T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NARİNGENİN'İN SIÇAN PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ: HÜCRE KİNETİKLERİ VE MİGRASYON

Tuba AKGÜN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2017

T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NARİNGENİN'İN SIÇAN PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ: HÜCRE KİNETİKLERİ VE MİGRASYON

Tuba AKGÜN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2017

Yrd. Doç. Dr. Hatice AKTAŞ'ın danışmanlığında, Tuba AKGÜN'ün hazırladığı **"Naringenin'in sıçan prostat kanser hücreleri üzerine etkisi: Hücre kinetikleri ve Migrasyon"** konulu bu çalışma 23/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Hatice AKTAŞ .....

Üye : Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ .....

Üye : Prof. Dr. Seyhan ALTUN .....

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. H. Murat ALGIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 15032

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ 1
1.GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1 Kanser 4
2.1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri 5
2.1.1.1. Sürekli proliferasyon sinyali 5
2.1.1.2. Büyümeyi baskılayıcı faktörlerden kaçma 6
2.1.1.3. Konakçı bağışıklık tepkisinden kaçma becerisi 6
2.1.1.4. Hücre ölümüne karşı direnme 6
2.1.1.5. İnvazyon ve metastaz aktivitesi 7
2.1.1.6. İndükleyici anjiogenez 7
2.1.1.7. Sınırsız replikasyon potansiyeli 8
2.1.1.8. Değişen hücresel metabolizma 8
2.1.2. Prostat kanseri 8
2.1.2.1. Prostat 8
2.1.2.2. Prostat kanserinin epidemiyolojisi 9
2.1.2.3. Prostat kanserinin belirtileri, tanı ve tedavi yaklaşımları 11
2.2. Metastaz 11
2.2.1. İyon kanallarının metastatik süreçteki rolü 13
2.2.1.1. Voltaj kapılı sodyum kanalları 14
2.2.1.2. CELEX hipotezi 16
2.3. Metastatik Prostat Kanser Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Modeller 17
2.3.1. Dunning modeli 17
2.4. İyon Kanallarını Bloklayan Bazı Ajanlar 18
2.4.1. Bazı nörotoksinler ve lokal anestetikler 18
2.4.2. Tetrodotoksin (TTX) 20
2.4.3. Doğal bileşikler 21
2.4.3.1. Naringenin 23
3. MATERYAL ve YÖNTEM 27
3.1. Materyal 27
3.2. Yöntem 28
3.2.1. Hücre kültürü 28
3.2.2. Mediumların hazırlanması 28
3.2.2.1. Deney mediumu (naringenin) 28
3.2.2.2. Kontrol mediumları 29
3.2.3. Toksisite 29
3.2.4. Hücre kinetiği parametreleri 30
3.2.4.1. Hücre proliferasyonu 30
3.2.4.2. Mitoz indeksi 30
3.2.5. Hücre hareketi analizleri 31
3.2.5.1. Yara kapanma yöntemi 31
3.2.5.2. Transwell invazyon analizi 32
3.3. İstatistiksel Değerlendirme 33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 34
4.1.Toksisite 34
4.2. Hücre Kinetiği Üzerindeki Etkiler 35

4.2.1. Proliferasyon....35
4.2.2. Mitoz indeksi....40
4.3. Hücre Hareketi Üzerindeki Etkiler....43
4.3.1. Migrasyon (yara kapanma analizi)....43
4.3.2. İnvazyon....46
5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER....51
KAYNAKLAR....53
ÖZGEÇMİŞ....66

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NARİNGENİN'İN SIÇAN PROSTAT KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ: HÜCRE KİNETİKLERİ VE MİGRASYON

Tuba AKGÜN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hatice AKTAŞ
Yıl:2017, Sayfa:67

Prostat kanseri erkeklerde görülme sıklığı oldukça yüksek bir kanser türüdür. Prostat kanserinin tedavisinde karşılaşılan en büyük sorun metastazlardır. Kanser türleri farklı olsa dahi tüm kanserlerdeki metastatik süreç benzer olduğu için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi mümkündür. Prostat kanserinin gelişimi, ilerlemesi ve metastatik sürecinde voltaj kapılı sodyum kanallarının oldukça önemli rollere sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur. Bu çalışmada, doğal bir bileşik olan naringeninin, Dunning modeli yüksek metastatik özellik gösteren sıçan prostat kanser hücresi MAT-LyLu hücrelerinin kinetik özellikleri (proliferasyon, mitotik aktivite) ile lateral ve vertikal yönlere hareket (migrasyon ve invazyon) yetenekleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Spesifik bir voltaj kapılı sodyum kanalı bloklayıcısı olan Tetrodotoksin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MAT-LyLu hücrelerine toksik etki yapmayan konsantrasyonlardaki naringenin ile proliferasyon ve mitoz indeksi deneyleri gerçekleştirilerek hücre kinetikleri üzerindeki sonuçlar irdelenmiştir. Hücre proliferasyonunu etkilemeyen konsantrasyonlarda naringenin kullanılarak migrasyon ve invazyon deneyleri yapılmış ve bileşiğin hücre hareketleri üzerinde nasıl bir etkisi olduğu araştırılmıştır. Bulgularımız, naringeninin yüksek konsantrasyonda hücre proliferasyon ve mitoz indeksi üzerinde inhibe edici etki yapabileceğini ortaya çıkarmıştır., Hücre proliferasyonu üzerinde etki yapmayan düşük konsantrasyonlardaki (5 ve 10 μM) naringenin, VGSC ekspresyonu yapan yüksek metastatik özellikteki MAT-LyLu hücrelerinin lateral ve vertikal yönlere hareketlerini baskılamıştır. Sonuç olarak, naringenin, MAT-LyLu hücreleri üzerinde hem antiproliferatif hem de antimetastatik aktiviteler bakımından ileri moleküler tekniklerle değerlendirilmeye aday bir bileşiktir.

ANAHTAR KELİMELER: Prostat kanser hücreleri, naringenin, invazyon, migrasyon, antiproliferatif etki

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECT OF NARINGENIN ON RAT PROSTATE CANCER CELLS: CELL KINETICS AND MIGRATION

Tuba AKGÜN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hatice AKTAŞ
Year: 2017, Page: 67

Prostate cancer is the most common type at cancer in men. Metastasis is the most important problem in the treatment of prostate cancer. It is possible to develop new treatment strategies because the metastatic process is similar in all cancers, even if the cancer types are different. Recent studies have shown that voltage-gated sodium channels play an important role in the development, progresion and metastasis of prostate cancer. The aim of the study is to determine the effects of naringenin, a natural compound, on kinetic properties (proliferation and mitotic activities) and ability of lateral and vertical motility (migration and invasion) of MAT-LyLu rat prostate cancer cells which shows high metastatic properties (Dunning model). Tetrodotoxin, a specific voltage-gated sodium channel blocker, was used as a positive control. The proliferation and mitotic index experiments were performed by using naringenin at nontoxic concentration to determine kinetic effects of naringenin on MAT-LyLu cells. The migration and invasion experiments were performed by using naringenin at uneffective concentration on cell proliferation to determine effects of naringenin on motility of MAT-LyLu cells. Our findings suggest that naringenin have inhibitory effects on the proliferation and mitotic indexes of MAT-LyLu cells at high concentrations. Naringenin, at doses not effecting cell proliferation (5 and 10 µM) supressed lateral and vertical movements of MAT-LyLu cells which express voltage-gated sodium channels and have a high metastatic character. As a result, we believe that naringenin is a candidate for advanced molecular assays in terms at antiproliferative and antimetastatic activites on MAT-LyLu cells.

KEY WORDS: Prostate cancer cells naringenin, invasion, migration, antiproliferative effect

TEŞEKKÜR

Başarmak, öğrenmek ve hayallerimi gerçekleştirmek için çıktığım bu yolda doğru adımlar atmamda yardımlarını esirgemeyen zor zamanlarımda yanımda olan, her konuda destek veren, başarabileceğime inanan ve beni inandıran değerli danışmanım Yrd. Doç.Dr. Hatice AKTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kısa süreliğine de olsa çalışma fırsatı bulduğum İstanbul Üniversitesi'nde görev yapan Dr. İlknur BUGAN'a, hücrelerimizin temininde yardımcı olan Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a, sadece başarılarıyla değil hayata bakış açısıyla da örnek aldığım, sorduğum hiçbir soruyu cevapsız bırakmayan sayın hocam Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ'e, her konuda yardımlarını esirgemeyen Biyoloji Bölüm hocalarıma ve benimle aynı yolda yürüyen ekip arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

"Bir şey olsun istiyorsan bir şey yap! Ama gerçekten ne istediğine karar ver" diyerek beni sürekli motive eden, beni bu günlere getiren, maddi manevi her anlamda bana destek olan babam Ali AKGÜN, annem Hatice AKGÜN'e, hayattaki en değerli varlığım anneannem Zeynep ZABUN'a, bana benden daha çok inanıp varlıklarından güç bulduğum ablalarım Ayşegül AKGÜN ve Zekiye ACEMOĞLU'na, hayattaki en büyük şansım olduklarına inandığım kardeşlerim İbrahim ve Nevzat AKGÜN'e teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.2. Kanserin ayırıcı özellikleri. 4
Şekil 2.2. Kanserin ayırıcı özellikleri. 5
Şekil 2.3. Prostat bezinin konumu ve bölgesel anatomisi 9
Şekil 2.4. Prostat kanserinde coğrafik farklılıklar 10
Şekil 2.5. Metastatik süreç 12
Şekil 2.6. Voltaj kapılı sodyum kanalının yapısı 15
Şekil 2.7.CELEX hipotezine göre kanser gelişimi sırasında voltaj kapılı iyon kanal ekspresyonlarının dinamik davranışını gösteren diyagram 16
Şekil 2.8. Dunning sıçan prostat kanser modelinin gelişim şeması 18
Şekil 2.9. Bilinen bazı nörotoksinlerin VGSC üzerindeki bağlanma bölgeleri 19
Şekil 2.10.Tetraodontidae familyasına ait bir balık 20
Şekil 2.11.Voltaj kapılı sodyum kanalının α altünitesi ve tetrodotoksin bağlanma bölgesinin şematik gösterimi. 21
Şekil 2.12. Naringeninin kimyasal formülü 24
Şekil 2.13. Naringeninin izole edilebildiği meyveler: Greyfurt, limon, mandalina, portakal 24
Şekil 3.1. *İn vitro* olarak çoğaltılan MAT-LyLu hücreleri. 28
Şekil 3.2. Lateral hücre hareketini belirleyebilmek için kullanılan petrinin tabanına yapılan çizim 32
Şekil 3.3. Pleyt kuyucukları içerisine insertlerin yerleştirilmesi 33
Şekil 4.1. Toksisite grafiği: Deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonlardaki naringeninin MAT-LyLu hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri. 34
Şekil 4.2.MAT-LyLu hücreleri üzerine Naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen normalize edilmiş hücre sayılarının zamana bağlı grafiği 36
Şekil 4.3.MAT-LyLu hücreleri üzerine naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen normalize edilmiş hücre sayılarının konsantrasyona bağlı grafiği 37
Şekil 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda 48 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen inhibisyon oranları.). 37
Şekil 4.5. MAT-LyLu hücrelerinde mitoz bölünme 40
Şekil 4.6. Mat-LyLu hücreleri üzerine naringenin maddesinin uygulanması sonucunda elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri. 42
Şekil 4.7. MAT-LyLu hücrelerinde hücre hareketi A) 0. saatte (W_0), B) 24. saatte (W_t) ve C) 48. saatte (W_t) ölçülen yara genişlikleri. 44
Şekil 4.8.MAT-LyLu hücreleri üzerine Narigenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksleri (MoI) 46
Şekil 4.9. Normal büyüme mediumu uygulanmış grupta (Kontrol) invaze olmuş MAT-LyLu hücreleri 47
Şekil 4.10.MAT-LyLu hücreleri üzerine naringeninin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu tespit edilen invazif hücre sayısı. 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1.MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda naringenin uygulaması sonucu elde edilen normalize edilen hücre sayıları ve inhibisyon oranları (%). 36
Çizelge 4.2.MAT-LyLu hücreleri üzerine naringeninin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH).....41
Çizelge 4.3.MAT-LyLu hücreleri üzerine Naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (±SH) değerleri ve kontrol grubuna oranla deney gruplarının motilite indekslerinde tespit edilen % değişim oranları.....45
Çizelge 4.4.MAT-LyLu hücreleri üzerine Naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen invaze olmuş hücre sayıları (±SH) ile kontrol ve KD gruplarına oranla deney gruplarının motilite indekslerinde tespit edilen % değişim oranları. 48

