III. Metastatik Prostat Kanseri

Metastatik prostat kanseri olgularında ana tedavi seçeneği hormonal tedavidir. Bilateral orşiektomi, testosteron azaltımı için standart tedaviyi oluşturmaktadır. Metastatik ağrının hızlı bir şekilde geçmesini sağlamak ve hormonal tedavi ile ilgili komplians problemlerini ortadan kaldırmaktadır.

LHRH analogları (leuprolide, goserelin ve buserelin), kimyasal kastrasyonda sık kullanılmaktadırlar ve bilateral orşiektomi ile benzer etkinliğe sahiptirler. Tedavi başlarında

testosteron artışına yol açtıklarından spinal kord basısı veya patolojik kırığı olan hastalarda ilk 2 hafta anti-androjen tedavi ile birlikte kullanılmaları önerilmektedir.

Testiküler ve adrenal androjen aktivitesini bloke etmek için medikal veya cerrahi kastrasyon tedavisi ile kombine anti-androjen tedavi (flutamide, nilutamide, bicalutamide, siproteron asetat) uygulanabilmektedir.

IV. Hormon-refrakter Prostat Kanseri

Metastatik androjen-bağımsız prostat kanseri hastalığın son evresidir. Uzun yıllar sitotoksik kemoterapi etkisiz olarak kabul edilmiştir fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda dozetaksel (yalnız veya estramustin ile kombine) kullanımının mitoxantron ve steroid kullanımı ile karşılaştırıldığında sağkalımda önemli fayda sağladığı gözlenmiştir (12). Dahası, anjiogenez ve sinyal ileti inhibitörleri gibi biyolojik aktif ilaçlar ile çalışmalar devam etmektedir.

ANJIOGENEZ

Anjiogenez, mevcut damarlanmadan yeni dallanan damarların gelişmesidir. Tümör gelişimi ve metastazı için gerekli olan anjiogenez; fetal gelişim, yara iyileşmesi ve menstrual siklus ile ilişkili endometrial hiperplazi gibi normal fizyolojik durumlarda da rol oynamakta, endotel hücre migrasyonu ve proliferasyonunu gerektiren damarsal filizlenme gibi birkaç mekanizma ile gerçekleşmektedir (13). Anjiogenik damarlar ile olgun damarlar arasında, anjiogenez ile oluşan damarların yapısal olarak daha düzensiz olmaları ve bu damarlardaki kan akımının da düzensiz olması gibi farklar bulunmaktadır.

Tümör anjiogenezi genellikle tümörün büyümesine yetişememekte ve bu sebeple tümöral dokuda hipoksik alanlar oluşmaktadır. Doku oksijen basıncının düşmesi birçok transkripsiyon faktörünün üretimi aracılığı ile anjiogenezi uyarmaktadır (14). Bunların en önemlileri HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*) ve HIF-2'dir. HIF'in alfa ve beta olmak üzere iki alt ünitesi vardır. Doku oksijen seviyesinin hücresel ihtiyacı karşılayabildiği durumda HIF-alfa, oksijen-bağımlı prolil hidroksilaza maruz kalmakta ve sonrasında von Hippel-Lindau proteini ve E3 ubiquitin ligaz ile etkileşime girerek 26S proteosome tarafından parçalanmaktadır. Doku hipoksisi durumunda ise prolil hidroksilasyonu ve bunu takip eden HIF-alfa yıkımı olmamakta, mevcut olan HIF-alfa çekirdekte HIF-beta'ya bağlanarak belirli

gen ekspresyonuna sebep olmaktadır. VEGF, VEGFR1, ANGPT2, Glucose Transporter 1, IGF2 ve Karbonik Anhidraz 9'u kodlayan genler, bu genlerden bazılarıdır (13).

Anjiogenik Faktörler

VEGF

VEGF ailesi; VEGF-A, -B, -C, -D, -E ve PlGF (*Placenta Growth Factor*)'den oluşmaktadır (15). Bunlar arasında en çok çalışılan olan VEGF-A, hem normal hem de tümör ilişkili anjiogeneze rol oynamaktadır. VEGF-A biyolojik etkisini, vasküler endotel hücre yüzey reseptörleri olan VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1) ve lenfatik sistemde bulunan VEGFR-3 ile etkileşim yoluyla göstermektedir. VEGFR-1'in anjiogenezi negatif yönde etkilediğini gösteren çalışmalar olmakla birlikte damarsal filizlenme ve metastazda rol oynadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (16). VEGFR-2 ise endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve endotel progenitor hücre uyarımını sağlayarak anjiogeneze önemli rol oynamaktadır (17).

Anjiopöietin

Anjiopöietinler, damar stabilizasyonu ve büyümesinde rol oynayan endotel hücreye özgül moleküllerdir. Dört tipi bulunan (Ang-1, -2, -3, -4) anjiopöietin molekülü Tie reseptörlerine bağlanarak etkinlik göstermektedirler (18).

FGF

Asidik (aFGF veya FGF-1) ve bazik (bFGF veya FGF-2) olmak üzere iki formu vardır. Endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu uyarmalarının yanında kollajenaz ve plazminojen aktivatörü üretimini arttırmaktadırlar (19,20,21).

PDGF

PDGF'nin anjiogeneze rolü tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda PDGF'nin in vivo anjiogenezi uyardığı ve damarsal yaşlanma sürecinde aktif rol oynadığı gösterilmiştir (22,23).

TGF-beta

TGF-beta, hem pro-anjiogenik hem de anti-anjiogenik özellik göstermektedir. Düşük TGF-beta düzeyleri anjiogenik faktörler ve proteinaz aracılığı ile anjiogenezi uyarmaktadır. Bunun yanında, yüksek TGF-beta seviyesi endotel hücre büyümesini inhibe etmekte, kas hücre farklılaşmasını ve bazal membran oluşumunu uyarmaktadır (24).

MMP

Matriks metalloproteinazlar, ekstraselüler matriksin yıkılmasında rol oynayan proteolitik enzimlerdir. Hipoksi ve asidoz ile aktive olan enzimler bazik-FGF gibi diğer birçok pro-anjiogenik faktörün de üretiminde rol oynamaktadır.

COX-2

Prostaglandin biyosentezinde rol oynayan sikloksijenaz enziminin COX-1 ve -2 olmak üzere iki formu bulunmaktadır. COX-2, pro-inflamatuardır ve genellikle makrofajlar ve monositler tarafından doku hipoksisi ve hasarına yanıt olarak sentezlenmektedir. COX-2'nin pro-anjiogenik özelliği VEGF ve bFGF ekspresyonunda artmaya sebep olması ve endotel hücre apoptozunu inhibe etmesindedir (13).

Bunların dışında TNF-alfa, TGF-alfa, EGF, anjiogenin, IL-6/8, NAP-2, GCP-2 ve ENA-78 anjiogenezi uyaran diğer faktörlerdendir.

Anti-anjiogenik Faktörler

Günümüzde anti-anjiogenik özellik gösteren birçok molekül tanımlanmıştır. Anjiostatin, endotel ve tümöral hücrelerde apoptozu uyarmaktadır (25). Endostatin, endotel hücre migrasyonunu inhibe eden ve endotel hücrede hücre siklusunu bloke ederek apoptozu indükleyen güçlü bir sitokindir. Trombospondin-1 (TSP-1) ise CD36 reseptörü aracılığı ile endotel hücre apoptozunu uyarmaktadır (26,27). TIMP (tissue inhibitor metalloproteinase), ailesinin dört üyesi (TIMP-1, -2, -3, -4) bulunmaktadır ve matriks metalloproteinazı inhibe etmektedir. Vazostatin, platelet-ilişkili platelet faktör-4 (PF-4) ve osteopontin diğer anti-anjiogenik moleküllerdir.

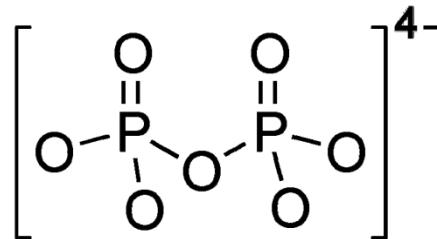
Anjiogenez ve Prostat Kanseri

Prostat kanserinde anjiogenezin önemine bakıldığında, yapılan çoğu çalışmada anjiogenez ile gleason skoru, tümör evresi, metastazı ve sağkalım arasında klinik korrelasyon olduğu gözlemlenmiştir (28,29). VEGF ekspresyonu, normal prostat dokusunda az olmasına rağmen tümöral dokuda belirgin artmıştır ve bu durum mikro-damar dansitesi (MVD), hastalığın evresi ve prostat kanseri ilişkili sağkalım azalması ile pozitif ilişkilidir (30). VEGF ekspresyonunun yanında artmış MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu prostat tümörünün malign potansiyelini daha da arttırmaktadır ve benign prostat hastalığı ile karşılaştırıldığında metastatik hastalıkta kandaki miktarı daha yüksek saptanmaktadır (31,32). VEGF regülasyonunda HIF-1'in önemli bir rolü olmasına karşın günümüze kadar HIF-1 ekspresyonu yeterince çalışılmamıştır.

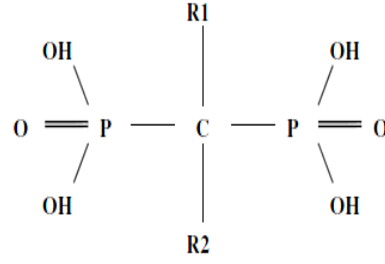
Hormon ablasyon tedavisi öncesi ve sonrasında yapılan prostat biyopsileri karşılaştırıldığında tedavi sonrasında VEGF ekspresyonunda azalma ve trombospondin ekspresyonunda artma dikkati çekmektedir (33,34). Meyer ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada serum PSA düzeyinin 4 ng/mL'nin altında olduğu hastalarda bFGF düzeyinin karsinom saptamada ve lokal hastalık ile ileri hastalık ayırımında yüksek duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (35). IL-8 ekspresyonu ile gleason skoru, hastalık evresi ve MVD arasında direkt korrelasyon olmakla birlikte metastatik hastalıkta serum seviyesi artmaktadır (36,37). Benzer şekilde doku faktörü düzeyi ve TGF-beta ekspresyonu ile anjiogenez arasında korrelasyon bulunmaktadır.

BİFOSFONATLAR

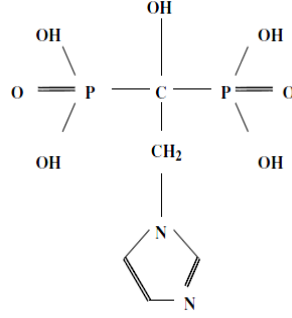
Bifosfonatlar, pirofosfat (PPi) molekülünün sentetik analoglarıdır. Pirofosfat molekülündeki P-O-P santral yapısının yerine santral P-C-P yapısına sahiplerdir (Şekil 1 ve 2) ve pirofosfat molekülüne göre daha stabil, osteoklastlardaki enzimatik hidrolize karşı daha dirençlidirler. Santral yapıya karbon atomu aracılığı ile bağlanan iki, R1 ve R2, yan zincir yapısına sahiptirler.



Şekil 1. Pirofosfatın kimyasal yapısı



Şekil 2. Bifosfonatların kimyasal yapısı



Şekil 3. Zoledronik Asit'in kimyasal yapısı

Santral karbon atomuna kovalent bağlanan R1 yan zincir, bifosfonatların kemik mineraline bağlanmasını sağlamaktadır. R2 yan zincir ise molekülün osteoklast-aracılı kemik rezorpsiyonu inhibisyonu gücünü belirlemektedir. Bifosfonatlar, R2 yan zincirlerinde nitrojen atom içerip içermemelerine göre Nitrojen-içeren Bifosfonatlar (N-BP) veya Nitrojen-içermeyen Bifosfonatlar (non-N-BP) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar (38).