SİMGELER DİZİNİ

BAX	Bcl-2-associated X protein
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
Da	Dalton
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	Ekstraselüler Matriks
FBS	Fötal Dana Serumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
HCI	Hidroklorik Asit
KD	Kontrol Dimetil Sülfoksit
kDa	Kilo Dalton
MMS	Merkezi Sinir Sistemi
MMP	Matriks Metalloproteaz
MTT	Methylthiazolydiphenly-Tetrazolium Bromide
mV	Mili Volt
N	Naringenin
P53	Tümör Protein 53
PBS	Fosfat Tamponu
PKA	Protein Kinaz A
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PTK	Protein Tirozin Kinaz
RB	Retinoblastoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TNF	Tümör Nekroze Edici Faktör
TRUS	Transrektal Ultrasonografi
TSP-1	Trombospondin-1
TTX	Tetrodotoksin
TTX-R	Tetrodotoksine dirençli
TTX-S	Tetrodotoksine hassas
VEGF-A	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör-A
VGPC	Voltaj Kapılı Potasyum Kanalı
VGSC	Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı
W_0	0. Saatteki yara genişliği
W_t	24. ve 48. saatteki yara genişlikleri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1.GİRİŞ

Kanser, dünyadaki ölüm oranının yaklaşık % 14,6'sını oluşturmaktadır (Gao ve ark., 2015). Kanserde karşılaşılan en büyük sorunlardan biri metastazlardır (Cavallaro ve Christofori, 2004; Berx ve Roy, 2009). Bir kanser hücresinin göçü, ekstraselüler matriks ve hücre iskeleti arasındaki etkileşime bağlı bir süreçtir (Makale, 2007).

İyon kanalları, hücre fizyolojisinde ve kanser patofizyolojisinde merkezi bir rol oynadıkları için dikkat çekici özelliğe sahiptirler (Djamgoz ve Onkal, 2013). Hücrelerin büyümesi, farklılaşması, pH düzenlenmesi, gen ekspresyonu, kontrollü hücre ölümü gibi birçok hücresel davranışın düzenlenmesinin yanı sıra kanserin metastatik sürecinde de iyon kanallarının aktif bir şekilde rol oynadıkları bildirilmiştir (Kunzelman, 2016). Yapılan çalışmalar sonucunda prostat (Laniado ve ark., 1997), meme (Roger ve ark., 2003; Fraser ve ark., 2005) kolon (House ve ark., 2010), over (Gao ve ark., 2010) gibi birçok kanser hücre soyunun voltaj kapılı sodyum kanal (VGSC) proteinini eksprese ettiği gösterilmiştir. VGSC proteini glikozillenmiş bir membran proteini olup milisaniyeler içerisinde membran depolarizasyonuna bağlı olarak hücre içine Na^+ akışını sağlar (Nelson ve ark., 2014). Dunning modeli sıçan prostat kanser hücre soyu olan MAT-LyLu hücrelerinin yüksek metastatik özellikte olduğu (Isaacs ve ark., 1986) ve bu hücrelerin VGSC'leri eksprese ettiği tespit edilmiştir (Diss ve ark., 2001; Djamgoz ve ark., 2001). VGSC ekspresyonunun arttığı durumlarda kanserin agresifleştiği görülmüştür (Bockman ve ark., 2001).

Tetrodotoksin (TTX), Tetraodontidae familyasına ait pek çok balık türü ile çeşitli deniz canlıları ve bazı karasal hayvanlardan elde edilen güçlü bir nörotoksindir (Narahashi, 2008). TTX'in ağrı giderici bir etkiye sahip olduğu sıçan ve fareler üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde kanıtlanmıştır (Marcil ve ark., 2006). Ayrıca TTX, VGSC membranının dış yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak sodyum akımını bloke ettiği bildirilmiştir. TTX, saniyenin onda biri kadar sürede kanala bağlanır.

Burada sabit bir şekilde kalarak sodyumun kanaldan girişini engeller ve sodyum akımının durdurulmasını sağlar (Cestele ve Catteral, 2000). Kanser hücrelerinin metastatik aktivitesinin VGSC proteinlerinin artan düzenlenmesi ile kolaylaştığı ve bu kanal proteinlerini bloke edebilecek bileşiklerin anti-metastatik aktiviteye sahip olabileceği CELEX (Hücresel Uyarılma) hipotezi ile açıklanmaktadır (Djamgoz, 2014). Kanser ve metastatik sürecin gelişiminde iyon kanallarının rolünün ortaya konması, iyon kanallarını kanser için önemli bir tedavi hedefi haline getirmiştir (Hoang ve ark., 2006).

Doğal bileşikler kanserde önemli bir rol oynamaktadır (Wayne ve ark., 2006). Kanserde doğal diyet takviyelerinin kullanımı popüler hale gelmiştir. Bunun nedeni uygun dozlarda verildiğinde herhangi bir toksik etki gözlenmemesidir (Havsteen, 1983). Çin ve Japonya'daki pek çok kanser hastalığının tedavisinin doğal diyetle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sarkar ve Li, 2003). Fenolik maddeler bitkilerin metabolizmalarında üretilen sekonder metabolitler olup fenolik maddelerin bir grubunu oluşturan flavonoidlerin (Saldamlı, 1998), antioksidan (Pietta, 2000), antibakteriyel (Cushnie ve Lamb, 2005), anti- enflamatuar (Pan ve ark., 2010), karaciğeri koruyucu (Zhu ve ark., 2012) ve anti-kanser (Ravishankar ve ark., 2013) özellikleri olduğu bilinmektedir. Naringenin (4',5,7-trihidroksi-flavanon-7-ramnoglukozit), genellikle greyfurt, limon, mandalina ve portakalda yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir (Lee ve ark., 2001). Şimdiye dek yapılan çalışmalarla naringenin ile bazı sentetik türevlerinin antiproliferatif (Harmon ve Patel, 2004; Totta ve ark., 2004; Frydoonfar ve ark., 2005; Ekambaram ve ark., 2008; Yoon ve ark., 2013; Filho ve ark., 2014; Liao ve ark.,2014; Li ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015; Chu ve ark., 2016), hücre siklusunu durdurucu (Sabarinathan ve ark., 2011; Lee ve ark., 2012), apoptotik (Bak ve ark., 2016; Song ve ark.,2016), migrasyonu ve invazyonu engelleyici (Du ve ark., 2009; Lou ve ark., 2012; Filho ve ark., 2014; Liao ve ark., 2014) etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, naringeninin Dunning modeli MAT-LyLu sıçan prostat kanser hücrelerinin kinetik parametreleri (proliferasyon, mitoz indeksi) ve hücre hareketi (migrasyon, invazyon) üzerinde inhibe edici etkiye sahip olup olmadığının

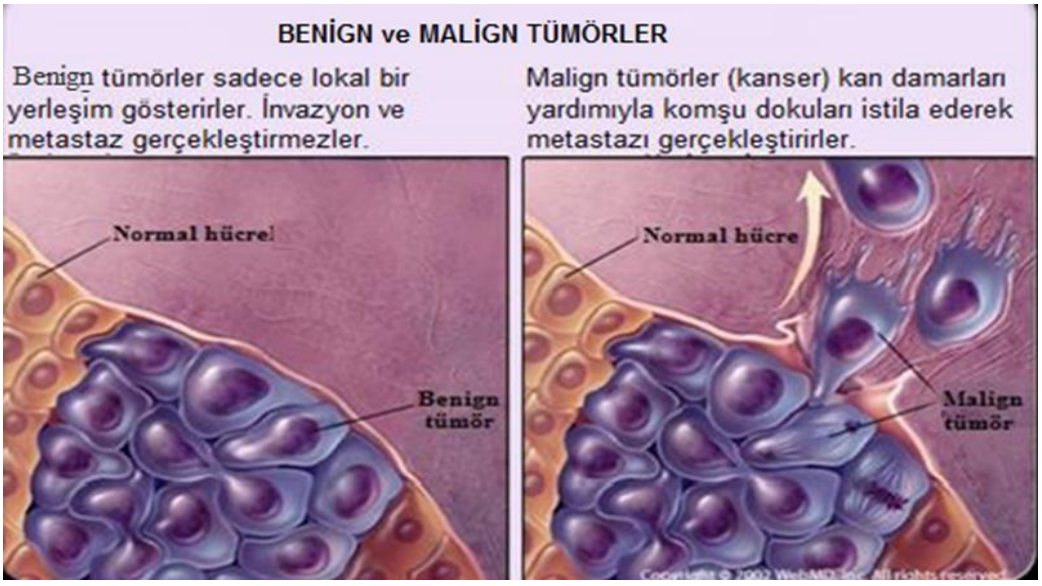
araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda elde edilecek bulgularla, literatürde bir kalsiyum ve bir potasyum kanalı üzerinde bloklayıcı veya açıcı etkilere sahip olduğu bildirilen (Saponara ve ark., 2006; Saponara ve ark., 2011) doğal bileşik naringeninin, VGSC'ler üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu hedefe ulaşabilmek için VGSC'leri eksprese eden Dunning modeli MAT-LyLu sıçan prostat kanser hücreleri kullanılmıştır. Çalışmada aynı zamanda naringeninin, MAT-LyLu hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri de *in vitro* olarak araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser

Kanser, vücudun herhangi bir bölgesinde meydana gelen, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla karakterize edilen ve çoğunlukla metastazın gerçekleştiği hastalık grubudur (King ve ark., 2006).

Tümör, organizmada kontrol sistemine bağlı olmadan gelişme, çoğalma ve büyüme sonucunda meydana gelir. Tümörler benign ve malign tümörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Benign (iyi huylu=selim) tümör hücreleri yavaş bir büyüme gösterirler, bulundukları bölgede lokal olarak yayılırlar ve metastaz yapmazlar. Malign (kötü huylu=habis) tümörler genellikle hızlı bir büyüme gösterirler. Kan ve lenf damarlarına girerek uzakta bulunan dokulara göç ederler ve sekonder tümörleri oluştururlar. Bu tümörler kanser olarak kabul edilirler (Yenerman, 1994) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Benign ve malign tümörler (Davis, 2016)

2.1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri

Kanser, kompleks bir patofizyolojiye sahiptir. Kanser hücrelerinin sekiz ayırıcı özelliği vardır (Şekil 2.2.) (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.2. Kanserin ayırıcı özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

2.1.1.1. Sürekli proliferasyon sinyali

Normal hücrelerde bölünme ve çoğalma kontrollü bir şekilde ilerler. Kanser hücrelerinin en temel özelliği ise kontrolsüz bir şekilde sürekli çoğalmalarıdır (Hanahan ve Weinberg, 2000); çünkü kanser hücrelerinde devamlı bir mitojenik sinyal söz konusudur ve bu sinyal kanser hücrelerinin sürekli bölünmesine sebeptir (Perona, 2006; Hynes ve MacDonald, 2009; Lemmon ve Schlessinger, 2010; Witsch ve ark., 2010). Kanser hücreleri otokrin uyarıyla bölünme devamlılığını sağlarlar (Bhowmick ve ark., 2004; Cheng ve ark., 2008).

2.1.1.2. Büyümeyi baskılayıcı faktörlerden kaçma

Kanser hücrelerinin sürekli olarak çoğalmasını etkileyen bazı faktörler vardır. Bu durum tümör baskılayıcı genlerin aktivitesine bağlıdır. Örneğin; Retinoblastoma (RB) ve P53 genleri büyümeyi baskılayan genlerdir (Hanahan ve Weinberg, 2000). RB, hücre siklusunda hücrenin bölünmesine devam edip etmeyeceğine karar veren bir gendir (Deshpande ve ark., 2005; Burkhart ve Sage, 2008; Sherr ve McCormick, 2002). RB genindeki fonksiyonel bozukluk kanser hücrelerinin apoptoza gidememesine ve sürekli çoğalmasına neden olur (Hanahan ve Weinberg, 2000).

2.1.1.3. Konakçı bağışıklık tepkisinden kaçma becerisi

Doğal ve adaptif bağışıklık sistemi, hücrelerin anormal antijen sergileyen hücreleri tanıyıp ortadan kaldırabilmesidir. Kanser hücreleri, konak immün cevabın ortadan kaldırır ve bunun sonucunda kanser hücreleri yaşamlarına devam ederek sürekli çoğalma eğilimi gösterirler (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.1.1.4. Hücre ölümüne karşı direnme

Kanser gelişiminde önemli bir diğer faktör ise apoptoz yani programlanmış hücre ölümüdür (Evan ve Littlewood, 1998; Lowe ve ark., 2004; Adams ve Cory, 2007). DNA hasarı, hiperproliferasyon gibi faktörler apoptoz ile doğrudan ilişkilidir (Lowe ve ark., 2004; Adams ve Cory, 2007). Apoptoz mekanizmasının bozulması sonucu kanser patogenezi oluşmaya başlar. Apoptozu etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlardan bir kaçı; P53, Bax, Puma, Noxa gibi apoptozu indükleyen genlerdir. Bunlardan herhangi birinde oluşan DNA hasarı apoptozun çalışmasına engel teşkil etmektedir. (Hanahan ve Weinberg, 2000).

2.1.1.5. İnvazyon ve metastaz aktivitesi

İnvazyon ve metastazın gerçekleşmesi ekstraselüler matriks (ECM)'in yıkımı ile gerçekleşir. Ayrıca hücre-hücre yapışmasını sağlayan E-kaderinlerin bozulması da bu süreci desteklemektedir (Cavallaro ve Christofori, 2004; Berx ve Roy, 2009). İnvazyon ve metastatik süreçte hücre-hücre ve hücre-ECM adezyon moleküllerinin bozulduğu görülür (Cavallaro ve Christofori, 2004). Bu durum kanser hücrelerinin bulundukları yerden başka dokulara göç etmesini kolaylaştırır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

2.1.1.6. İndükleyici anjiogenez

Normal dokularda olduğu gibi kanserli dokularda da metabolik aktiviteyi devam ettirebilmek için besin ve oksijene gereksinim duyulmaktadır. Kanser hücrelerinin bu ihtiyacı anjiogenez (yeni damar oluşumu) ile karşılanmaktadır. Kanserli dokularda da tıpkı embriyogenez sırasındaki damar gelişimi gibi var olan damarlardan yeni damar filizlenmesi durumu ortaya çıkar (Hanahan ve Folkman, 1996). Anjiogenezi düzenleyen bazı temel faktörler vardır (Bergers ve Benjamin, 2003; Baeriswyl ve Christofori, 2009). Bunlardan en iyi bilinenleri vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve trombospondin-1 (TSP-1)'dir. Anjiogenezi düzenleyen bu faktörler hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak sinyaller oluştururlar. VEGF-A geni embriyonik gelişimde, doğum sonrasında, patolojik ve fizyolojik durumlarda kan damarlarını düzenleyen ligandları kodlar (Carmeliet, 2005; MacGebhann ve Popel, 2008; Ferrara, 2009). Bu faktörlere ek olarak fibroblast büyüme faktörü (FGF) de kanserli dokularda anjiogenezin devamının sağlanmasında rol oynamaktadır (Baeriswyl ve Christofori, 2009). Anjiogenez, insan ve hayvan modellerinde, invazif kanserlerde şaşırtıcı bir şekilde çok erken indüklenmektedir (Hanahan ve Folkman, 1996; Raica ve ark., 2009).

2.1.1.7. Sınırsız replikasyon potansiyeli

Normal hücrelerde replikasyon potansiyeli sınırlı iken kanser hücreleri devamlılığını sağlayabilmek için sınırsız replikasyon potansiyeline ihtiyaç duymaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Kanser hücrelerinin kromozom uçlarındaki telomerlerin korunması sağlanarak kısalmaları gerçekleşmez (Shay ve Wright, 2000; Blasco, 2005). Telomerlerin kısalma göstermemesi kanser hücrelerinin kendilerini sürekli yenilemesine sebep olmaktadır. Bu yüzden yeni oluşan neoplaziler dahi sınırsız replikasyon potansiyeli kazanırlar (Hanahan ve Weinberg, 2000).

2.1.1.8. Değişen hücresel metabolizma

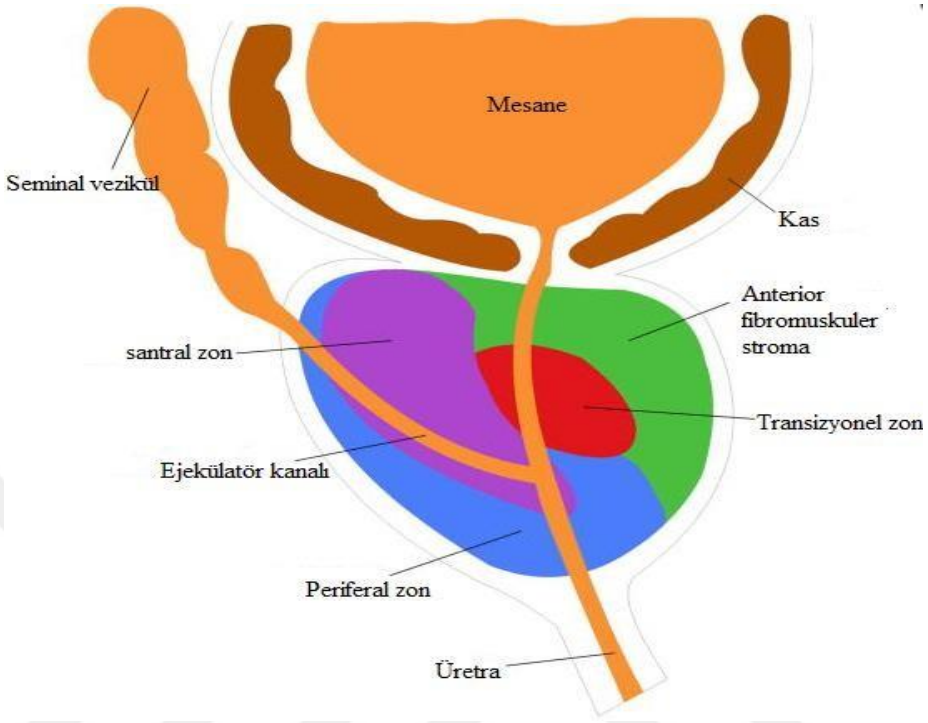
Kanserin ana nedenlerinden biri, tümör hücrelerinin büyümesi için gerekli olan makromoleküllerin ve organellerin sentezini sağlayan yapının, kendini sürekli yenileyerek yaşamına glikoz ile devam etmesi durumudur. Glikoz kullanılması sonucunda meydana gelen laktik asit, hücreleri bir arada tutan kollajen matrislerini parçalayarak kanser hücrelerinin kan dolaşımı ile vücudun başka yerlerine ulaşmasına neden olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.1.2. Prostat Kanseri

2.1.2.1. Prostat

Mesanenin hemen altında, rektumun önünde yer alan ve üretrayı çevreleyen prostat, 18-20 g ağırlığında bir salgı bezidir (Scardino, 2005). Normal bir prostatta anatomik olarak dört zon bulunmaktadır: periferal zon, santral zon, transizyonel zon ve fibromusküler stroma (Kufe ve ark., 2003). *Periferal zon*, prostat bezinin % 70'ten fazlasını oluşturmaktadır ve salgılama fonksiyonunu gerçekleştirmektedir. *Santral zon*, prostat bezinin % 25'ini oluşturmaktadır ve ejakülasyon kanalını çevrelemektedir. *Transizyonel zon*, üretrayı saran iki lobtan oluşmakta ve benign

tümörün meydana geldiği bölgeyi temsil etmektedir. *Fibromusküler stroma* ise prostatın tüm ön yüzeyini oluşturur (Şekil 2.3.) (Simmons ve ark., 2006).