Yapılan çalışmalarda hem N-BP hem de non-N-BP'ların osteoklastlarda apoptozu indükledikleri gösterilmiştir (39,40). Her iki grup da apoptozu, caspase-3/caspase-3 benzeri proteolitik enzimler aracılığı ile uyarmaktadırlar (40). Uygulandıktan sonra bifosfonatlar kemik mineral dokusuna bağlanmakta ve rezorpsiyon esnasında osteoklastlar tarafından hücre içine alınmaktadırlar. Non-N-BP'lardan olan etidronat, clodronat veya tiludronat molekülleri, esansiyel ATP-bağımlı hücre içi enzimleri inhibe ederek hücre içi sitotoksik ATP-analoglarının birikmesine yol açmaktadırlar (41). Nitrojen-içeren BP'lar (pamidronat, risedronat, alendronat, ibandronat ve zoledronik asit) ise mevalonat yolağını inhibe ederek osteoklast apoptozuna yol açarlar (40, 42). N-BP'lar arasında zoledronik asit (Şekil 3), R2 yan zincirini oluşturan iki nitrojenli imidazol halkası sebebi ile FPPS (farnesyl difosfat sentaz)'ı en etkin inhibe eden moleküldür (43). Bu inhibisyon, farnesil ve geranilgeranil difosfat düzeylerinde azalmaya yol açarak osteoklast fonksiyonu için gerekli olan GTPazların (Ras, Rho ve Rac gibi) prenilasyonunun bozulmasına sebep olmaktadır. Osteoklastlardaki FPPS inhibisyonu aynı zamanda kaspaz-bağımlı apoptozu uyarmakta ve MMP aktivitesini inhibe etmektedir (40,44).

Ayrıca N-BP'lar sitotoksik ATP analogu olan Appi üretimini uyararak direkt osteoklast apoptozunu da uyarabilmektedirler (45).

Zoledronik Asit ve Anjiogenez

Anjiogenez belirteçleri dolaşımında saptanabilmektedirler. Yapılan klinik çalışmalarda, kemik metastazı olan kanser hastalarında zoledronik asit kullanımı ile VEGF gibi dolaşan pro-anjiogenik faktörlerde azalma olduğu gözlemlenmiştir (46). In vivo ve in vitro çalışmalar, zoledronik asitin endotelial kapiller benzeri tüp oluşumu ve revaskülarizasyonu inhibe ettiğini göstermektedir (47). Servikal tümörlerde zoledronik asit uygulaması, doku makrofajlarındaki MMP-9 ekspresyonunu ve aktivitesini azaltmaktadır (48). Bu durum hem dolaşan endotel progenitör hücre mobilizasyonunu engellemekte hem de VEGF-VEGFR ilişkisini azaltmaktadır (49).

APOPTOZ

Tüm hücrelerin sınırlı ömürleri vardır ve hücre ölümü pasif nekrotik süreçler veya programlı hücre ölümü, apoptoz, gibi aktif süreçler sonucu gerçekleşmektedir (50). Apoptoz, insan embriyonik gelişimi ve erişkin doku homeostazisinde önemli rol oynamaktadır (51). Apoptoz sonucunda, vücutta hasarlı veya istenmeyen hücrelerin lokal inflamasyon süreci olmaksızın ortadan kaldırılması sağlanmaktadır (52).

Apoptoz sürecinde olan hücrelerde morfolojik olarak hücre büzülmesi, yoğunlaşma, nükleer fragmentasyon, plazma membranında kabarcıklaşma, kromatin yoğunlaşması ve nükleozomal fragmentasyon gibi morfolojik değişiklikler gözlenmektedir (53). Bu süreç sonunda oluşan membran-kaplı apoptotik cisimler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tüketilmektedirler.

Fonksiyonel apoptotik yolaklar doku homeostazisi için gereklidir ve apoptozisteki düzensizlik ile birçok hastalık durumu arasında ilişki gösterilmiştir. Patolojik olarak artmış

apoptoz AIDS, Alzheimer Hastalığı ve kardiyak iskemi gibi durumların ağırlaşmasına neden olabilmektedir. Apoptozun yetersiz olduğu durumlar ise otoimmün hastalıklar ve kanser gelişimine sebep olabilmektedirler (52). Apoptozdaki aksaklık, kanserin kilit özelliğidir ve kanser gelişimi ile tümör hücre canlılığı için kritik öneme sahiptir (54).

Apoptoz, iç yolak ve dış yolak olmak üzere iki ana sinyal iletim yolağı ile gerçekleşmektedir (55). İç yolak, hücre içindeki gelişimsel işaretler veya DNA hasarı gibi şiddetli hücrel stres durumlarınca tetiklenmektedir. Dış yolak ise endojen Fas ligand veya Apo2L/TRAIL gibi pro-apoptotik ligandların Fas veya DR4 (death receptor 4) ve DR5 (death receptor 5) gibi pro-apoptotik ölüm reseptörlerine bağlanması ile aktive olmaktadır. İç ve/veya dış yolağın aktivasyonu sonrasındaki hücre yıkımı kaspazlar olarak adlandırılan hücre içi proteazlar tarafından gerçekleşmektedir (56). Apoptoz sinyal yolağının aktivasyonu sonrasında Kaspaz-2, 8, 9 ve 10 aktif hale gelmekte ve bunlar da efektör kaspazlar olan Kaspaz-3, 6 ve 7'yi aktive etmektedir (57). Aktive olan kaspazlar aktin, myozin, spectrin, gelsolin ve filamin gibi hücre iskeletinin temel yapılarının yıkımına sebep olmakta ve bu da hücrenin yuvarlaklaşması ve büzüşmesine yol açmaktadır. CAD (*caspase activated DNase*) aracılığı ile DNA fragmentasyonu gerçekleşmekte, lamin A, B ve C yıkımı ile de nükleer fragmentasyon gerçekleşmektedir. Apoptoz sürecinde gerçekleşen mitokondrial parçalanma ise kaspaz aktivasyonuna değil, BAX (*BCL-2-associated X protein*) ve/veya BAK (*BCL-2-antagonist/killer-1*) aktivasyonu sonucunda mitokondri dış membranının geçirgenliğinin artması ve mitokondrial intermembranöz proteinlerin salınımı sonucunda gerçekleşmektedir (55).

III- MATERYAL VE METOD

Hücre hatları ve kültür ortamı

İnsan hormon-dirençli prostat kanseri hücre hatları olan PC-3 ve DU-145, Interlab Cell Line Collection (ICLC)'dan temin edildi. Bu hücre hatları, 50 ml'lik kaplara (Falcon) RPMI 1640 besiyeri (Kibutz Beit Haemeh, 25115, İsrail) ile birlikte kültürde çoğaltılmak üzere yerleştirildi; ortama 2 µM glutamin (Kibutz Beit Haemeh, 25115, İsrail), %10 fetal bovin serumu (Life Technologist) ve % 1 streptomisin eklenerek tek katman halinde çoğaltıldı. Hücre kültür işlemleri Hood (NuAire,USA) ve inkübatörde (NuAire,USA) gerçekleştirildi. İşlem öncesi Hood 30 dakika ultraviyole lambası ile sterilize edildi ve ardından alkol ile silindi. Sıvı nitrojende (-196 °C) saklanmış olan PC-3 ve DU-145 hücre örnekleri oda sıcaklığında eritildi ve 50 ml'lik flaslara steril şartlarda aktarıldı. Üzerine 10 ml besiyeri eklendi. Flask inkübatöre konmadan önce kapağı hafif gevşetildi ve hücreler humidifiye, 37°C'de %5 CO₂ ortamında çoğaltıldı. Kültür medyumunu haftada iki defa değiştirildi. Pasajlar, hücrelerin çoğalma ve morfolojileri gözlemlenerek gerçekleştirildi. Her pasaj sırasında ortalama 2 milyon hücre, 10 ml besiyeri konmuş flaslara alındı. Hücreler kaplardan tripsin-EDTA (Biological Industries Indianapolis) ile muamele edilerek ayrıştırıldı ve trypan blue dye exclusion test ile boyanarak hem canlılık hem de enfeksiyon açısından değerlendirildi.

İlaç

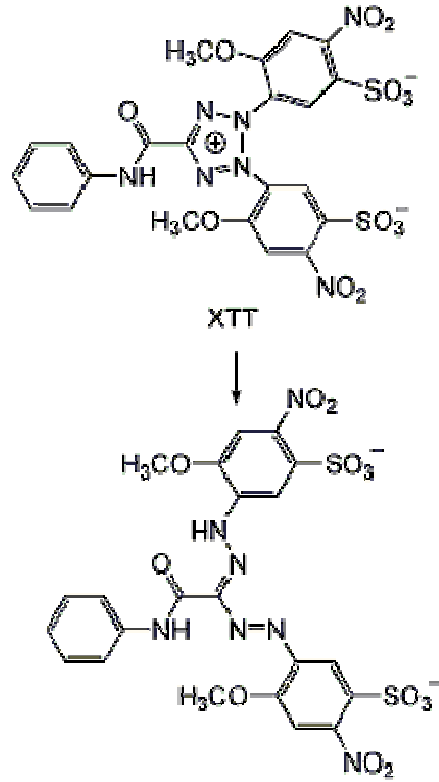
Zoledronik asit (Novartis, Basel, İsviçre - molekül ağırlığı: 272,09 g/mol) 0,002 M stok solusyon oluşturmak üzere DMSO' da çözüldü ve solüsyon – 20 °C' de saklandı. Birinci günde 300 µl 96'lık well microtiter plate kültür kaplarına kuyucuk başına 10.000 DU-145 ve PC-3 prostat kanseri hücresi üçlü deney grupları (triplicate) oluşturacak şekilde ekim yapıldı. Bu kuyucuklar 37 °C de %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş atmosferde 24 saat enkübe

edildiler. Bu şekilde kanser hücrelerinin ilaçlar konmadan önce kuyucuk tabanlarına yapışmasına olanak sağlanmış oldu. 24. saatin sonunda kuyucuklara değişen konsantrasyonlarda zoledronik asit (20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM ve 120 µM) tek tek her deney üç defa tekrarlanacak şekilde eklendi.

Sitotoksisite analizi

Hücreler zoledronik asit ile birlikte 24, 48 ve 72 saat süreyle aynı ortamda enkübe edildikten sonra hücre proliferasyonu ve sitotoksisite analizi için XTT metoduyla değerlendirmeye tabi tutuldu.

Tetrazolium tuzuna dayanan kolorimetrik bir metod olan XTT, ilk olarak 1988 de P.A.Scudiero tarafından tanımlanmıştır. Metod tetrazolium tuzu XTT'nin metabolik aktif çekirdekli hücre mitokondrilerinde suda çözünen bir madde olan ve turuncu renk veren formazan'a dönüşümü prensibine dayanır (Şekil 4). Başlangıçta sarı olan ortamdaki renk, madde hücrelerde metabolize oldukça turuncuya dönüşür. Canlı hücre sayısı az ise renk değişimi az olurken canlı hücre sayısı fazla ise renk değişimi daha fazla olmaktadır. Hücreler ve deney yapılacak ilaç 96 kuyucuktan oluşan kültür ortamında yeterli süre enkübe edildikten sonra XTT eklenerek 2-5 saat süreyle muameleye tabi tutulur. Oluşan turuncu renk yoğunluğunun absorbansı dalga boyu 450-500 nanometre olan bir spektrofotometrede (ELISA) ölçülür.



Şekil 4. XTT'nin canlı hücrelerde suda çözünür formazana dönüşümü

Bu çalışmada değişen dozlarda zoledronik asit ile 24, 48 ve 72 saat süreyle enkübe edilen DU-145 ve PC-3 prostat kanseri hücreleri XTT eklendikten sonra ELISA cihazıyla sitotoksisite ölçümüne tabi tutulmuş ve % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

Apoptozun değerlendirilmesi

Bu çalışmada apoptoz, histon-DNA fragmentasyon analizi ve Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi ölçümü ile değerlendirilmiştir.

DNA fragmentasyonu tayini için Cell Death Detection ELISA plus kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) kullanıldı. Bu yöntemde hücre ölümü ile ortaya çıkan sitoplazmik histon bağlı DNA fragmanları ölçüldü. Hücreler ilaçlarla yeterli süre enkübe edildikten sonra santrifüj ile elde edilen ve nekrotik hücrelerin membranlarından ortama çıkan DNA'yı içeren süpernatant alındı. Daha sonra hücreler lizis tamponu ile birlikte yeniden

enkübe edildi ve lizis sonrasında sağlam nükleuslar santrifüj ile toplandı. Elde edilen süpernatantlar kit ile birlikte verilen streptavidin kaplı ortama (microplate) geçirildi. Supernatant DNA fragmanlarına (peroxidase conjugated) ve histon proteinlerine (biotin labeled) karşı antikorlar içeren immunoreagen ile birlikte 2 saat enkübe edildi. Ortamda hareketsiz bulunan antikor nükleozom kompleksleri immünoreaktif olmayan hücre yapılarının uzaklaştırılması için üç defa enkübasyon tamponuyla yıkandıktan sonra peroxidase substrat solusyonu ile enkübe edildi. Elde edilen örneğin absorbansı spektrofotometrik olarak (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter) 490 nm referans dalga boyu ile 405 nm' de okundu.

Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi ise Caspase-Glo Assay (Promega, WI, USA) kullanılarak değerlendirildi. İlaçlarla muamele edilmiş ve edilmemiş hücreler toplam hacim 300 µl olacak şekilde 96 kuyucuk içeren hücre kültürü plaklarına eklendi. Kitin ihtiva ettiği 2,5 ml Caspase-Glo 3/7 Buffer, Caspase-Glo 3/7 substratı ile karıştırılarak substratın tamamen çözünmesi sağlandı. Elde edilen bu karışımdan her kuyucuğa 100 µl eklenerek hücre kültürü plakası oda sıcaklığında 1 saat enkübe edildi. 1 saatlik enkübasyon sonunda oluşan lüminesans sinyalleri çok modüllü plaka okuyucu ile ölçüldü (Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Reader). Caspase-Glo 3/7 karışımı, kaspaz 3/7 substratı olan DEVD Asp-Glu-Val-Asp tetrapeptid dizisi ayrıca hücre lizisini sağlayan buffer içermektedir. Bu karışımın hücrelere eklenmesi hücrelerin lizisine, ardından da kaspaz substratının yıkımına bağlı olarak lüminesans sinyal oluşumuna neden olur. Oluşan lüminesans sinyal miktarı, hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesiyle doğru orantılı olarak değerlendirilir.

Anjiogenezin değerlendirilmesi

PC-3 ve DU-145 hücre hatlarında zoledronik asit uygulaması öncesi ve sonrasındaki anjiogenik sitokin profilini belirlemek amacı ile RayBio Human Angiogenesis Antibody Array 1 (RayBiotech, GA, USA) üretici firmanın talimatlarına uygun bir biçimde kullanıldı. Bu teknik ile çalışılan sitokinlerin listesi Tablo 1’de gösterilmiştir. İlaç eklenmeyen kontrol hücre hatları ile canlılık analizi sonucu elde edilen IC50 değerlerine göre (DU-145 için 90 µM, PC-3 için 70 µM konsantrasyonda) zoledronik asit eklenen hücre hatlarından toplanan supernatantlar 72 saat sonrasında sitokin profilleri için araştırıldı. Bu metod, üzerinde her bir sitokine özgül antikorlar ile kaplı bir zarın bloke edilmesi sonrasında örneklerin eklenip oda sıcaklığında enkübe edilmesi prensibine dayanmaktadır. Sitokin saptaması, enkübasyon sonrasında örnek-antikor kompleksi üzerine sırası ile biyotinize antikor ve işaretili (yaban otu peroksidaz ile)-streptavidin eklenerek enkübe edilmesi ile tamamlanmaktadır.

Tablo 1. RayBio Human Angiogenesis Antibody Array 1 ile çalışılan anjiogenik sitokinler

Sitokin	Sitokin adı
Angiogenin	Angiogenin
EGF	Epidermal Growth Factor
ENA-78	Epithelial Neutrophil Activating Peptide 78
bFGF	Fibroblast Growth Factor (basic)
GRO	Growth Related Protein
IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
Leptin	Leptin
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor
PlGF	Placental Growth Factor
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1
TIMP-2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2
Thrombopoietin	Thrombopoietin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-D	Vascular Endothelial Growth Factor-D

Enkübasyon sonrasındaki sinyal algılama işlemi Kodak® Gel Logic 1500 görüntüleme sistemi ile gerçekleştirildi. Noktaların miktarı bilgisayar destekli imaj analizi (Koadarray® 2.6 software) kullanılarak belirlendi; öncelikle noktaların arka fonu çıkarıldı ve sonra kitlerin ortalama yoğunluğuna göre normalize edilerek her kit için normalize yoğunluklar hesaplandı. Daha sonra her kuyucuğun hücre protein içeriği için veriler düzeltildi. Her bir sitokinin göreceli ekspresyon seviyesi, nokta piksel ortalama değerleri \pm standart deviasyon (SD)'a göre hesaplandı ve Koadarray® algoritmaları ile her nokta için 0'dan 100'e kadar güven aralığı saptandı. Nokta piksel ortalama değeri, her bir noktanın arka fonu çıkarılmış toplam yoğunluğunu göstermektedir. Daha sonra, nokta yoğunluğu, nokta alanındaki tüm arka fonu silinen değerlerin toplamı ile verilmektedir. Koadarray tarafından bir artefaktın parçası olarak belirlenen pikseller dışlandı. Güven aralığı nokta şekli, yoğunluğu ve homojenitesi gibi birkaç parametreye dayanmaktadır. $50 \pm (SD)$ 'dan fazla olan bir değer güvenilir noktayı göstermektedir. İlaç maruziyeti sonrasındaki sitokin ekspresyonundaki değişiklikler, -kat azalma olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

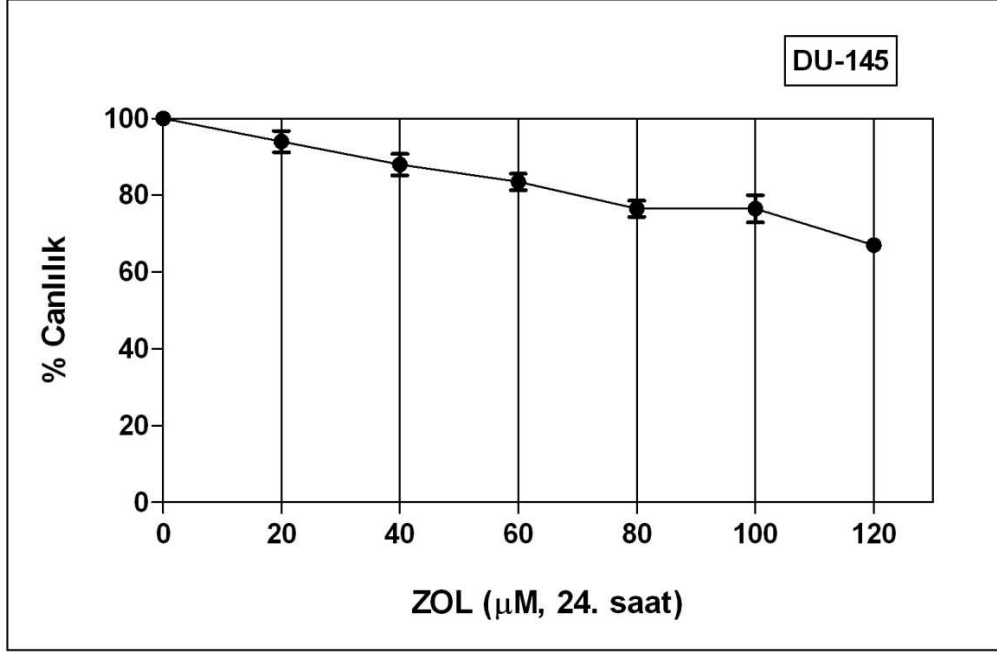
Deneylerdeki veriler GraphPad PRISM 5.0 (San Diego, CA, USA) kullanılarak analiz edildi. Tüm deneyler "triplicate" olarak yapıldı ve sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edildi. En son değer, üç deneydeki ekspresyon oranı (y eksenini) \pm SD'dan elde edilen veriler ile belirlendi. İki grubun sonuçlarının karşılaştırılmasında Student's t test kullanılarak veri analizi yapıldı ($p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

IV- SONUÇLAR

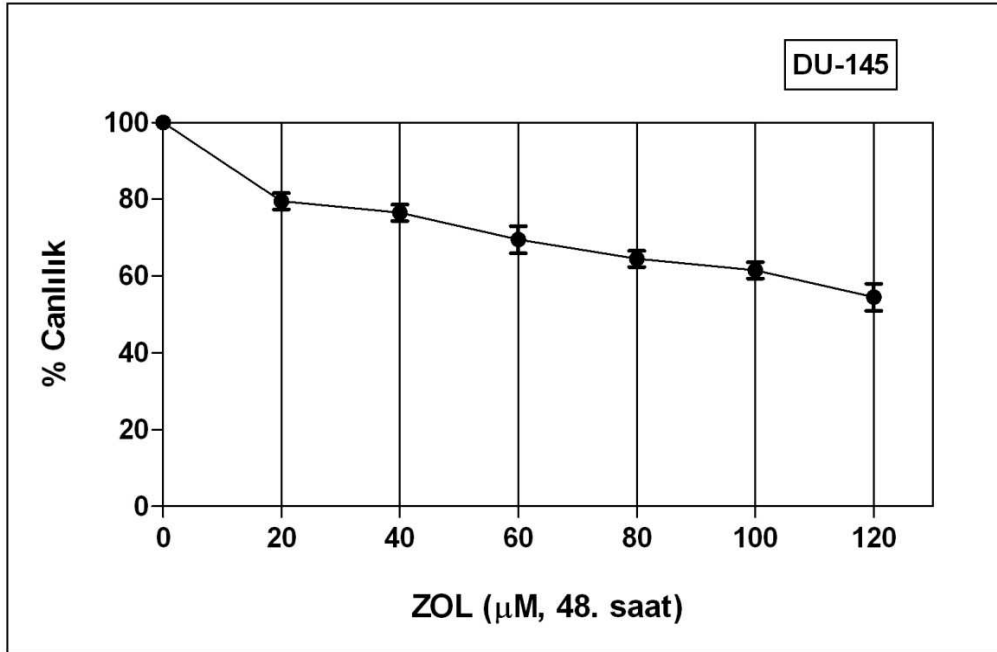
DU-145 ve PC-3 hücre hatlarında zoledronik asitin zamana ve doza bağımlı anti tümöral etkilerinin gösterilmesi ve IC50 değerinin saptanması

DU-145 ve PC-3 hücreleri 96 kuyucuktan oluşan (microtiter well plate) deney ortamına her kuyucukta 10.000 hücre bulunacak şekilde ekildi. Zoledronik asitin altı farklı konsantrasyonunun (20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M ve 120 μ M) 24. saat, 48. saat ve 72. saatlerdeki sitotoksitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenebilmesi için üç ayrı deney oluşturacak şekilde deney planlaması yapıldı. Her deney grubunda sadece besiyeri ve besiyeri ile birlikte hücre bulunacak şekilde iki adet pozitif kontrol sağlandı. Pozitif kontroller ve farklı ilaç konsantrasyonlarının bulunduğu her deney üç defa tekrarlandı. 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M ve 120 μ M konsantrasyonlarda zoledronik asit DU-145 ve PC-3 hücrelerinin bulunduğu deney ortamına eklendi. 24. saat, 48. saat ve 72. saatlerde yukarıda bahsedildiği şekilde XTT metodu kullanılarak sitotoksitesite ölçümü spektrofotometrik yöntemle (ELISA) yapıldı.