Şekil 2.3. Prostat bezinin konumu ve bölgesel anatomisi (Franz ve ark., 2013)

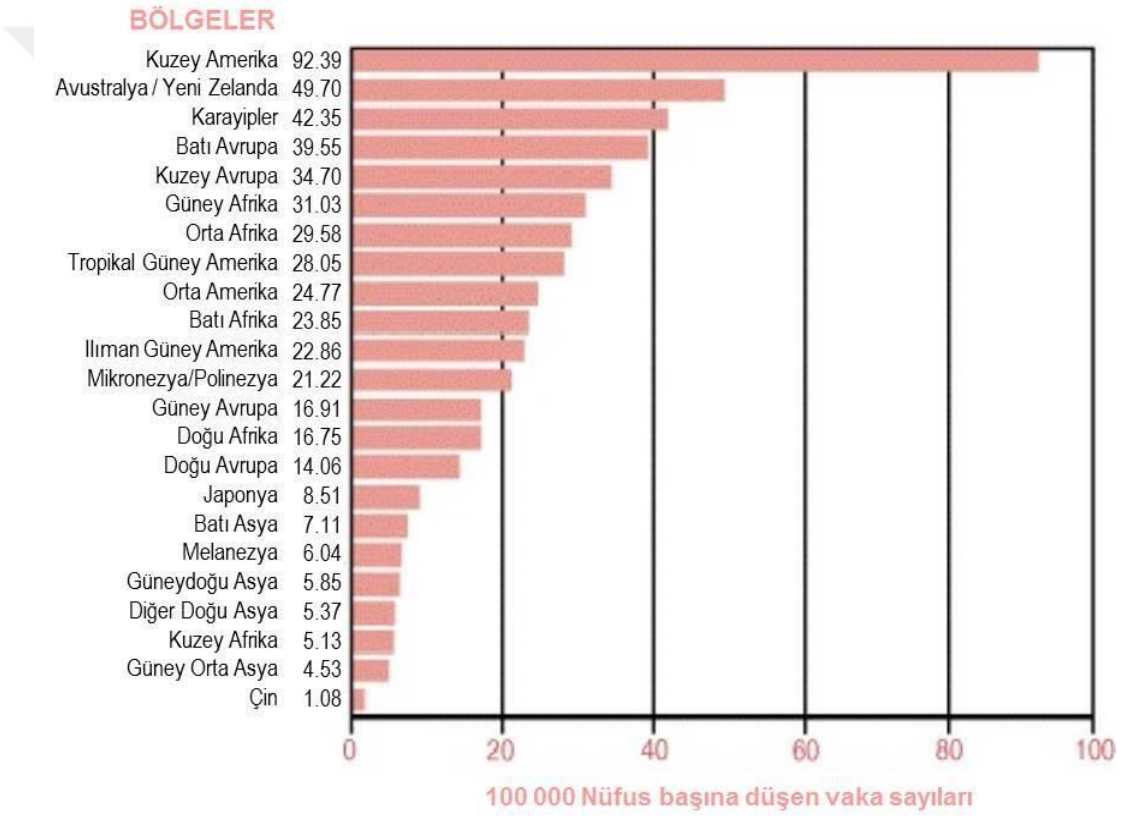
2.1.2.2. Prostat kanserinin epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı son rapora göre, 2012 yılında dünya çapında 8.2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiş olup 14.1 milyon yeni kanser vakası kaydedilmiştir (Stewart ve Wild, 2014). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılan çalışma, kanserin, hem kadınlar hem de erkeklerde kalp hastalıklarından sonra gelen en önemli ölüm nedeni olduğunu göstermektedir (Siegel ve ark., 2016). Prostat kanseri dünyada erkeklerde görülen en yaygın ikinci kanser türüdür (Staunton ve ark., 2016). Prostat kanseri için dört önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir. Bunlar yaş, ırk, aile öyküsü ve beslenme faktörleridir (Crawford, 2003).

Yaş, prostat kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Prostat kanserinin görülme sıklığı bireyin yaşıyla doğru orantılıdır. Prostat kanseri, % 80 oranında 65 yaş üstü

erkeklerde görülmektedir (Shen ve ark., 2000); nadiren 40 yaşından daha genç erkeklerde rastlanır (Gabriel ve ark., 1997). Bu oran 40'lı yaşlarda % 34, 30'lu yaşlarda ise % 27 civarındadır (Shen ve ark., 2000).

Prostat kanserinde bir diğer risk faktörü, ırksal farklılıklardır. Irksal farklılık, etnik gruplar ve ülkeler arasında değişiklik göstermektedir (Şekil 2.4.). Prostat kanserinin görülme oranı, siyah ırkta, beyaz ırka göre önemli ölçüde daha yüksektir. Bu oran Japonya'da yaşayan Japonlar'da da çok düşük bulunmuştur (Bunker ve ark., 2002; Kohler ve ark., 2011).



Şekil 2.4. Prostat kanserinde coğrafik farklılıklar (Kufe ve ark., 2003'ten değiştirilerek)

Yapılan araştırmalar, aile öyküsünün prostat kanserinde önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Prostat kanseri vakalarının % 5-10'una genetik faktörler ya da prostat kanseri yatkınlık genlerinin neden olduğuna inanılmaktadır. (Cannon ve ark., 1982; Carter ve ark., 1992; Gronber ve ark., 1996).

Beslenme alışkanlıkları, prostat kanserinde bir diğer risk faktörü olarak belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda yağ, et ve süt ürünlerinin fazla tüketilmesinin prostat kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir (Whittemore ve ark., 1994). Örneğin; Japonya'da yaşayan Japonlar'da prostat kanserinin görülme oranı düşük iken Amerika'da yaşayan Japonlar'ın beslenme alışkanlıklarından dolayı prostat kanserine yakalanma riski daha yüksektir (Shirai ve ark., 2002).

2.1.2.3. Prostat kanserinin belirtileri, tanı ve tedavi yaklaşımları

Prostat kanserinin başlıca belirtileri arasında idrar yapmada zorluk, mesanenin tam boşaltılmadığı hissi, idrarda kan görülmesi ve pelvis bölgesinde ağrı gelmektedir.

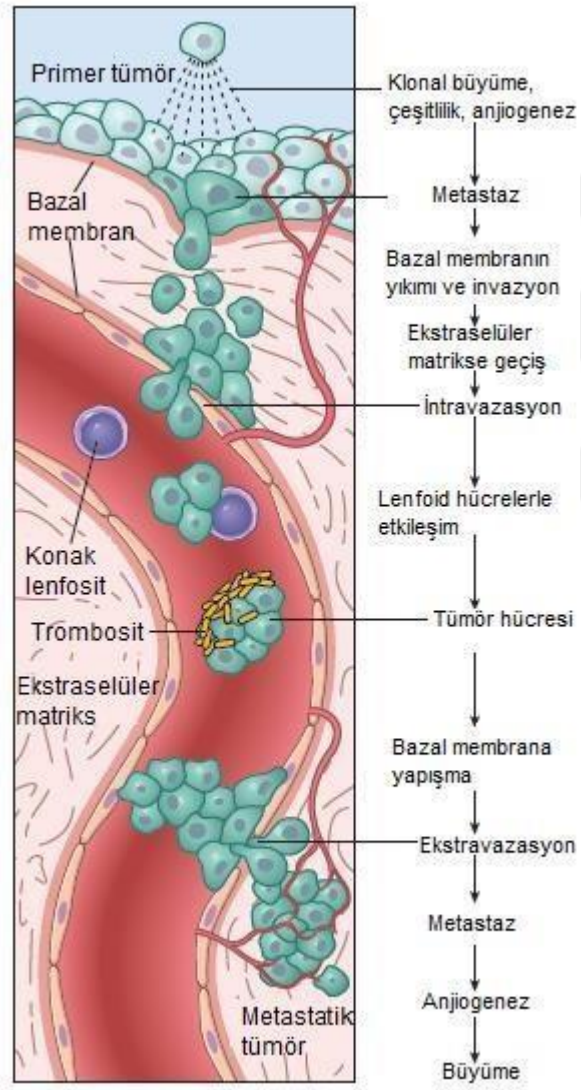
Prostat kanserinin tanısında, rektal muayene, kandaki prostat spesfik antijen (PSA) düzeylerinin ölçülmesi ve transrektal ultrasonografi (TRUS) gibi yöntemler kullanılmaktadır (Foster ve ark., 1997). PSA, normal prostat hücrelerinde bulunan bir antijendir. Prostat kanserinde PSA seviyesi artar. Ancak diğer prostat hastalıklarında da PSA seviyesi arttığı için prostat kanseri tanısında yeterli değildir. Diğer yöntemlerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Tiryakioğlu ve ark., 2013).

Prostat kanserinin tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve bekleme (aktif izlem) yöntemleri kullanılmaktadır. Kanser lokal bir bölgede sınırlı iken cerrahi müdahale veya radyoterapiye başvurulur. Metastatik süreçte ise hormon tedavisi kullanılmaktadır. Ancak metastatik evredeki hastalar hormonal tedaviye çoğunlukla yanıt vermezler. Primer ve sekonder tümörlerin yeniden büyümesiyle ölüm meydana gelmektedir (Collins ve Maitland, 2006).

2.2. Metastaz

Metastaz, kanser hastalarında en sık görülen ölüm nedenidir. Metastaz, primer tümörden ayrılan bir tümör hücresinin kan veya lenf dolaşımı yoluyla başka dokulara giderek buralarda ikincil tümörleri oluşturması olayıdır (Fidler, 2003). Metastatik

süreçte ilk olarak primer tümörden ayrılan hücrelerin salgıladıkları proteolitik enzimler yardımıyla ekstraselüler matriksi (ECM) yıkmaları dolayısıyla hücrelerin kan veya lenf dolaşımına katılması görülür. Bu dolaşım sırasında damar dışına çıkarak diğer dokuların içerisine girer ve orada mikrometastazları oluştururlar (Şekil 2.5.). Metastatik süreçteki basamaklar oldukça karmaşık ve ölümle sonlanması muhtemeldir (Mehdi ve ark., 2000).



Şekil 2.5. metastatik süreç (Kumar ve ark., 2015)

Hücrelerin bir yere hareket etmesi normal bir fizyolojik süreçtir. Ancak kanser hücrelerinde göç istenmeyen bir olaydır ve hücre göçü metastaz ile sonuçlanabilir.

Bir kanser hücresinin göçü, ekstraselüler matriks ve hücre iskeleti arasındaki etkileşime bağlı bir süreçtir (Makale, 2007).

2.2.1. İyon kanallarının metastatik süreçteki rolü

Kanserin oluşum nedenlerini ortaya koyan pek çok mekanizma bulunmaktadır. Son 10 – 15 yıldır iyon kanalları bu mekanizmaların hemen hepsiyle ilişkilendirilmiştir (Fraser ve Pardo, 2008; Prevarskaya ve ark., 2010). İyon kanalları, hücre fizyolojisinde ve kanser patofizyolojisinde merkezi bir rol oynadıkları için dikkat çekici özelliğe sahiptirler (Djamgoz ve Onkal, 2013). Hücrelerin büyümesi, farklılaşması, pH düzenlenmesi, gen ekspresyonu, programlı hücre ölümü gibi birçok hücresel davranışın düzenlenmesinin yanı sıra kanserin metastatik sürecinde de aktif bir şekilde rol almaktadırlar (Kunzelman, 2016).

Voltaj kapılı K^+ kanalları (VGPC) hücre göçünde önemli bir yere sahiptir (Arcangeli ve ark., 1988; Arcangeli ve ark., 1994; Schwab ve ark., 1994). $K_v1.3$, $K_v10.1$ ve $K_v11.1$'in özellikle bağırsak ve epitel hücrelerinin iyileşmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Shin ve ark., 2002). Özellikle $K_v1.1$'in ekspresyonunun artışı Ca^{2+} kanallarını tetiklemekte ve hücre hareketi gerçekleşmektedir (Schwab ve ark., 1994).

Sıçan prostat kanseri hücre soyları olan MAT-LyLu (yüksek metastatik) ve AT-2 (zayıf metastatik) hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda VGSC ekspresyonunun MAT-LyLu hücrelerinde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Djamgoz ve ark., 2001). VGSC ekspresyonunun arttığı durumlarda kanserin agresifleştiği belirlenmiştir (Bockman ve ark., 2001).

Bugüne dek yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde voltaj kapılı K^+ kanalları, Ca^{2+} kanalları ve Na^+ kanalları gibi çeşitli iyon kanallarının, tümör hücrelerinin çoğalması, motilitesi, invazyonu ve hücre yapışmasında aktif olarak rol oynadıkları görülmektedir (Mycielska and Djamgoz, 2004). Biriken kanıtlar, iyon kanallarını, kanserin ve metastazın tedavisi için yeni ve iyi bir hedef adayı haline

getirmiş olup kanalları bloklayabilen ajanların kullanılması ile tedaviye katkı sağlanabileceği düşünülmektedir (Hoang ve ark., 2006).