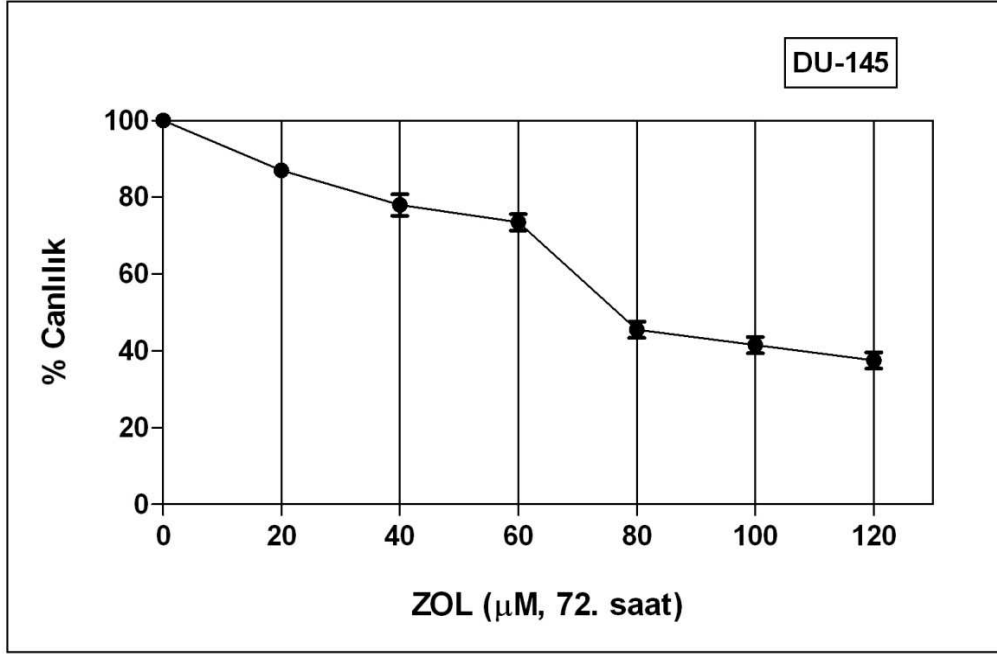
DU-145 hücre hatları için elde edilen verilerde 24. saatte 20 μ M zoledronik asit ile % 96, 40 μ M zoledronik asit ile % 90, 60 μ M zoledronik asit ile % 85, 80 μ M zoledronik asit ile % 78, 100 μ M zoledronik asit ile % 74, 120 μ M zoledronik asit ile % 68 canlılık gözlemlendi (Grafik 1). Yine DU-145 hücre hatlarında 48. saatte 20 μ M zoledronik asit ile % 81, 40 μ M zoledronik asit ile % 78, 60 μ M zoledronik asit ile % 72, 80 μ M zoledronik asit ile % 66, 100 μ M zoledronik asit ile % 60, 120 μ M zoledronik asit ile % 57 canlılık gözlemlendi (Grafik 2). 72. saat verilerinde ise 20 μ M zoledronik asit ile % 88, 40 μ M zoledronik asit ile % 80, 60 μ M zoledronik asit ile % 72, 80 μ M zoledronik asit ile % 47, 100 μ M zoledronik asit ile % 43, 120 μ M zoledronik asit ile % 39 canlılık gözlemlendi (Grafik 3).



Grafik 1. DU-145 hücre hatlarında 24. saatte zoledronik asitin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite

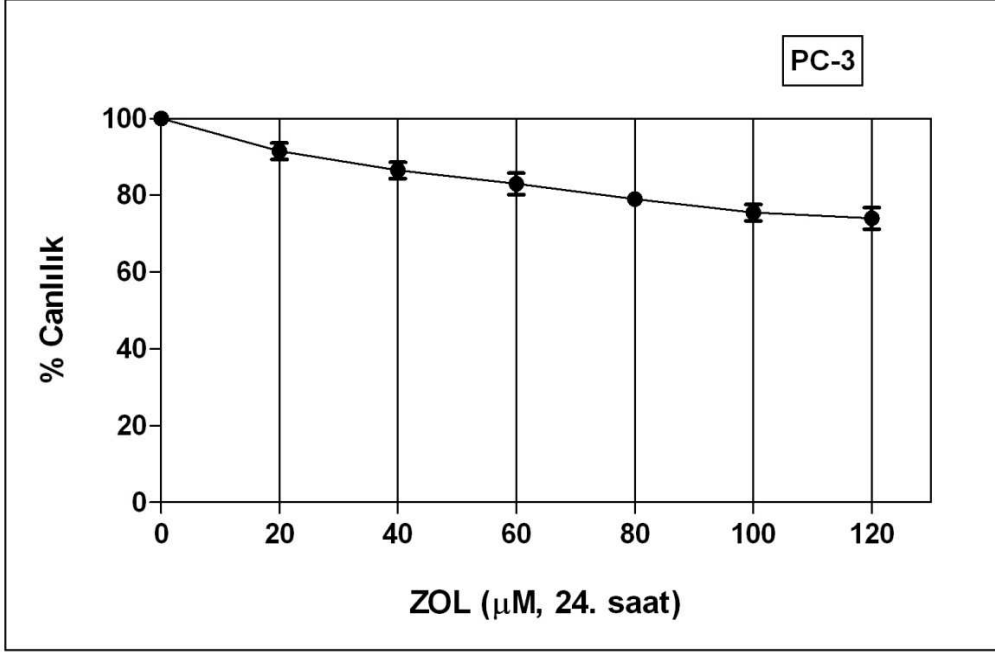


Grafik 2. DU-145 hücre hatlarında 48. saatte zoledronik asitin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite

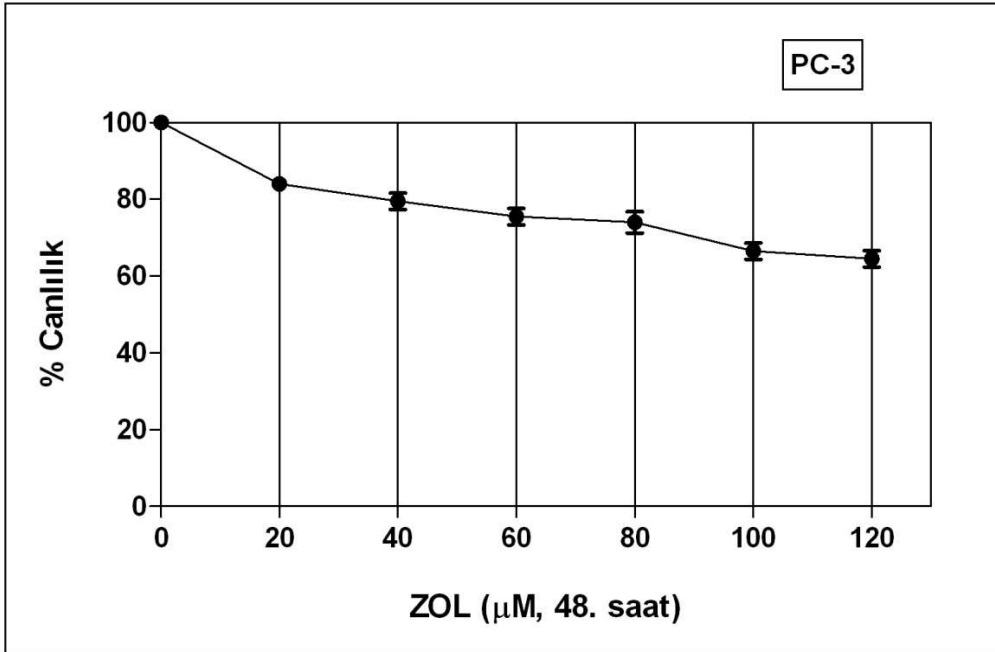


Grafik 3. DU-145 hücre hatlarında 72. saatte zoledronik asitin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite

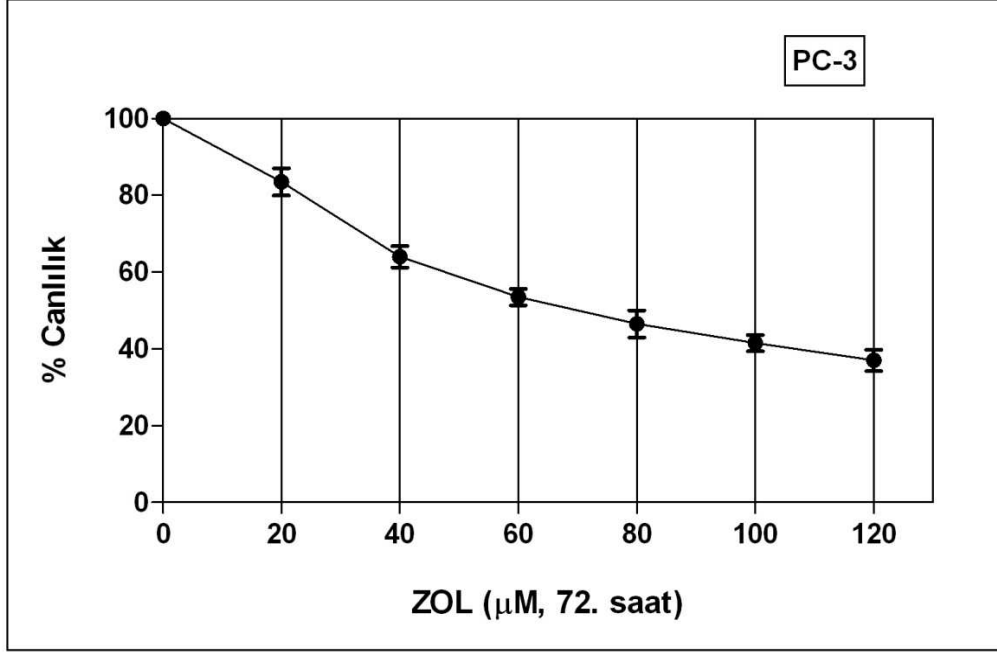
PC-3 hücre hatları için elde edilen verilerde 24. saatte 20 μM zoledronik asit ile % 93, 40 μM zoledronik asit ile % 88, 60 μM zoledronik asit ile % 85, 80 μM zoledronik asit ile % 80, 100 μM zoledronik asit ile % 77, 120 μM zoledronik asit ile % 76 canlılık gözlemlendi (Grafik 4). Yine PC-3 hücre hatlarında 48. saatte 20 μM zoledronik asit ile % 85, 40 μM zoledronik asit ile % 81, 60 μM zoledronik asit ile % 77, 80 μM zoledronik asit ile % 76, 100 μM zoledronik asit ile % 68, 120 μM zoledronik asit ile % 63 canlılık gözlemlendi (Grafik 5). 72. saat verilerinde ise 20 μM zoledronik asit ile % 81, 40 μM zoledronik asit ile % 66, 60 μM zoledronik asit ile % 55, 80 μM zoledronik asit ile % 49, 100 μM zoledronik asit ile % 43, 120 μM zoledronik asit ile % 39 canlılık gözlemlendi (Grafik 6).



Grafik 4. PC-3 hücre hatlarında 24. saatte zoledronik asitin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite



Grafik 5. PC-3 hücre hatlarında 48. saatte zoledronik asitin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite



Grafik 6. PC-3 hücre hatlarında 72. saatte zoledronik asitin değişen konsantrasyonlarında gözlenen sitotoksosite

Zoledronik asitin her iki hücre hattı için 72. saatte tespit edilen sitotoksosite yüzdeleri CalCusyn programına girilerek çalışılan hücre hatlarındaki IC50 değerleri belirlendi. Bu programa göre zoledronik asitin 72. saatte, DU-145 hücre hattındaki IC50 değeri 92,7 µM, PC3 hücre hattındaki IC50 değeri 76 µM olarak tespit edildi.

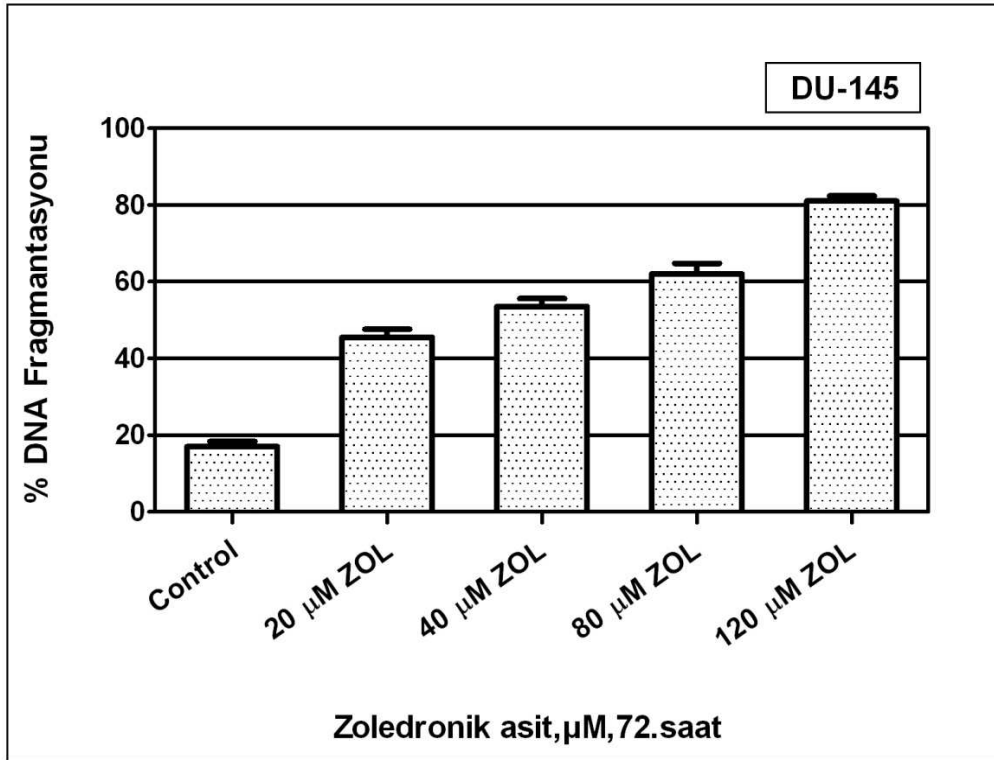
Apoptoz Deneyi Sonuçları

XTT ile yapılan sitotoksosite deneyleri ile zoledronik asitin farklı konsantrasyonlarda DU-145 ve PC-3 prostat kanseri hücre hatlarındaki sitotoksitesinin gösterilmesinden sonra bu hücre hatlarında apoptozu indükleyici etkilerinin araştırılması amacı ile çalışma metodu kısmında anlatıldığı şekilde DNA fragmentasyonu ve Kaspaz 3/7 aktivitesi ölçüldü.