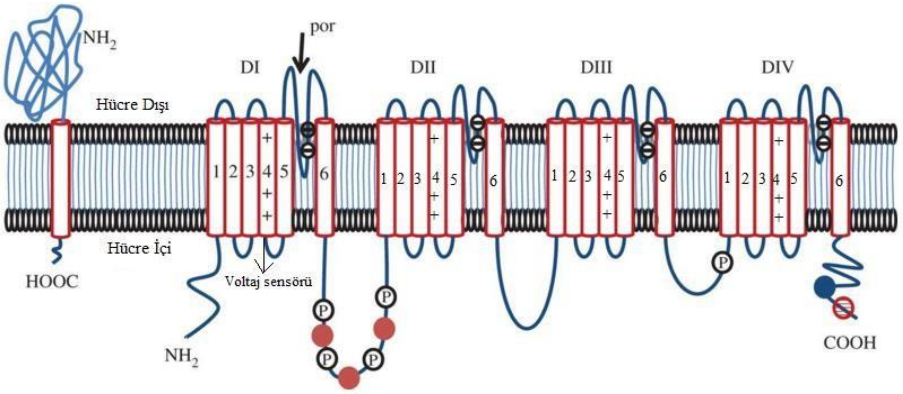
2.2.1.1. Voltaj kapılı sodyum kanalları

İyon kanalları, hücre zarında bulunan membran proteinleridir (Sulayman ve ark., 2009). Hücre zarında bulunan bu özel proteinler, pompalar, taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleri olmak üzere üç farklı şekilde iyonları zarın bir tarafından diğer tarafına geçirebilmektedir. Her iyonun kendine özgü kanal proteinleri bulunmaktadır. Bu kanal proteinleri yüklü moleküllere özgü olup uyarılabilir hücrelerde elektrik gibi bazı sinyallere cevap verir (Yang ve ark., 2016).

Hücre içi ile hücre dışı arasında bir elektriksel potansiyel farkı mevcuttur. Her hücrede istirahat membran potansiyeli farklılık göstermekle birlikte genel olarak hücre içi negatif, hücre dışı ise pozitif yüklüdür. Bir sinir hücresinde hücre içi negatif yüklüyken istiharat membran potansiyelinin 50-100 mV civarında olduğu bildirilmiştir. Voltaj kapılı iyon kanalları çok kısa bir süre içinde çok fazla sayıda (örneğin 10^4 iyon/ms) iyon taşınmasına izin verebilmektedir (Djamgoz ve Onkal, 2013). Uyarının gücüyle doğru orantılı olarak aksiyon zar potansiyeli oluşur (Catterall, 2000).

Hücre zarındaki iyon kanallarının bir kısmı sürekli açık iken diğer kısmının açılıp kapanması bir kapı ile kontrol edilir. Sürekli açık olan kanallar istirahat membran potansiyelini oluşturan kanallardır. Kapı kontrollü kanallara ise voltaj kapılı, ligand kapılı ve mekanik kapılı iyon kanallarının tümü dahildir. Mekanik kapılı kanallar özellikle hücre iskeletindeki gerilmeye cevap verirler. Ligand kapılı kanallar hormon, nörotransmitter gibi maddelerin kanala bağlanmasıyla; voltaj kapılı kanallar ise herhangi bir elektriksel uyarı sonucu açılıp kapanan kanallardır (Hille, 2001). Voltaj kapılı iyon kanalları Na^+, K^+ ve Ca^{2+} iyonlarını içeren birbiriyle bağlantılı bir protein ailesidir. Bu kanallar yapısal olarak birbirlerine benzerlik göstermektedir ve her kanal kendine özgü iyonları geçirmektedir (Shon ve ark., 1998).

VGSC α ve β alt ünitelerinden oluşan integral membran proteinleridir (Mantegazza ve ark., 2010). Bu kanallar 220-260 kDa ağırlığında bir α alt ünitesi ile 30-40 kDa ağırlığında bir veya daha fazla β alt ünitesinden oluşmaktadır. Bir α alt ünitesi dört domainden (I-IV) ve her domain altı segmentten (S1-S6) meydana gelmektedir. S4 segmenti voltaj sensörü olarak görev yapmaktadır. S5 ve S6 segmentleri arasında yer alan por, iyon seçici filtre görevi görür (Şekil 2.6.) (Campbell ve ark., 2013; Nelson ve ark., 2014).



Şekil 2.6. Voltaj kapılı sodyum kanalının yapısı (Fraser ve ark., 2014)

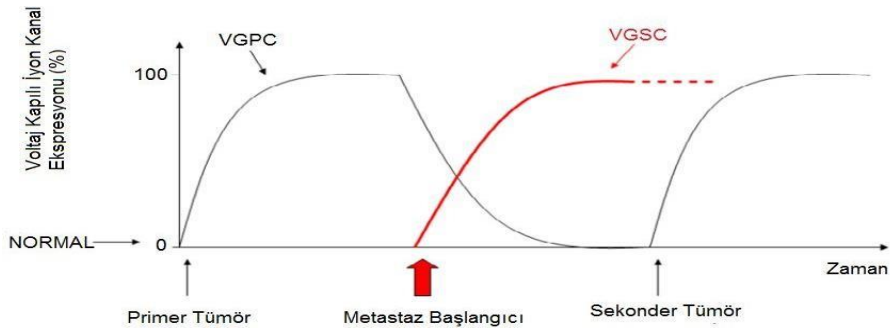
VGSC'ler, uyarılabilir hücrelerde (sinir ve kas) oldukça önemli rollere sahiptir. Hücre membranı elektriksel iletiyle depolarize olur ve sodyum kanalları milisaniyeler içerisinde aktif ve inaktif formlara dönüşür. Hücre zarının depolarizasyonu durumunda voltaj sensörü olarak görev alan S4 segmentinin uyarıyı almasıyla, S5 ve S6 segmentleri arasındaki por açılır ve sodyum iyonlarının hücre içine doğru girişi sağlanır (Lodish ve ark., 2011).

VGSC'lerin α alt ünitelerini kodlayan on (Nav1.1 – Nav1.9, Nav2.1, Syn: SCN1A – SCN11A), β alt ünitelerini kodlayan dört (SCN1B-SCN4B) farklı gen tespit edilmiştir (HUGO, 2016). α alt ünitelerini kodlayan genlerden $Na_v1.1$-$Na_v1.4$, $Na_v1.6$-$Na_v1.7$ tetrodotoksine hassas (TTX-S), $Na_v1.5$, $Na_v1.8$ ve $Na_v1.9$ ise tetrodotoksine dirençli (TTX-R) sodyum kanallarını kodlamaktadır (Wilson ve ark., 2013). Bu genler farklı amino asit diziliminde olup aynı moleküler yapıya sahiptirler. VGSC'ler uyarılabilir hücrelerde farklı şekilde eksprese edilmekle beraber sadece

uyarılabilir hücrelerde değil uyarılamayan lenfositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler ve yüksek metastatik kanser hücrelerinde de VGSC'lerin eksprese edildiği bilinmektedir (Diss ve ark., 2001). VGSC'ler zayıf metastatik veya metastatik olmayan kanser hücrelerinde görülmemiştir (Grimes ve ark., 1995; Laniado ve ark., 1997; Fraser ve ark., 2005).

2.2.1.2. CELEX hipotezi

CELEX (hücresel uyarılabilirlik) hipotezi, kanserin progresyonu (ilerlemesi) sırasında voltaj kapılı iyon kanallarından özellikle sodyum (VGSC) ve potasyum (VGPC) kanallarının uyumlu ifadesine dayanır. Kanser hücrelerinin metastatik sürecinde, VGPC'nin aktivitesine dair kanıtlar az olmakla birlikte, VGSC ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir. Hücresel uyarılabilirlik modeline göre; primer tümör oluşumunda VGPC ekspresyonunun artmasıyla kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmaya başlamaktadır. Metastazın başlamasında VGSC'lerin ekspresyonu artarken VGPC'lerin ekspresyon ve aktivitesi azalır. Hücrelerin uygun alanlara ulaşıp yerleşerek, sekonder tümör oluşumunun başlamasıyla VGPC ekspresyonu yeniden artar (Şekil 2.7.). VGSC ekspresyonu aktiviteye bağlı pozitif geribildirim ile kendi kendini devam ettirir. Böylece güçlü metastatik karsinoma hücreleri uyarılabilir hale gelir ve epitel kökenli olmalarına rağmen hep ya da hiç tipi aksiyon potansiyeli üretirler. Özetle; CELEX hipotezi, membran uyarılabilirliğinin kanser hücrelerini hiperaktif ve invazif yaptığını, böylece metastazı desteklediğini önermektedir (Djamgoz, 2014).



Şekil 2.7. CELEX hipotezine göre kanser gelişimi sırasında voltaj kapılı iyon kanal ekspresyonlarının dinamik davranışını gösteren diyagram (Djamgoz, 2014)

2.3. Metastatik Prostat Kanser Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Modeller

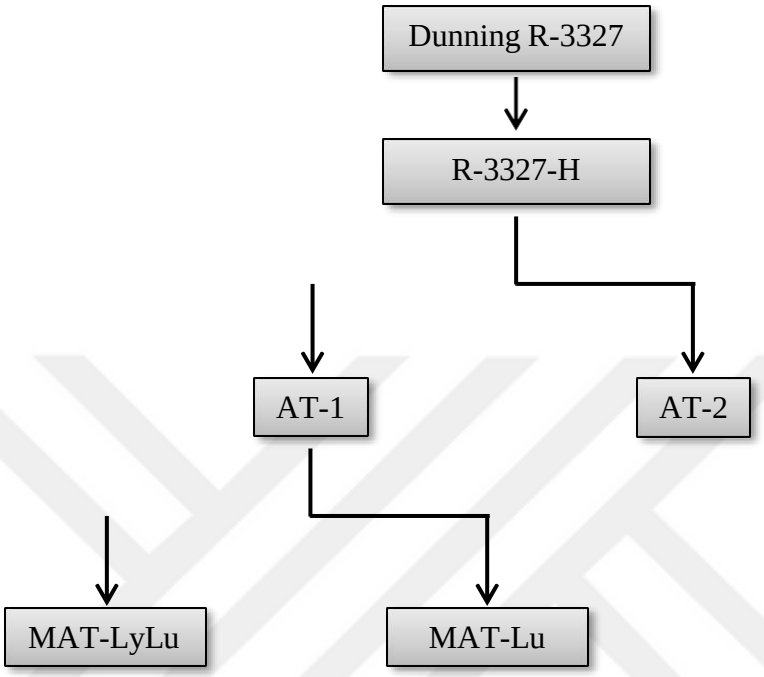
2.3.1. Dunning modeli

Kanser araştırmalarının teşhis ve tedavi yöntemlerinde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* deney modelleri çok büyük katkılar sağlamaktadır. Öncelikle *in vitro* olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda *in vivo* yöntemler uygulanmakta ve bu sonuçlar doğrultusunda klinik araştırmalara geçilebilmektedir. Kanser araştırmalarında çoğunlukla fare ve sıçanlar deneysel model olarak kullanılmaktadır (Tennant ve ark., 2000; Anisimov ve ark., 2005). Özellikle prostat kanserinde deneysel model olarak kullanılmasının temel nedeni insan prostat kanserine en yakın model olmasıdır (Oltean ve ark., 2008).