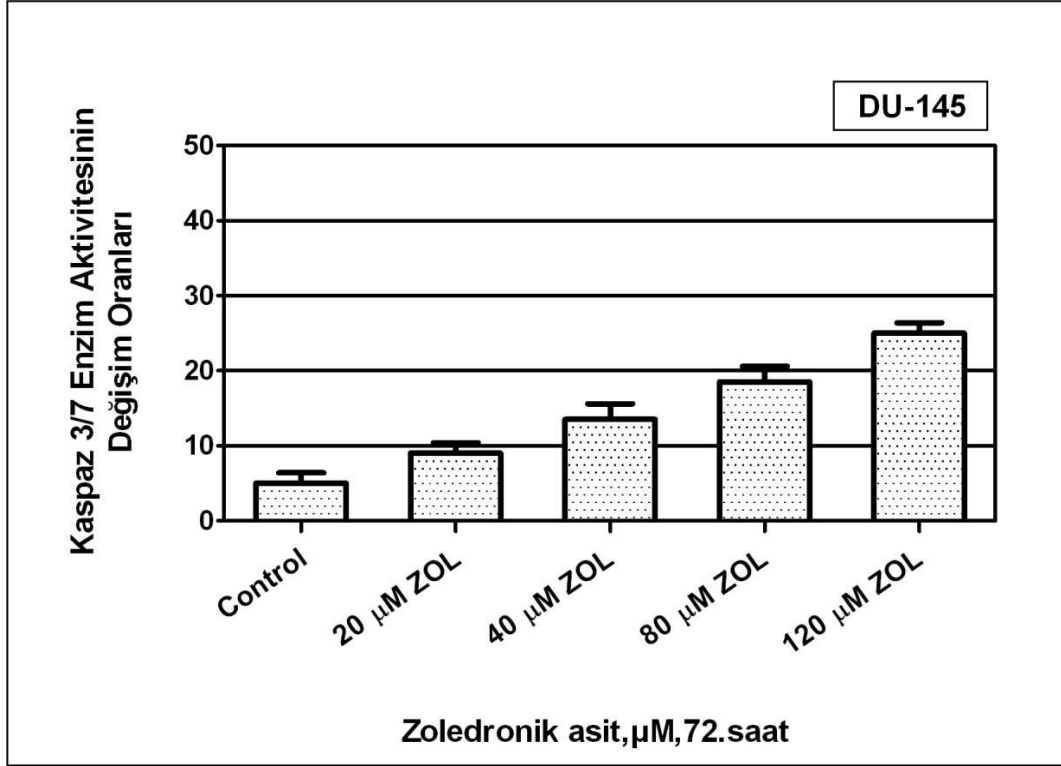
DU-145 hücre hatlarında 72. saat artan zoledronik asit konsantrasyonlarında DNA fragmentasyon yüzdeleri Grafik 7’de gösterilmiştir. Buna göre; 20 µM zoledronik asit ile % 44, 40 µM zoledronik asit ile % 52, 80 µM zoledronik asit ile % 60 ve 120 µM zoledronik asit ile % 80 DNA fragmentasyon yüzdeleri gözlemlenmiştir. Yine DU-145 hücre hatlarında 72.

saat artan zoledronik asit konsantrasyonlarında Kaspaz 3/7 aktivitesi değişim oranları Grafik 8’de gösterilmiştir. Kontrol hücre hattına göre; 20 µM zoledronik asit ile 2 kat, 40 µM zoledronik asit ile 3 kat, 80 µM zoledronik asit ile 4.25 kat, 120 µM zoledronik asit ile 6 kat artan Kaspaz 3/7 aktivite değişim oranı gözlemlenmiştir.

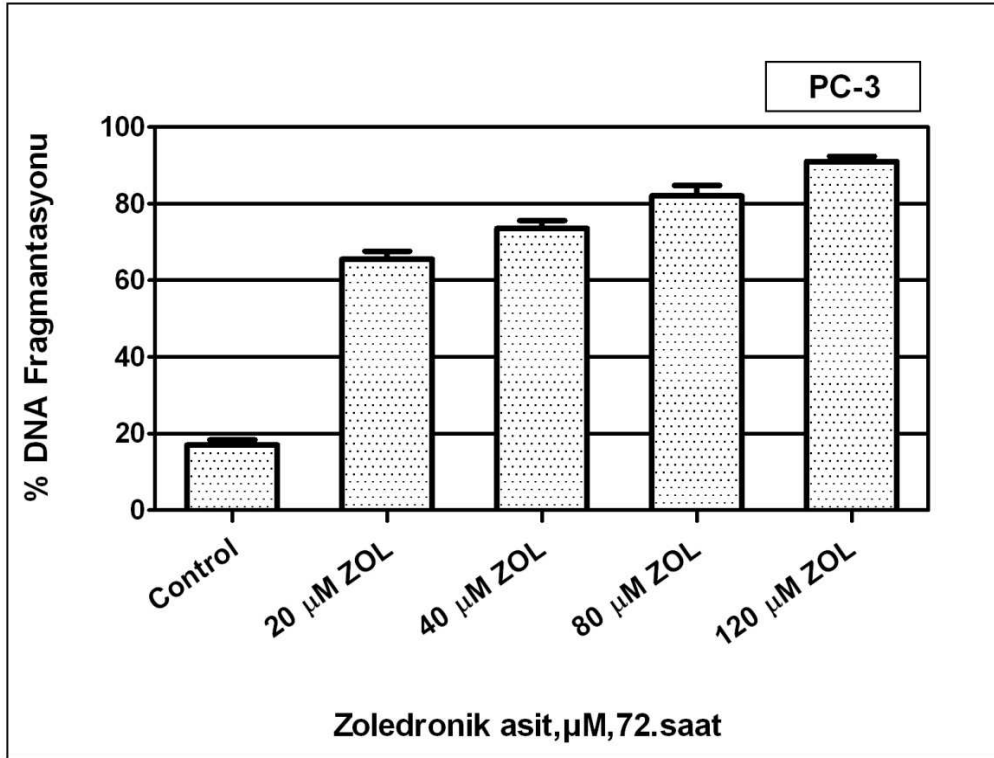
PC-3 hücre hatlarında 72. saat artan zoledronik asit konsantrasyonlarında DNA fragmentasyon yüzdeleri Grafik 9’da gösterilmiştir. Buna göre; 20 µM zoledronik asit ile % 64, 40 µM zoledronik asit ile % 72, 80 µM zoledronik asit ile % 80 ve 120 µM zoledronik asit ile % 90 DNA fragmentasyon yüzdeleri gözlemlenmiştir. Yine PC-3 hücre hatlarında 72. saat artan zoledronik asit konsantrasyonlarında Kaspaz 3/7 aktivitesi değişim oranları Grafik 10’da gösterilmiştir. Buna göre; kontrol hücre hattı ile karşılaştırıldığında 20 µM zoledronik asit ile 1.6 kat, 40 µM zoledronik asit ile 2.5 kat, 80 µM zoledronik asit ile 3 kat, 120 µM zoledronik asit ile 4.1 kat artan Kaspaz 3/7 aktivite değişim oranı gözlemlenmiştir.



Grafik 7. DU-145 hücre hattı 72. saat DNA fragmentasyon yüzdeleri



Grafik 8. DU-145 hücre hattı 72. saat kaspaz 3/7 enzim aktivitesi değişim oranları



Grafik 9. PC-3 hücre hattı 72. saat DNA fragmentasyon yüzdeleri



Grafik 10. PC-3 hücre hattı 72. saat kaspaz 3/7 enzim aktivitesi değişim oranları

Anjiogenez Deneyi Sonuçları

Zoledronik asit tedavisi uygulanmayan 4 milyon PC-3 ve DU-145 hücrelerinden elde edilen supernatantlar ve tedavi uygulanan 4 milyon PC-3 ve DU-145 hücrelerinin supernatantları, RayBio Human Angiogenesis Antibody Array 1 (RayBiotech, GA, USA) kullanılarak hücre hatlarıncı sentezlenen anjiogenik sitokin profilleri belirlendi. Elde edilen verilerde güvenilirlik aralığı $50 \pm SD$ 'nin üzerinde olan sitokinlerin nokta piksel değerleri, GraphPRISM 5.0 programı ile istatistiksel olarak anlamlılık durumu açısından değerlendirildi.

Elde edilen veriler incelendiğinde PC-3 hücre hattında anlamlı bir şekilde Angiogenin, IL-6, IL-8, MCP-1 ve PDGF-BB sitokinlerinin sekresyonunun olduğu gözlemlendi (Tablo 2). Aynı hücre hattına elde edilen IC50 konsantrasyonunda zoledronik asit tedavisi uygulandıktan sonra ise Angiogenin sekresyonunda 1.37 kat, IL-6 sekresyonunda 2 kat, IL-8 sekresyonunda 1.53

kat, MCP-1 sekresyonunda 1.37 kat ve PDGF-BB sekresyonunda 1.75 kat azalma gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 2. PC-3 hücre hattı Zoledronik Asit uygulaması öncesi anjiogenik sitokin profili

Sitokin	Açıklama	Nokta Pıksel Değeri \pm SD	Güvenilirlik aralığı \pm SD
Angiogenin	Angiogenin	163,4 \pm 3,5	76,5 \pm 2,5
IL-6	Interleukin 6	6,2 \pm 0,4	60,5 \pm 4,5
IL-8	Interleukin 8	166,0 \pm 2,3	77,5 \pm 1,5
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	130,8 \pm 1,7	63,0 \pm 2,0
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor	53,8 \pm 3,0	78,5 \pm 1,5

Tablo 3. PC-3 hücre hattı Zoledronik Asit uygulaması sonrası anjiogenik sitokin profili

Sitokin	Açıklama	Nokta Pıksel Değeri \pm SD	Güvenilirlik aralığı \pm SD
Angiogenin	Angiogenin	119,0 \pm 4,9	73,5 \pm 0,5
IL-6	Interleukin 6	3,1 \pm 0,4	58,0 \pm 1,0
IL-8	Interleukin 8	107,9 \pm 6,6	73,0 \pm 1,0
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	95,4 \pm 3,2	73,5 \pm 0,5
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor	30,7 \pm 1,8	81,5 \pm 1,5

DU-145 hücre hattında ise anlamlı bir şekilde Angiogenin, EGF, ENA-78, IL-8, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-1 ve VEGF sekresyonunun olduğu gözlemlendi (Tablo 4). Aynı hücre hattına elde edilen IC50 konsantrasyonunda zoledronik asit tedavisi uygulandıktan sonra ise Angiogenin sekresyonunda 1.29 kat, EGF sekresyonunda 1.66 kat, ENA-78 sekresyonunda 4.56 kat, IL-8 sekresyonunda 1.72 kat, MCP-1 sekresyonunda 1.38 kat, PDGF-BB sekresyonunda 1.71 kat, TIMP-1 sekresyonunda 1.45 kat ve VEGF sekresyonunda 1.76 kat azalma gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 4. DU-145 hücre hattı Zoledronik Asit uygulaması öncesi anjiogenik sitokin profili

Sitokin	Açıklama	Nokta Pıksel Değeri \pm SD	Güvenilirlik aralığı \pm SD
Angiogenin	Angiogenin	$144,2 \pm 1,6$	$69,0 \pm 5,0$
EGF	Epidermal Growth Factor	$11,5 \pm 0,6$	$79,5 \pm 0,5$
ENA-78	Epithelial Neutrophil Activating Peptide 78	$22,8 \pm 1,9$	$77,5 \pm 0,5$
IL-8	Interleukin 8	$143,1 \pm 4,6$	$76,0 \pm 2,0$
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	$5,4 \pm 0,1$	$64,5 \pm 3,5$
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor	$28,8 \pm 0,7$	$78,0 \pm 3,0$
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1	$100,4 \pm 5,2$	$75,00 \pm 1,0$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	$23,1 \pm 0,5$	$76,5 \pm 2,5$

Tablo 5. DU-145 hücre hattı Zoledronik Asit uygulaması sonrası anjiogenik sitokin profili

Sitokin	Açıklama	Nokta Pıksel Değeri \pm SD	Güvenilirlik aralığı \pm SD
Angiogenin	Angiogenin	$111,5 \pm 1,6$	$73,0 \pm 4,0$
EGF	Epidermal Growth Factor	$6,9 \pm 0,6$	$78,5 \pm 1,5$
ENA-78	Epithelial Neutrophil Activating Peptide 78	$5,0 \pm 0,5$	$75,0 \pm 3,0$
IL-8	Interleukin 8	$82,8 \pm 4,2$	$72,5 \pm 1,5$
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	$3,9 \pm 0,3$	$55,5 \pm 3,5$
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor	$16,8 \pm 1,7$	$81,0 \pm 1,0$
TIMP-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1	$69,1 \pm 1,2$	$72,5 \pm 0,5$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	$13,1 \pm 0,2$	$82,0 \pm 1,0$

V-TARTIŞMA

Bu çalışmada zoledronik asitin hormon refrakter prostat kanseri hücre hatları olan PC-3 ve DU-145 hücre hatlarındaki apoptotik ve anti-anjiogenik etkileri araştırılmıştır. Bu iki hücre hattının seçilmesinde hücre hatlarının, metastatik insan prostat kanserinin agresif yapısına örnek oluşturmaları etkili olmuştur. Her iki hücre hattı da prostat kanserinin farklı iki metastatik lezyonundan elde edilmiş olup birtakım farklı genetik özelliklere sahiptirler. DU-145 hücre hattı, 69 yaşında metastatik prostat kanseri olan bir hastanın metastatik beyin lezyonundan izole edilmiştir ve androjen reseptörü negatif, p53 geninde 2 mutasyon (P223L ve V274F) bulunan hipotriploid karyotipe sahip bir hücre hattıdır (58). PC-3 hücre hattı ise ileri evre prostat kanseri olan bir hastanın lomber vertebraındaki metastatik lezyondan izole edilmiştir ve androjen reseptörü negatif, p53 ekspresyonu bulunmayan triploide yakın karyotipe sahip bir hücre hattıdır (59). PC-3 hücre hattında, DU-145 ile karşılaştırıldığında, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun daha fazla olduğu ve bu hücre hattının sitotoksik ajanlara daha dirençli olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde; zoledronik asit uygulamasının 72. saatteki farklı konsantrasyonları değerlendirilmiş, PC-3 hücre hattı için 76 µM, DU-145 hücre hattı için ise 92,7 µM konsantrasyonları gibi IC50 değerleri elde edildiği gözlenmiştir ve bu da bu iki hücre hattının farklı genetik yapıya sahip olmalarına bağlanmıştır. Literatürde elde edilen verilerin aksine bu çalışmada PC-3 hücre hattının DU-145'e göre zoledronik asit tedavisine daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. 72. saat verileri incelendiğinde DU-145 hücre hattında 20 µM zoledronik asit ile % 88, 40 µM zoledronik asit ile % 80, 60 µM zoledronik asit ile % 72, 80 µM zoledronik asit ile % 47, 100 µM zoledronik asit ile % 43, 120 µM zoledronik asit ile % 39 canlılık gözlenmiş; PC-3 hücre hattında ise 20 µM zoledronik asit ile % 81, 40 µM zoledronik asit ile % 66, 60 µM zoledronik asit ile % 55, 80 µM zoledronik asit

ile % 49, 100 µM zoledronik asit ile % 43, 120 µM zoledronik asit ile % 39 canlılık gözlenmiştir.

Zoledronik asit uygulamasının, hücre hatları üzerindeki sitotoksositeye apoptoz aracılığı ile neden olmasının gösterilmesi için hücelere artan dozlarda zoledronik asit uygulandıktan 72 saat sonra hücrelerdeki DNA fragmantasyon yüzdeleri ve Kaspaz 3/7 aktivite değişim oranları incelenmiştir. 72. saat DNA fragmantasyon yüzdeleri incelendiğinde DU-145 hücre hattında 20 µM zoledronik asit ile % 44, 40 µM zoledronik asit ile % 52, 80 µM zoledronik asit ile % 60 ve 120 µM zoledronik asit ile % 80 DNA fragmantasyonu gözlenmiş; PC-3 hücre hattında ise 20 µM zoledronik asit ile % 64, 40 µM zoledronik asit ile % 72, 80 µM zoledronik asit ile % 80 ve 120 µM zoledronik asit ile %90 DNA fragmantasyon yüzdeleri gözlemlenmiştir. Hücre hatlarındaki 72. saat Kaspaz 3/7 aktivite değişim oranlarına bakıldığında DU-145 hücre hattında kontrol hücre hattına göre 20 µM zoledronik asit ile 2 kat, 40 µM zoledronik asit ile 3 kat, 80 µM zoledronik asit ile 4.25 kat, 120 µM zoledronik asit ile 6 kat artan Kaspaz 3/7 aktivite değişim oranı gözlemlenmiş; PC-3 hücre hattında ise 20 µM zoledronik asit ile 1.6 kat, 40 µM zoledronik asit ile 2.5 kat, 80 µM zoledronik asit ile 3 kat, 120 µM zoledronik asit ile 4.1 kat artan Kaspaz 3/7 aktivite değişim oranı gözlemlenmiştir. Bu veriler, zoledronik asitin monoterapi ile, agresif yapıdaki prostat kanseri hücre hatlarında artan dozlarda doz ile doğru orantılı olarak apoptoz aracılıklı sitotoksositeye yol açtığını göstermektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, bu veriler ile uyumlu olarak, zoledronik asit uygulamasının PC-3 ve DU-145 hücre hatları üzerinde zamana ve doza bağlı olarak artan oranda apoptoz aracılı sitotoksositeye neden olduğu gösterilmiştir (60, 61). Apoptoz sürecindeki bozukluğun karsinogenezde önemli rol oynadığı göz önüne alındığında, agresif yapıdaki bu hücre hatlarında zoledronik asitin apoptozu indüklemesi kanser tedavisi açısından önemli olmaktadır.

Anjiogenez, normal prostat dokusunun gelişmesinde fizyolojik rol oynamanın yanında prostat kanseri gelişimi ve progresyonu gibi patolojik süreçte de önemli rol oynamaktadır.

Adölesan dönemde artan androjen düzeyi prostat endotel hücre proliferasyonunu ve endotel-stroma etkileşimi aracılığı ile anjiogenik sitokin üretimini etkilemektedir. Solid tümörlerde tümör çapının 2-3 mm'ye ulaşması sonrasında yeterli oksijen desteğinin sağlanması için anjiogenez şarttır. Tümöral dokunun uyardığı anjiogenez, bu dokunun lokal büyümesini sağlamanın yanında malign hücrelerin invazyon ve metastazını da kolaylaştırmaktadır. Özellikle metastatik prostat kanserli hasta popülasyonunda standart kemoterapötik ajanların etkisiz veya yetersiz etkili oldukları göz önüne alındığında, bu hastalarda anjiogenezin hastalığın daha başlangıcında engellenmesi hastalık progresyonu açısından önem kazanmaktadır. Bu çalışmada agresif yapıdaki her iki prostat kanseri hücre hattında zoledronik asitin artan dozlar ile uygulanması sonrasında sentezlenen anjiogenik sitokin miktarları da incelendi. PC-3 hücre hattından elde edilen veriler incelendiğinde özellikle Angiogenin, IL-6, IL-8, MCP-1 ve PDGF-BB ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi. DU-145 hücre hattında ise Angiogenin, EGF, ENA-78, IL-8, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-1 ve VEGF ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı düşme gözlemlendi. Yine bu veriler de apoptoz verilerinde olduğu gibi prostat kanserinin heterojen yapısına bağlı olarak hücrelerdeki genetik farklılıklara bağlandı.

Angiogenin, 14-kDa moleküler ağırlığa sahip 123 aminoasitten oluşan bazik bir proteindir ve ilk olarak HT-29 insan kolon adenokarsinom hücrelerinden izole edilmiştir (62). Yapılan çalışmalarda angiogenin ekspresyonunun meme, serviks, kolon, kolorektal, endometriyal, gastrik, karaciğer, böbrek, over, pankreas ve prostat kanserinde arttığı gözlemlenmiştir (63). Bunların içerisinde angiogenin ekspresyonunun prostat kanserinde hastalık progresyonu ile pozitif korrelasyonunun olması da dikkat çekicidir (64). Yoshioka ve ark. yaptığı bir çalışmada PC-3 hücre hattında angiogenin down-regülasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (63). Bu çalışmada PC-3 hücre hattında 70 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte angiogenin sekresyonunda 1.37 kat azalma,

DU-145 hücre hattında ise 90 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte angiogenin sekresyonunda 1.29 kat azalma gözlenmiştir.

Embriyogenez, hücrel farklılaşma, proliferasyon ve anjiogenezde önemli rol oynayan büyüme faktörlerinden biri de EGF'dir. Yapılan çalışmalarda normal sıçan prostat dokusunda yüksek EGF seviyeleri saptanmıştır (65). De Miguel ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada metastatik prostat kanserinde EGF/EGFR ekspresyonunda artma gösterilmiştir (66). Bu ve benzeri birçok çalışmadan elde edilen verilerde, EGF sinyal iletim yolağı ile prostat kanserinin metastaza progresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (67). Bu çalışmada zoledronik asit uygulanması PC-3 hücre hatlarındaki EGF sekresyonu üzerinde anlamlı azalma sağlamazken, DU-145 hücre hattında 90 µM Zoledronik asit uygulandıktan 72 saat sonra EGF sekresyonunda 1.66 kat azalma gözlenmiştir.

Birçok immunolojik ve inflamatuvar olayda rol oynayan IL-6'nın bazı tümörlerin gelişim ve progresyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda kan IL-6 seviyesinin tedaviye dirençli metastatik hastalıkta, erken evre hastalığa göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (68). Malinowska ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada bu sitokin ile prostat kanseri progresyonu arasında anlamlı ilişki gözlenmiştir (69). Wallner ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise androjen duyarlı prostat kanserinde apoptozu indüklediği ve androjen bağımsız fenotipe dönüşümü inhibe ettiği gösterilmiştir (70). Bu çalışmada zoledronik asit uygulanması DU-145 hücre hatlarındaki IL-6 sekresyonu üzerinde anlamlı azalma sağlamazken, PC-3 hücre hattında 70 µM Zoledronik asit uygulandıktan 72 saat sonra IL-6 sekresyonunda 2 kat azalma gözlenmiştir.

MCP-1; endotel hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve keratinositlerce salgılanan IL-1 veya TNF-alfa'ya yanıt sonucu sentezlenen, monosit ve T lenfosit kemotaksisinde rol oynayan önemli bir sitokindir. Kronik inflamasyonda ekspresyonunun arttığı bilinen bu sitokin, tümördeki makrofaj infiltrasyonunun önemli bir belirleyicisidir. Yapılan çalışmalarda in vivo

ve in vitro tümör büyümesini inhibe ettiği ve değişik tümörlerde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (71). Yoshidome ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada yüksek metastatik potansiyeli olan kolorektal kanserde MCP-1 ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir (72). Bu çalışmada PC-3 hücre hattında 70 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte MCP-1 sekresyonunda 1.37 kat azalma, DU-145 hücre hattında ise 90 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte MCP-1 sekresyonunda 1.38 kat azalma gözlenmiştir.