Prostat kanseri araştırmalarında, insan kökenli, androjen bağımsız PC-3MM2 hücreleri (Uehara ve ark., 2003), LNCaP (lenf nodu metastazı), PC-3 (kemik metastazı), DU-145 (beyin metastazı) (Matsubara ve ark., 2001) gibi hücre soylarının yanısıra Dunning sıçan prostat kanseri modeli kullanılmaktadır. Bu modelin tercih edilmesinin başlıca sebepleri arasında; androjen bağımsız büyümesi, primer ve sekonder tümörlerin moleküler tekniklerle çalışılmasına uygun olması, *in vivo – in vitro* şartlarda pasajlarının yapılabilmesi ve birden fazla sayıda tümör hücre soyuna sahip olması sayılmaktadır (Vieweg,1994).

İlk olarak 1963 yılında Copenhagen ırkı bir sıçanın prostat epitelinde ortaya çıkan bu tümörün (Luo ve ark.,1997) seri pasajları sırasında orijinal tümörden farklı büyüme hızı yavaş ve androjene hassas R-3327-H tümörü elde edilmiştir. R-3327-H tümörünün kastre edilmemiş ve herhangi bir uygulama yapılmamış hayvanlara seri pasajlarına devam edilmiş; yavaş büyüyen ve androjene bağımsız R-3327HI tümörü elde edilmiştir. Yine R-3327-H tümörünün kastre edilmiş hayvanlara seri pasajları yapıldığında ise hızlı büyüyen, androjen bağımsız R-3327-AT tümörü elde edilmiştir. R-3327-AT tümörünün seri pasajları sırasında hızlı büyüyen zayıf metastatik AT-1 ve AT-2 tümörleri elde edilmiş ve AT-1 tümörünün pasajları sonucunda güçlü metastatik özellik gösteren, hızlı büyüyen ve androjen bağımsız MAT-LyLu ve

MAT-Lu tümörleri elde edilmiştir. MAT-LyLu lenf nodu ve akciğere metastaz yaparken (Vieweg ve ark., 1994) MAT-Lu tümörü ise sadece akciğere metastaz yapmaktadır (Şekil 2.8.) (Navone ve ark., 1999; Tennant ve ark., 2000).



Şekil 2.8. Dunning sıçan prostat kanser modelinin gelişim şeması

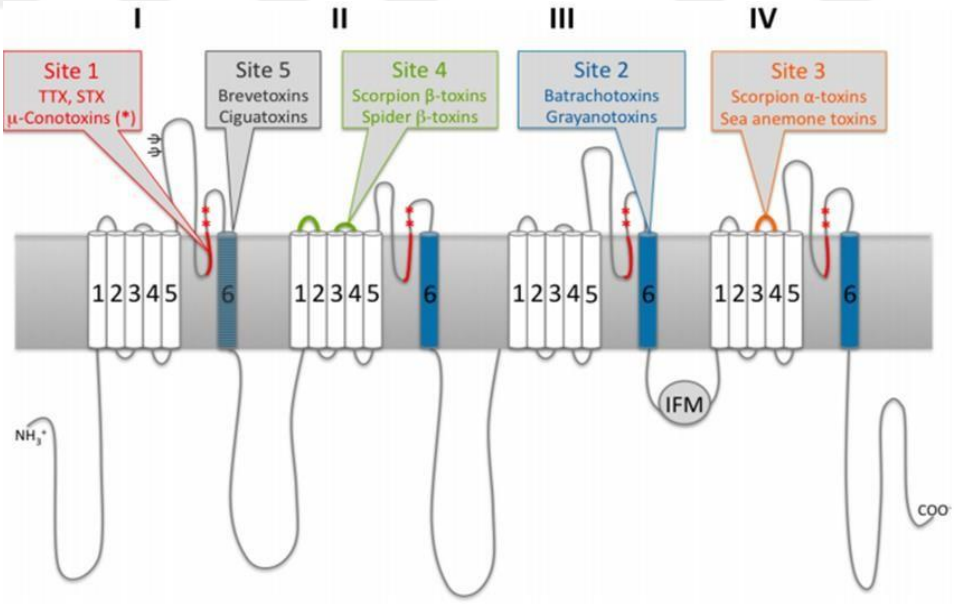
2.4. İyon Kanallarını Bloklayan Bazı Ajanlar

2.4.1. Bazı nörotoksinler ve lokal anestetikler

Saxitoxin, Veratridine, Batrachotoxin, Aconitine, Grayanotoxin, Tetrodotoksin (TTX) bazı nörotoksinlerdir. Saxioxin tıpkı TTX gibi Na^+ kanallarını bloklayan bir nörotoksindir (Kao ve Nishiyama, 1965). Bunlar bakteriler ve bazı dinoflagellatlar tarafından üretilmektedir (Narahashi, 2008; Azman ve ark., 2014). Kurbağalar üzerinde yapılan çalışma sonucunda saxitoxin maddesinin sinirleri blokladığı gösterilmiştir (Narahaski ve ark., 1967; Hille, 1968). Saxitoxin'in sodyum kanalını blokladığı; Batrachotoxin ve Grayanotoxin'in sodyum kanallarının inaktivasyonuna engel olarak kanalı kalıcı bir şekilde aktive ettiği; Veratridine'in, kanal aktivasyonunu düşürdüğü; Aconitine'in ise iyon seçiciliğini değiştirdiği bilinmektedir. Batrachotoxin, Grayanotoxin ve Veratridine'in I-IV domaininin S6

segmentine bağlanarak işlev gördükleri bilinmektedir. Scorpion α toksinlerden olan AaH II, LqhaIT, BMK M1, AFTII, domain IV'ün S3-S4 segmentlerine bağlanarak inaktivasyonun yavaşlatılmasına neden olmaktadır. Scorpion β toksinlerden olan Css4, Tsγ, AahIT, Magi 5, HWTX-IV, MrVIA, domain II'deki S3–S4 segmentlerinin arasına bağlanarak voltaj değişimine sebep olmaktadır. Siklik polieter bileşiklerinden olan Brevetoxin ve Ciguatoxin'ler domain I'deki S6 segmentine bağlanarak inaktivasyonun yavaşlatılmasına sebep olmaktadır (Stevens ve ark., 2011) (Şekil 2.9.) Ayrıca bu nörotoksinler kardiyak aritmi tedavisi ve epileptik nöbetlerin önlenmesinde kullanılan sodyum kanallarını bloklamayı hedef almaktadır (Sharkey ve ark., 1987).

Lidocaine gibi bazı lokal anestetikler domain IV'teki S6 segmentine bağlanarak Na^+ akışının durmasına neden olur (Stevens ve ark., 2011). Etidocaine, Mepivacaine ve Bupivacaine, Lidocaine ailesinden diğer anestetiklerdir (Lipkind ve Fozzard, 2005). Scholz ve Vogel (2000), lidocaine ve bupivacaine lokal anestetiklerinin TTX'e dirençli VGSC'leri baskıladığını bildirmişlerdir.



Şekil 2.9. Bilinen bazı nörotoksinlerin VGSC üzerindeki bağlanma bölgeleri (Stevens ve ark.,2011)

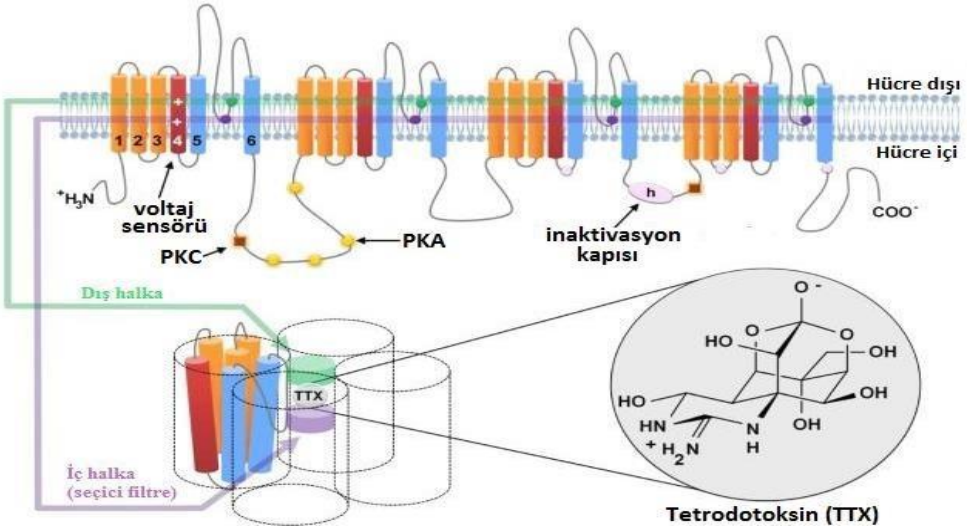
2.4.2. Tetrodotoksin (TTX)

Tetrodotoksin ($C_{11}H_{17}N_3O_8$), molekül ağırlığı 319.27 g/mol olan güçlü bir nörotoksindir (Tocris, 2016). TTX, Tetraodontidae familyasına ait pek çok balık türü ile diğer deniz canlıları ve bazı karasal hayvanlardan elde edilir (Narahashi, 2008) (Şekil 2.10.). TTX'in bu canlıların bağırsaklarında yaşayan endo-simbiyotik bakteriler tarafından üretildiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2000).



Şekil 2.10. Tetraodontidae familyasına ait bir balık (Kheifets ve ark., 2012)

TTX, VGSC'lerin α altünitesi I.domainindeki S5-S6 segmentleri arasında yer alan SS1/SS2 (P) ilmeğine bağlanarak sodyum iyonunun kanaldan girişini engeller ve hücre içine doğru olan sodyum akımının durdurulmasını sağlar (Fozzard ve Lipkind, 2010) (Şekil 2.11.). VGSC'leri bloklama özelliği sayesinde ağrı kesici etkiye sahip olmaktadır (Nieto ve ark., 2012). Schwartz ve ark. (1998) fotorefraktif keratektomiden sonraki ağrının giderilmesi amacıyla 10 μM dozda topikal TTX uygulamasının tavşanlarda uzun süreli anestezi sağladığını tespit etmişlerdir. Yang ve ark., (2016) ise Nav1.3 ve Nav1.7 genlerinin sürekli aktif olmasının diyabeti artırdığını TTX ile kanalları bloklayarak göstermişlerdir.



Şekil 2.11. Voltaj kapılı sodyum kanalının α altünitesi ve tetrodotoksin bağlanma bölgesinin şematik gösterimi (Nieto ve ark.,2012)

Yapılan çalışmalar sonucunda TTX'in (1 μM) kullanılmasıyla MAT-LyLu hücrelerinin lateral yöndeki hareketinin %47 oranında azaldığı belirlenmiştir (Fraser ve ark., 2003). Bazal membranı geçme yeteneği olan invazyon üzerine yapılan bir çalışmada ise 600 nM TTX'in MAT-LyLu hücrelerinin membrandan geçişini %33 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Grimes ve ark., 1995). Bir başka çalışmada aynı (600 nM) konsantrasyondaki TTX'in, güçlü metastatik insan prostat kanser hücre soyu olan PC-3 hücrelerinin invazifliğini azaltırken zayıf metastatik LNCaP hücrelerinde etki göstermediği bildirilmiştir (Laniado ve ark., 1997). Farklı metastatik potansiyele sahip sıçan ve insan prostat kanser hücreleriyle yapılan çalışmalarda hücrelerin invazyon yetenekleri ile plazma membranlarındaki VGSC ekspresyonları arasında doğru bir orantı olduğu gösterilmiştir (Smith ve ark.,1998). Fraser ve ark., (1999) 6 μM TTX'in MAT-LyLu hücrelerinde uzama ve alan artışını engellediğini ortaya çıkarmışlar ancak zayıf metastatik özellikteki AT-2 hücrelerinde TTX'in herhangi bir etkisini gözlemlememişlerdir.