PDGF, tirozin kinaz sinyal ileti yolağı aracılığı ile hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan peptit yapıda bir büyüme faktörüdür. Risau ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada korioallantoik membranda özellikle PDGF-BB'da daha fazla olmak üzere PDGF'nin anjiogenezi indüklediği gösterilmiştir (73). Bu çalışmada PC-3 hücre hattında 70 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte PDGF-BB sekresyonunda 1.75 kat azalma, DU-145 hücre hattında ise 90 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte PDGF-BB sekresyonunda 1.71 kat azalma gözlenmiştir.

CXC tip sitokinler tüm hücrelerde bulunmaktadır ve bu sitokinler ile anjienez arasındaki ilişki, yapılan çoğu çalışma ile gösterilmiştir. Bu moleküller, NH₂ terminalindeki ilk sistein aminoasit öncesinde "ELR" motifi (Glu-Leu-Arg) varlığına göre iki gruba ayrılmaktadırlar (74). Bu ELR motifini taşıyan (ELR-pozitif) grup anjiogenik özellik göstermektedir ve IL-8, ENA-78, growth related genes (GRO- α , GRO- β , GRO- γ) bu gruba girmektedir. GRO- α 'nın hormon refrakter prostat kanseri dahil bir çok insan kanser türünde mitojenik ve anjiogenik özellik taşıdığı bilinmektedir (74). Yapılan çalışmalarda GRO- α gibi IL-8 ve ENA-78'in de küçük hücre dışı akciğer kanseri, mide kanseri, melanom ve prostat kanserinde tümör progresyonu ve metastazında önemli rol oynadığı, anjiogenezi indüklediği gösterilmiştir (75, 76, 77, 78). IL-8 ve ENA-78 ekspresyonunun prostat kanserinde hastalığın metastatik potansiyeli ile ilişkili olduğu bilinmektedir (79, 80). Bu çalışmada PC-3 hücre hattında 70 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte IL-8 sekresyonunda 1.53 kat

azalma, DU-145 hücre hattında ise 90 µM Zoledronik asit uygulanmasını takiben 72. saatte IL-8 sekresyonunda 1.72 kat azalma gözlenmiştir. PC-3 hücre hattında zoledronik asit uygulanması sonrasında ENA-78 sekresyonunda anlamlı azalma gözlenmezken DU-145 hücre hattında uygulamanın 72. saatinde ENA-78 sekresyonunda 4.56 kat azalma gözlenmiştir.

VEGF, vasküler geçirgenlik faktörü olarak da bilinir, ilk olarak 1983 yılında Senger ve ark. tarafından tanımlanmıştır (81). VEGF geni, kromozom 6p21.3 lokalizasyonunda olup yaklaşık 14.000 bazdan oluşmaktadır. VEGF geninde 8 exon bulunmaktadır ve mRNA'nın alternatif kesilmeleri sonucu bilinen 6 izoform oluşmaktadır (VEGF-A, -B, -C, -D, -E ve PlGF). Bunlar arasında en çok çalışılanı olan VEGF-A, hem normal hem de tümör ilişkili anjiogenezde rol oynamaktadır. VEGF-A biyolojik etkisini, vasküler endotel hücre yüzey reseptörleri olan VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1) ve lenfatik sistemde bulunan VEGFR-3 ile etkileşim yoluyla göstermektedir. VEGF'in prostat karsinogenezinde, özellikle anjiogenez için, önemli olduğu bilinmektedir (82). Yapılan çalışmalarda artmış VEGF düzeylerinin, prostat kanserinde lokal-ileri ve metastatik hastalığa progresyon ile androjen direnci gelişimi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (83). Metastatik prostat kanserli hastalarda plazma VEGF düzeyinin bağımsız bir prognostik faktör olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (83, 84). VEGF ekspresyonunda önemli rol oynayan HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) ekspresyonunun benign prostat dokusu ile karşılaştırıldığında prostat kanserinde daha fazla olduğu bilinmektedir (85). Bu verilere dayanarak anjiogenez inhibisyonu, prostat kanseri tedavi stratejisinde yer edinmiştir. Rekombinan anti-VEGF antikoru olan Bevasizumab; kolorektal karsinom, metastatik meme kanseri, rekürren glioblastom ve metastatik renal hücreli karsinom tedavisinde FDA onayı almış bir biyolojik ajandır. Bir faz 2 çalışma olan CALGB 90006 çalışmasında hormon refrakter prostat kanseri olgularında dosetaksel/bevasizumab kombinasyonu tedavisi sonrasında % 42 oranında parsiyel yanıt ve % 79 oranında % 50'den fazla PSA düşüşü gözlenmiştir (86). Di Lorenzo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada daha

önce dosetaksel ile tedavi edilmiş metastatik prostat kanseri olgularında dosetaksel ve bevasizumab kombinasyonu sonrasında hastaların % 55'inde major PSA yanıtı, % 37.5'inde objektif yanıt gözlenmiştir (87). Ning YM ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 60 metastatik hormon refrakter prostat kanseri vakasına dosetaksel ve bevasizumab kombinasyonuna ek olarak oral thalidomide ve prednisone tedavisi uygulanmış; % 90 olguda ilk üç ayda % 50'den fazla PSA düşüşü gözlenmiş, ortalama progresyon süresi 18.3 ay, ortalama sürvi ise 28.2 ay olarak gözlenmiştir (88). Bunların yanında ekstraselüler ve intraselüler VEGF reseptör antagonistleri ile yapılan faz 1 ve 2 çalışmaları da devam etmektedir. Bu çalışmada PC-3 hücre hattında zoledronik asit uygulanması sonrasında VEGF sekresyonunda anlamlı azalma gözlenmezken DU-145 hücre hattında uygulamanın 72. saatinde VEGF sekresyonunda 1.76 kat azalma gözlenmiştir.

Sonuçları 2004 yılında yayınlanan çokmerkezli TAX-327 çalışmasında kemoterapi almamış 1006 erkek hasta, dosetaksel + prednison ve mitoksantron + prednison kollarına randomize edilmiş, dosetaksel ve steroid alan kolda ortalama yaşam süresinde anlamlı fark (18.9 aya karşın 16.5 ay), yüksek PSA yanıt oranı (% 45'e karşın % 32) ve daha iyi yanıt oranı (% 35'e karşın % 22) gözlemlenmiştir (89). Bu veriler eşliğinde üç haftada bir dosetaksel uygulaması ve günlük prednison uygulaması hormon refrakter prostat kanseri tedavisinde standart hale gelmiştir.

Prostat kanserli hastalar yaş ile ilişkili kemik kaybı, androjen ablasyonuna bağlı kemik kaybı ve kemik metastazları ile ilişkili osteolizis gibi sebeplerden ötürü iskelet sistemi morbiditeleri açısından risk taşımaktadırlar. Kemik metastazı olmaksızın sadece uzun dönem androjen ablasyon tedavisi, önemli kemik kaybı, osteoporoz ve artmış kırık riski ile sonuçlanmaktadır. Bu hastaların % 65 ile %75'inde hastalıklarının herhangi bir döneminde kemik metastazı gelişmektedir (90). Hastalığın kemik metastazlarına bağlı olarak gelişen artmış osteoliz, patolojik kırık, kemik ağrısı ve palyasyon amaçlı radyoterapi veya cerrahi

uygulanması; spinal kord kompresyonu ve hiperkalsemi gibi iskelet sistemi komplikasyonlarına neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda plasebo ile karşılaştırıldığında uzun dönem zoledronik asit kullanımının ileri prostat kanseri olgularında kemik komplikasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (91).

Bifosfonatların tümör-bağımlı osteoliz üzerindeki etkileri meme kanseri ve multiple myelomanın hayvan modellerinde çalışılmıştır (92, 93). Bu çalışmalarda bifosfonatların tümör-bağımlı osteolizisi etkili bir şekilde inhibe ettiği ve böylelikle kemikteki tümör büyümesini uyurabilecek kemik kaynaklı büyüme faktörlerinin salınımını azaltabileceği gösterilmiştir.

Bifosfonatların, tümörün indüklediği osteoliz üzerindeki etkilerinin yanında in vivo ve in vitro direkt anti-tümör aktivitesinin gösterildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Derenne S. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada zoledronik asitin multiple myeloma ve kemik iliği stromal hücrelerinde apoptoza yol açtığı ve aynı zamanda bu hücrelerden IL-6 ve MMP-1 sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (94). Senaratne SG. ve ark. yaptığı bir çalışmada MDA-MB-231, Hs 578T ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları ile bifosfonatların bu hücre hatlarındaki apoptotik etkileri araştırılmış ve zoledronik asitte daha güçlü olmak üzere her üç hücre hattında da apoptozu indüklediği gözlenmiştir (95).

Clyburn RD. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada zoledronik asit uygulamasının hem monoterapi hem de doksorubisin ile kombinasyon tedavisi şeklinde uygulanması ile PC-3, DU-145 ve LNCaP hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (96). 2003 yılında yayınlanan bir çalışmada zoledronik asit uygulaması sonrasında in vitro prostat kanseri hücrelerinde hücre siklusunun G1 fazında duraksama ve apoptoz gösterilmiş, in vivo kemik metastazında osteoblastik ve osteoklastik metastazların inhibe olduğu gözlenmiştir (97).

Zoledronik asitin anti-anjiyogenik özelliği ilk defa Wood ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada HUVEC hücre hattında hücre adezyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezini inhibe etmesi ile gösterilmiştir (98). Bu çalışmayı daha sonra serviks kanseri ve meme kanseri hücre

hatlarında zoledronik asitin anjiogenik sitokin ekspresyonunu azalttığını gösteren bazı çalışmalar takip etmiştir (99, 100). Yamada ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada düşük dozlarda bile zoledronik asitin endotel progenitor hücre farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (101). Santini ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada solid tümörü ve kemik metastazı olan 26 hastaya belirli aralıklar ile i.v. zoledronik asit tedavisi uygulanması sonrası kan VEGF düzeylerinde anlamlı düşüş gözlenmiştir (102). Atmaca ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise zoledronik asitin gossypol ile kombinasyonu sonrasında OVCAR-3 over kanser hücre hattında sinerjistik etki göstererek apoptozu indüklediği ve anjiogenik faktör ekspresyonunda anlamlı azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (103).

Sonuç olarak, prostat kanserinin özellikle yaşlı populasyon hastalığı olduğu bilinmektedir. Gerek bu popülasyondaki komorbid durumlar, gerekse de konvansiyonel kemoterapinin yan etki profili göz önüne alındığında daha az yan etki profiline sahip ilaçların kombinasyon tedavilerinde hem sinerjistik etkilerinin hem de yan etki profili geniş olan kemoterapötiklerin kümülatif dozunu azaltıcı etkileri, bu hastalarda daha etkili yeni tedavi protokolleri geliştirilmesinde önemli olacaktır. Yan etki profili göz önüne alındığında zoledronik asitin standart kemoterapötik ajanlara nazaran daha iyi tolere edildiği bilinmektedir (104). Bu çalışmada anti-resorptif bir ajan olan zoledronik asitin, hormon-refrakter prostat kanseri hücre hatlarında in vitro monoterapi ile, artan dozlar ile doğru orantılı olarak, apoptozu indüklediği ve bu hücre hatlarıncı sentezlenen anjiogenik sitokin düzeylerinde anlamlı düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir. Bu anjiogenik sitokinlerin prostat karsinogenezinin birçok basamağında rol oynadığı da göz önüne alındığında, daha sonra yapılacak olan prelinik ve klinik çalışmalar ile zoledronik asitin sadece komplikasyon tedavisinde değil, prostat kanseri tedavisinde monoterapi veya kombinasyon tedavilerinde de yer alması muhtemeldir.