2.4.3. Doğal bileşikler

Diyet faktörlerinin kanserde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Williams ve ark., 1999; Wayne ve ark., 2006). Tüm kanserlerin yaklaşık %55'i beslenme

alışkanlıklarıyla ilgilidir (Williams ve ark., 1999). Özellikle son yıllarda, kanser hastaları arasında, doğal diyet takviyelerinin kullanımı popüler hale gelmiştir. Bunun nedeni uygun dozlarda alındığında herhangi bir toksik etki gözlenmemesi veya yan etkilerinin çok az olmasıdır (Reddy ve ark., 2003). Çin ve Japonya'daki pek çok kanser hastalığının tedavisinin doğal diyetle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sarkar ve Li, 2003).

Günümüze dek, birçok araştırıcı çeşitli doğal bileşiklerin iyon kanalları üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Literatürde resveratrol, capsaicin, genistein, ginseng ve curcumin gibi bazı bileşiklerle ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben; 228.2 Da), kırmızı üzüm, çilek ve fıstıkta bol miktarda bulunan polifenolik bir bileşiktir (Langcake ve Pryce, 1977). Yapılan çalışmalar sonucunda, güçlü antioksidan aktiviteye sahip bu bileşiklerin (Oliveria ve ark., 2012; Gerszon ve ark., 2014; Li ve ark., 2014) prostat kanseri, kolorektal kanser ve lösemi üzerinde sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir (Stewart ve ark, 2003; Wolter ve ark., 2004; Ulrich ve ark., 2005). Resveratrolün iyon kanalı üzerindeki etkisini belirleyen çalışmalar da yapılmıştır (Wolter ve ark., 2004). Fraser ve ark. (2014), MAT-LyLu hücrelerine 20 μM resveratrol uyguladıklarında hücre çoğalması üzerinde bir etki görülmezken hücrelerin lateral hareketlerinin % 25, dikey yöndeki hareketlerinin ise % 31 oranında azaldığını; ayrıca hücrelerin bulundukları yere % 55 oranında daha fazla yapışma gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Capsaicin (8-metil-N-vanilil-6-nonenamide; 305.4 Da), özellikle kırmızı biberde bulunan bir bileşiktir (Bode ve Dong, 2011). Capsaicinin, meme kanseri (Tuoya ve ark., 2006), kolon kanseri (Kim ve ark., 2004) ve gastrik adenokarsinom (Lo ve ark., 2005) gibi birçok kanser türünde apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir. Bielefeldt (2000), erkek Sprague-Dawley sıçanları üzerinde yaptığı çalışmalarda capsaicinin viseral duyu nöronlarındaki voltaj kapılı iyon kanallarını (Na^+, K^+, Ca^{2+}) blokladığını göstermiştir.

Genistein (270.2 Da), soya ürünlerinde bulunup antioksidan özellik gösteren bir maddedir (Wei ve ark., 1995). Bu maddenin protein tirozin kinazları (PTK) ve DNA topizomerazlar I ve II'yi inhibe ettiği belirtilmiştir (Santell ve ark., 2000). Liu ve ark. (2004), sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda Genisteinin VGSC'leri bloklayarak sodyum akımını durdurduğunu göstermişlerdir.

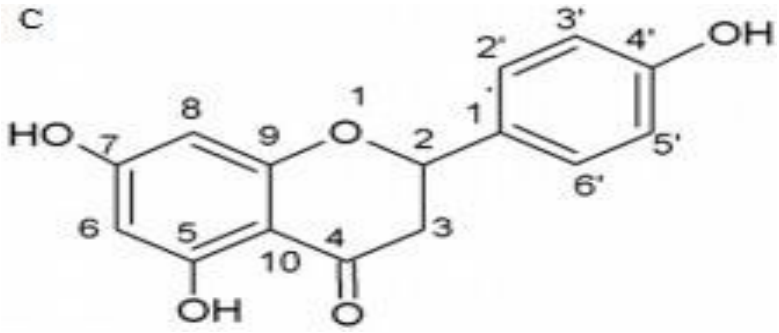
Ginseng, uzak doğu ülkelerinde yetişen, geleneksel tedavilerde kullanılan, kazık köklü, otsu ve çok yıllık bir bitkidir (Akerele, 1992). Ginseng güçlü bir antioksidan olup yapılan çalışmalar sonucunda sıçan beyin hücrelerinde $Na_v1.2$ geninin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Lee ve ark., 2005). Ayrıca ginsengin VGPC'leri de bloklayıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Nah ve ark., 2007).

Curcumin (diferuloylmethane, 368.4 Da), doğal bir bileşik olup Zingiberaceae familyasına ait *Curcuma longa* L. bitkisinden elde edilmektedir. Boya, gıda maddesi ve baharat olarak kullanılabilen aktif bir bileşendir. Curcuminin anti-inflamatuar, hipokolesterolemik, hipoglisemik etkileri ile antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Tang ve ark., 2005). Ayrıca melanoma (Siwak ve ark., 2005), lenfoma (Shishodia ve ark., 2005) ve prostat kanserinde (Dorai ve ark., 2001) metastatik sürece karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Aggarwal ve ark., (2005), curcuminin akciğer ve meme kanserinde metastazı inhibe ettiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, curcuminin VGSC'leri bloklama etkisine sahip olduğu gösterilmiştir (Keller ve ark., 2005)

2.4.3.1. Naringenin

Flavonoidler, bitkilerin metabolizmalarında üretilen sekonder metabolitler olan fenolik bileşiklerin bir sınıfını oluşturmaktadırlar (Saldamlı, 1998). Flavonoidlerin, antioksidan (Pietta, 2000), antibakteriyel (Cushnie ve Lamb, 2005), anti- enflamatuar (Pan ve ark., 2010), antiviral (Goldwasser ve ark., 2011), karaciğeri koruyucu (Zhu ve ark., 2012) ve anti-kanser (Frydoonfar ve ark., 2003; Ekambaram ve ark., 2008; Filho ve ark., 2014) gibi özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir.

Naringenin (4',5,7-trihidroksi-flavanon-7-ramnoglukozit) (Şekil 2.12.), genellikle greyfurt, limon, mandalina ve portakalda yaygın olarak bulunan bir flavonoiddir (Şekil 2.13.) (Lee ve ark., 2001).



Şekil 2.12. Naringeninin kimyasal formülü (Sigma-Aldrich, 2016).



Şekil 2.13. Naringeninin izole edilebildiği meyveler: Greyfurt, limon, mandalina, portakal (Anon, 2017)

Ekambaram ve ark. (2008), mide kanseri oluşturulmuş 6-8 haftalık albino sıçanlar üzerinde naringenin maddesinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, naringenin verilen sıçanların vücut ağırlığında artış olduğunu gözlemlemişler ve bunun flavonoidin koruyucu etkisinden kaynaklı olabileceği görüşüne varmışlardır. Du ve ark., (2009) naringenin bileşiğinin TGF-β1'in transkripsiyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada turunçgillerden elde edilen naringenin ekstraktlarının sıçanlarda kan beyin bariyerini geçtiği, böylece merkezi sinir sistemini (MSS) etkilemek için kullanılabileceği tespit edilmiştir (Yi ve ark., 2010).

Ayrıca naringeninin, lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu inhibe ettiği, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların düzeyini arttırdığı ve DNA hasarını inhibe ettiği bulunmuştur (Kannappan ve Anuradha, 2010). Goldwasser ve ark. (2011) ise naringeninin, hepatit C virüsünün (HCV) inhibitörü olduğunu göstermişlerdir.

Naringenin ve türevlerinin prostat (Knowles ve ark., 2000; Manthey ve Guthrie, 2002; Campbell ve ark., 2006), meme (Harmon ve Patel, 2004; Filho ve ark., 2014), kolon (Frydoonfar ve ark., 2003; Yoon ve ark., 2013; Song ve ark.,2016), akciğer (Bale ve ark., 2011), mide (Ekambaram ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2015), karaciğer (Totta ve ark., 2004; Chu ve ark., 2016), rahim ağzı (Chen ve ark., 2016), mesane (Liao ve ark., 2014) kanserleriyle lösemi (Li ve ark., 2015) gibi bazı hücre soyları üzerinde proliferasyonu baskılayıcı etki gösterdiği bildirilmiştir.

Yüksek metastatik özellik gösteren insan prostat kanseri PC-3 hücrelerine uygulanan 100 µM naringeninin hücre proliferasyonunu % 25'den az inhibe ettiği (Knowles ve ark, 2000); zayıf metastatik özellik gösteren DU-145 hücrelerine uygulanan 150 µM naringeninin ise proliferasyonu % 50 oranında inhibe ettiği (Manthey ve Guthrie, 2002) rapor edilmiştir. LNCaP hücreleri üzerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki (12.5 – 40 µM) naringeninin doza bağlı olarak proliferasyonu azalttığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar naringenin maddesini quercetin ve kaempferol gibi başka flavanoidlerle kombine ederek LNCaP hücrelerine uygulamaları sonucunda proliferasyonu daha kuvvetli bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir (Campbell ve ark., 2006). Torricelli ve ark. (2011), PC-3 insan prostat kanseri hücrelerine naringenini tek başına ve α-tokoferol ile kombine ederek uygulamışlar ve bileşiklerin hücrelerde transglutaminaz aktivitesini arttırdığını belirlemişlerdir. Başka bir araştırmada, LNCaP insan prostat kanseri hücrelerine uygulanan naringeninin, DNA tamir enziminin ekspresyonunu arttırarak bu hücreleri mutasyona karşı koruduğu gösterilmiştir (Gao ve ark., 2006).

Meme kanseri MCF-7 hücreleri ile yapılan çalışmada hücrelere uygulanan naringeninin glukoz alımını baskılayarak proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir

(Harmon ve Patel 2004). Naringeninin, HT-29 kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu doza bağlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir (Frydoonfar ve ark., 2003). Song ve ark., (2016) HCT116 ve SW480 kolon kanseri hücre soylarında 100 µM konsantrasyonda uygulanan naringeninin p38'i aktive edip ATF 3 (aktive edici transkripsiyon faktörü 3) protein seviyesini arttırarak apoptozu indüklediğini, böylece canlı hücre sayısını azalttığını tespit etmişlerdir.