VI- KAYNAKLAR

1. Global Cancer Facts and Figures 2007; http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Global_Cancer_Facts_and_Figures_2007.asp
2. Yardım N, Mollahaliloğlu S, Çakır E. Evaluation of Turkey Ministry of Health 1983-2001 cancer incidences and cancer death rates in the Burden of Disease Study data. Turkish Journal of Cancer. 2007, Volume 37, Number 4, Page(s) 148-153
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2010. <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010>
4. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2002;52:23-47.
5. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate Cancer. N Engl J Med. 2003 Jul 24;349(4):366-81. Review.
6. Damber JE, Aus G. Prostate cancer. Lancet. 2008 May 17;371(9625):1710-21. Review.
7. Etminan M, Takkouche B, Caamano-Isorna F. The role of tomato products and lycopenes in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004; 13: 340–45.
8. Friedenreich CM. Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Apr;10(4):287-301.
9. Abraham J, Allegra C, Gulley J. Bethesda Handbook of Clinical Oncology, 2005, 2 nd edition, 185.
10. Aus G, Abbou CC, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol 2005; 48: 546–51.
11. Frydenberg M, Stricker PD, Kaye KW. Prostate cancer diagnosis and management. Lancet. 1997 Jun 7;349(9066):1681-7. Review.

12. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *NEJM* 2005;351:1513-20
13. Charlesworth PJ, Harris AL. Mechanisms of disease: angiogenesis in urologic malignancies. *Nat Clin Pract Urol*. 2006 Mar;3(3):157-69. Review.
14. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):38-47.
15. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76
16. Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *Eur J Intern Med*. 2009 Nov;20(7):663-71. Epub 2009 Aug 27.
17. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273:30336-43
18. Yancopoulos GD, Klagsbrun J, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998;93(5):661-4
19. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(19):7311-5
20. Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciaq T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *L Cell Biol* 1985;101:2330-4
21. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Moeller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggests FLK-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72(6):719-25
22. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008;22:1276-312

23. Yang XP, Pei ZH, Ren J. Making up or breaking up – the tortuous role of platelet-derived growth factor (PDGF) in vascular aging. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009 Aug;36(8):739-47.
24. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):653-60. Review.
25. Kirsch M, Strasser J, Allende R, Bello L, Zhang J, Black PM. Angiogenesis suppresses malignant glioma growth in vivo. *Cancer Res* 1998;58:4654-9
26. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003;22:6549-56
27. Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski GP. The role of thrombospondin-1 in tumour progression. *Exp Biol Med (maywood)* 2001;226:726-33
28. Morre M et al. (1998). Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Cancer* 78:940-944
29. Bono AV et al. (2002) Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5:123-127
30. Borre M et al. (2000) Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Clin Cancer Res* 6:1882-1890
31. Kuniyasu H et al (2000). Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ confined from pathologically advanced prostate cancers. *Clin Cancer Res* 6:2295-2308
32. Duque JL et al. (1999) Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 54:523-527
33. Quinn DI et al. (2005) Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 41:858-887

34. Mazzucchelli R et al. (2000) Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients. *Prostate* 45:72-79
35. Meyer GE et al. (1995) Serum basic fibroblast growth factor in men with and without prostate carcinoma. *Cancer* 76:2304-2311
36. Murphy C et al. (2005) Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11:4117-4127
37. Lehrer S et al. (2004) Serum interleukin-8 is elevated in men with prostate cancer and bone metastases. *Technol Cancer Res Treat* 3:411
38. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Edition, 2005
39. Hughes DE, Wright KR, Uy HI, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10:1478-87
40. Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 2001;28:465-73
41. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Design* 2003;9(32):2643-58
42. Benford HL, Frith JC, Auriola S, Monkkonen J, Rogers MJ. Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspase by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* 1999;56:131-40
43. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296 (2):235-42

44. Ramnath N, Creaven P. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2004;6(2):96-102.
45. Mönkkönen H, Lehenkari PP, Kellinsalmi M, et al. A new mechanism of action for bisphosphonates: appi dedicated cytotoxicity of N-BPs. *Bone* 2004;34 (Suppl 1): S66-7.
46. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:2893-7.
47. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 2002;62(22):6538-44
48. Giraud E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 2004;114:623-33.
49. Ferretti G, Fabi A, Carlini P, Papaldo P, Felici A, Tomao S, Cognetti F. Zoledronic acid and angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 15;13(22 Pt 1):6850
50. Bree RT, Stenson-Cox C, Grealy M, Byrnes L, Gorman AM, Samali A. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology*. 2002;3:195-206.
51. Fulda S, Debatin KM. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann N Y Acad Sci*.2004;1028: 150-156.
52. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*. 2005;258:479-517.
53. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004;19: 124-128.
54. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
55. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):231-41.
56. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312-1316.

57. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005; 115:2665-2672.
58. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 1978 Mar 15;21(3):274-81.
59. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979 Jul;17(1):16-23.
60. Karabulut B, Erten C, Gul MK, Cengiz E, Karaca B, Kucukzeybek Y, Gorumlu G, Atmaca H, Uzunoglu S, Sanli UA, Baran Y, Uslu R. Docetaxel/zoledronic acid combination triggers apoptosis synergistically through downregulating antiapoptotic Bcl-2 protein level in hormone-refractory prostate cancer cells. *Cell Biol Int.* 2009 Feb;33(2):239-46. Epub 2008 Dec 11.
61. Karabulut B, Karaca B, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Sezgin C, Uslu R. Regulation of apoptosis-related molecules by synergistic combination of all-trans retinoic acid and zoledronic acid in hormone-refractory prostate cancer cell lines. *Mol Biol Rep.* 2010 Mar 28.
62. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL. *Biochemistry* (1985);24:5480-5486.
63. Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, Tsuji T, Hu GF. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 26;103(39):14519-24. Epub 2006 Sep 13.
64. Katona TM, Neubauer BL, Iversen PW, Zhang S, Baldrige LA, Cheng L. Elevated expression of angiogenin in prostate cancer and its precursors. *Clin Cancer Res.* 2005 Dec 1;11(23):8358-63.
65. Tørring N, Jørgensen PE, Poulsen SS, Nexø E. Epidermal growth factor in the rat prostate: production, tissue content and molecular forms in the different prostatic lobes. *Prostate.* 1998 Apr 1;35(1):35-42.

66. De Miguel P, Royuela, Bethencourt R, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R. Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates. *Cytokine*. 1999 Sep;11(9):722-7.
67. Uysal-Onganer P, Djamgoz MB. Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel. *Mol Cancer*. 2007 Nov 24;6:76.
68. Twillie DA, Eisenberger MA, Carducci MA, Hseih WS, Kim WY, Simons JW. Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology*. 1995 Mar;45(3):542-9.
69. Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, Moser PL, Fuchs D, Hobisch A, Culig Z. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Mar;16(1):155-69. Epub 2008 Nov 14.
70. Wallner L, Dai J, Escara-Wilke J, Zhang J, Yao Z, Lu Y, Trikha M, Nemeth JA, Zaki MH, Keller ET. Inhibition of interleukin-6 with CNTO328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, inhibits conversion of androgen-dependent prostate cancer to an androgen-independent phenotype in orchiectomized mice. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):3087-95.
71. Graves DT, Jiang YL, Williamson MJ, Valente AJ. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science*. 1989 Sep 29;245(4925):1490-3.
72. Yoshidome H, Kohno H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Nakatani Y, Miyazaki M. Significance of monocyte chemoattractant protein-1 in angiogenesis and survival in colorectal liver metastases. *Int J Oncol*. 2009 Apr;34(4):923-30.
73. Risau W, Drexler H, Mironov V, Smits A, Siegbahn A, Funa K, Heldin CH. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors*. 1992;7(4):261-6.

74. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995 Nov 10;270(45):27348-57.
75. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Morris SB, Xue YY, Burdick MD, Glass MC, Iannettoni MD, Strieter RM. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J Clin Invest.* 1998 Aug 1;102(3):465-72.
76. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, Yasui W, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol.* 1998 Jan;152(1):93-100.
77. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, Richmond A. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol.* 1997 Nov;62(5):588-97.
78. Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, Glass M, Wilke C, Xue YY, Sitterding S, Kunkel SL, Burdick MD, Strieter RM. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol.* 1999 May;154(5):1503-12.
79. Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettaway CA, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):2104-19.
80. Begley LA, Kasina S, Mehra R, Adsule S, Admon AJ, Lonigro RJ, Chinnaiyan AM, Macoska JA. CXCL5 promotes prostate cancer progression. *Neoplasia.* 2008 Mar;10(3):244-54.
81. Nicholson B, Schaefer G, Theodorescu D. Angiogenesis in prostate cancer: biology and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20(3-4):297-319.
82. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med.* 2003 Nov;3(7):643-51.

83. George DJ, Halabi S, Shepard TF, Vogelzang NJ, Hayes DF, Small EJ, Kantoff PW; Cancer and Leukemia Group B 9480. Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):1932-6.
84. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL, Cohen JK, Miller R, Saad RS. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2007 Apr;127(4):572-9.
85. Du Z, Fujiyama C, Chen Y, Masaki Z. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in human normal, benign, and malignant prostate tissue. *Chin Med J (Engl)*. 2003 Dec;116(12):1936-9.
86. Picus J. Docetaxel/bevacizumab (avastin) in prostate cancer [abstract #46]. *Cancer Invest* 2004;22(Suppl 1):60
87. Di Lorenzo G, Figg WD, Fossa SD, Mirone V, Autorino R, Longo N, Imbimbo C, Perdonà S, Giordano A, Giuliano M, Labianca R, De Placido S. Combination of bevacizumab and docetaxel in docetaxel-pretreated hormone-refractory prostate cancer: a phase 2 study. *Eur Urol*. 2008 Nov;54(5):1089-94. Epub 2008 Feb 5.
88. Ning YM, Gulley JL, Arlen PM, Woo S, Steinberg SM, Wright JJ, Parnes HL, Trepel JB, Lee MJ, Kim YS, Sun H, Madan RA, Latham L, Jones E, Chen CC, Figg WD, Dahut WL. Phase II trial of bevacizumab, thalidomide, docetaxel, and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 20;28(12):2070-6. Epub 2010 Mar 22.
89. Tannock, IF, de Wit, R, Berry, WR, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:1502.
90. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001;27:165-76.
91. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, et al. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:879-82.

92. Green J, Gscheidmeier H, Yoneda T, Mundy G. Zoledronic acid potentially inhibits tumour-induced osteolysis in two models of breast cancer metastasis to bone [abstract]. *Ann Oncol* 2000;11 Suppl 4:14
93. Croucher PI, De Raeve H, Perry MJ, Hijzen A, Shipman C, Lippitt J, et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumour burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Miner Res* 2003;18:482-92.
94. Derenne S, Amiot M, Barillé S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, Harousseau JL, Bataille R. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res*. 1999 Dec;14(12):2048-56.
95. Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2000 Apr;82(8):1459-68.
96. Clyburn RD, Reid P, Evans CA, Lefley DV, Holen I. Increased anti-tumour effects of doxorubicin and zoledronic acid in prostate cancer cells in vitro: supporting the benefits of combination therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Apr;65(5):969-78.
97. Corey E, Brown LG, Quinn JE, Poot M, Roudier MP, Higano CS, Vessella RL. Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Jan;9(1):295-306.
98. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Sep;302(3):1055-61.
99. Giraudo E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest*. 2004 Sep;114(5):623-33.
100. Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, La Cesa A, Grilli C, Virzì V, Gasparro S, Rocci L, Tonini G. Zoledronic acid-related angiogenesis modifications and survival in advanced breast cancer patients. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Mar;25(3):144-51.

101. Yamada J, Tsuno NH, Kitayama J, Tsuchiya T, Yoneyama S, Asakage M, Okaji Y, Shuno Y, Nishikawa T, Tanaka J, Takahashi K, Nagawa H. Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. *J Surg Res.* 2009 Jan;151(1):115-20. Epub 2008 Feb 29.
102. Santini D, Vincenzi B, Galluzzo S, Battistoni F, Rocci L, Venditti O, Schiavon G, Angeletti S, Uzzalli F, Caraglia M, Dicuonzo G, Tonini G. Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4482-6.
103. Atmaca H, Gorumlu G, Karaca B, Degirmenci M, Tunali D, Cirak Y, Purcu DU, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R. Combined gossypol and zoledronic acid treatment results in synergistic induction of cell death and regulates angiogenic molecules in ovarian cancer cells. *Eur Cytokine Netw.* 2009 Sep;20(3):121-30.
104. Doggrell SA. Clinical efficacy and safety of zoledronic acid in prostate and breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009 Sep;9(9):1211-8.