Naringeninin, iyon kanalları üzerindeki aktivitesine dair literatürde birkaç çalışmaya rastlanmıştır. Yang ve ark., (2008) naringenin maddesinin konstipasyon (bağırsak tembelliği) semptomlarına olan etkisini anlayabilmek için T84 insan kolon hücreleri ve sıçanlar üzerinde çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmadan naringenin maddesinin Cl^- iyonlarını blokladığı; cAMP ve PKA sinyal yollarını aktifleştirdiği bulgularına ulaşmışlar ve naringenin uygulamasının konstipasyon semptomlarının giderilmesi için yeni bir tedavi stratejisi olabileceğini önermişlerdir (Yang ve ark., 2008). Saponara ve ark., (2006), vasküler düz kas hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, naringeninin Ca^{+2} ile aktive K^+ kanalı BK_{Ca}'yı aktive ederek damar genişletici etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise naringeninin, kan damarında bulunan L tipi kalsiyum kanalı $Ca_v1.2$'yi blokladığı tespit edilmiştir (Saponara ve ark., 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

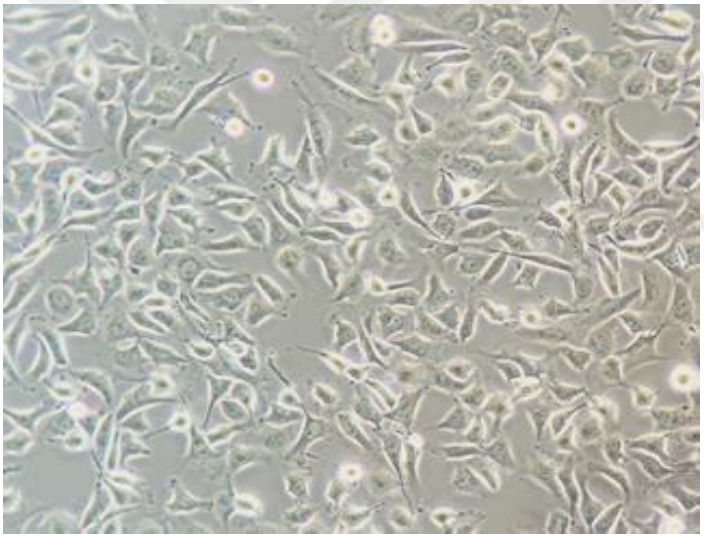
- Sınıf II güvenlik kabini (Thermo, USA)
- CO2'li inkübatör (Eppendorf, Almanya)
- İnverted ışık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Isolab,Almanya)
- Eliza mikroplaka okuyucu (Biochrom, İngiltere)
- 100x20 mm'lik kültür kapları (Greiner, Almanya)
- 35x20 mm'lik kültür kapları (Greiner, Almanya)
- 96 kuyucuklu pleyt (Greiner, Almanya)
- 24 kuyucuklu pleyt (Greiner, Almanya)
- 12 kuyucuklu pleyt (Greiner, Almanya)
- 5-10 ve 25 ml hacimli steril pipetler (Greiner, Almanya)
- 15 ml ve 50 ml'lik tüpler (Greiner, Almanya)
- 1-10, 20-200, 100-1000 µl otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Steril pipet uçları (Greiner, Almanya)
- 1,5 ml'lik mikro tüpler (Isolab, Almanya)
- Hücre ortamı; RPMI 1640 (Invitrogen, USA)
- Fetal dana serumu (FBS) (Invitrogen, USA)
- Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, USA)
- L-Glutamine (Invitrogen, USA)
- Dexamethasone (Sigma Aldrich, USA)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- Tetrodotoksin (Tocris Bioscience, İngiltere)
- Naringenin (Sigma Aldrich, USA)
- Methylthiazolydiphenly-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, USA)

- Dimetil sülfoksit (Merck, Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Dunning modeli yüksek metastatik sıçan prostat kanseri MAT-Lylu hücreleri laboratuvarımıza İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı'ndan getirilmiştir. MAT-Lylu hücreleri (Şekil 3.1.) laboratuvarımızda %1 L-Glutamine, % 0,1 dexamethasone ve % 1 fetal dana serumu (FBS) ilave edilerek hazırlanmış olan Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) medium ile 37 °C sıcaklık, % 5 CO_2 ve % 100 nem koşullarını sağlayan inkübatörde yaşatılmakta ve seri pasajları yapılarak çoğaltılmaktadır.



Şekil 3.1. *İn vitro* olarak çoğaltılan MAT-LyLu hücreleri [faz-kontrast mikroskobu (x20)]

3.2.2. Mediumların hazırlanması

3.2.2.1. Deney mediumu (Naringenin)

Doğal bir bileşik olan olan naringeninin (ma: 272.25 g/mol) 1 mg'ı dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülerek 10 mM konsantrasyonlu stok solüsyon hazırlanmıştır ve +4 ºC'de ışıktan korunarak muhafaza edilmiştir. Stok çözelti,

ilaveli RPMI-1640 içerisinde dilüe edilerek 5, 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonlarda deney mediumları hazırlanmıştır.

3.2.2.2. Kontrol mediumları

Kontrol grubuna MAT-LyLu hücreleri için normal büyüme mediumu olarak kullanılan ilaveli RPMI-1640 uygulanmıştır.

Tetrodotoksin (TTX), lateral ve dikey yöndeki hücre hareketlerinin incelendiği deneylerde pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır. Üretici firmanın önerisine göre 1 mg TTX, 1 ml steril distile su içerisinde çözülerek 3132 µM konsantrasyonlu stok solüsyon hazırlanmıştır. Bu stok solüsyon porsiyonlanarak mikrotüpler içinde ve ışıktan korunarak kullanılacağı zamana kadar -20 ^{0}C'de dondurularak saklanmıştır. Deneysel uygulamalarda, stok çözelti (3132 µM), ilaveli RPMI-1640 içerisinde seyreltilerek 600 nM konsantrasyonlu medium hazırlanmıştır.

Naringenin için çözücü olarak DMSO kullanıldığından, normal büyüme mediumu içerisine deney mediumlarının hazırlanmasında kullanılan oranlarda DMSO ilave edilerek DMSO'lu kontrol grupları oluşturulmuştur.

3.2.3. Toksisite

Deneylerde kullanılan bileşiklerin, sıçan prostat kanseri hücre soyu olan MAT-LyLu hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığı tripan mavisi kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için 35 mm çaplı steril petriler içerisine $3x10^4$ hücre ekilmiştir. Hücreler ekildikten sonraki 24. ve 48. saatlerde mikroskopla kontrolleri yapılmış ve kontrol grubu petrilerine normal büyüme mediumu, deney grubu petrilerine ise 50 ve 75 µM konsantrasyonlarda naringenin içeren mediumlar eklenmiştir. Ayrıca, naringenin için çözücü olarak DMSO kullanıldığından DMSO içeren kontrol grupları da oluşturulmuştur. Hücrelerin ekilmesinden 72 saat sonra petrilerde bulunan medium çıkarılmış, 0.8 ml medium ile 0.2 ml % 4'lük tripan mavisi eklenerek 10 dk inkübe edilmiştir. 10 dk sonunda petrilerdeki tripan mavisi

içeren medium çekilerek yeni medium eklenmiştir. İnvert mikroskopta, 40x objektifle petri başına 40 mikroskop alanında canlı ve ölü hücrelerin sayıları tespit edilerek naringenin maddesinin MAT-Lylu hücrelerine toksik etkisi olup olmadığı belirlenmiştir. Bu deney üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.4. Hücre kinetiği parametreleri

3.2.4.1. Hücre proliferasyonu

Naringeninin, hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi kolorimetrik Methylthiazolydiphenly-tetrazolium bromide [Syn: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl) – 2,5 – Diphenyl – 2H – tetrazolium bromide] yöntemi ile belirlenmiştir (Mossman, 1983). Bu amaçla 96 kuyucuklu steril pleytlerin her bir kuyucuğuna $3x10^3$ MAT-Lylu hücresi ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, kontrol grubu kuyucuklarına normal büyüme mediumu, DMSO'lu kontrol grubu kuyucuklarına deney mediumlarının hazırlanmasında kullanılan oranlarda DMSO içeren mediumlar, deney grubu kuyucuklarına ise 5, 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonlarda naringenin içeren deney mediumları konmuştur. İlk medium değişiminden sonraki 24. ve 48. saatlerde kuyucuklardaki mediumlar çıkarılmış ve her kuyucuğa RPMI-1640 içinde hazırlanmış 1 mg/ml konsantrasyonlu MTT solüsyonundan 100 µl ilave edilmiştir. Pleytler folyoya sarılarak karanlıkta 37 ^oC'de 4 saat süre ile inkübe edilmiş; ardından, MTT'li medium çekilerek, 200 µl DMSO ve 50 µl glisin tamponu eklenmiştir. Eliza mikroplaka okuyucuda 570-690 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapılmıştır. Bu deney üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.4.2. Mitoz indeksi

Naringeninin MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 12 kuyucuklu pleytlerin her kuyucuğuna bir lamel yerleştirilmiş ve her lamele 10^4 hücre ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra deney kuyucuklarına belirlenen konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 75 µM) deney mediumları, kontrol gruplarına ise normal büyüme mediumu ile deney mediumlarının hazırlandığı oranda

DMSO içeren kontrol medyumları ilave edilerek 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda, lamellerdeki hücreler, asetik asit – etanol (1:3) ile 10 dk. fikse edilip 3 kez 5'er dk. % 70 etanol ile muamele edilmiştir. Lameller, hücreler üstte kalacak şekilde lamlara yapıştırılarak Feulgen yöntemi ile boyamaları gerçekleştirilmiştir. Feulgen boyama yönteminde preparatlar öncelikle 5 N hidroklorik asit içinde 1 saat tutularak hidroliz edilmiş daha sonra 1 saat Schiff ayracında bekletilerek boyama gerçekleştirilmiştir. Her preparatta ortalama 1000 hücre olmak üzere toplam 4000-6000 hücrede (C) metafaz, anafaz, ve telofaz evreleri sayılarak mitotik hücre sayısı (n) tespit edilmiştir. Elde edilen verilerden aşağıdaki formül (3.1) kullanılarak, mitoz indeksi (MI) değerleri (%) hesaplanmıştır (Bancroft 1990; Özalpan 2001).

$$MI = (n / C) \times 100 \qquad (3.1)$$

n: Mitotik hücre sayısı

C: Toplam hücre sayısı

3.2.5. Hücre hareketi analizleri

3.2.5.1. Yara kapanma yöntemi

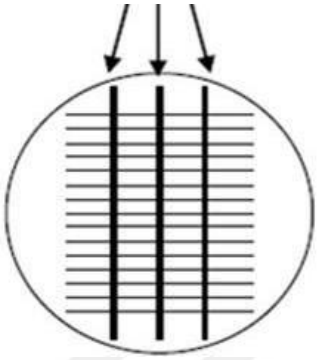
Naringeninin, güçlü metastatik karaktere sahip sıçan prostat kanser hücresi olan MAT-LyLu hücrelerinin lateral yöndeki hareket yetenekleri üzerindeki etkisi, yara kapanma yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, kontrol [kontrol, pozitif kontrol (TTX), DMSO'lu kontrol] ve deney grupları oluşturulmuştur. 35 mm çaplı petrilerin alt yüzeyine 15 adet yatay ve 3 adet dikey çizgi çizilmiştir (Şekil 3.2.). Petrilerin her birine $15x10^4$ MAT-LyLu hücresi ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, petrilerde oluşan tek tabaka kültürde, steril pipet ucu kullanılarak dikey çizgiler üzerinden 3 adet yara açılmıştır. Petrilerdeki mediumlar çıkarılıp kontrol ve deney mediumları eklendikten sonra, invert mikroskopta her petrideki yatay ve dikey çizgilerin kesiştiği 45 noktada, açılan yaraların genişlikleri ölçülmüş ve 0. saat yara genişlik değeri (W_0) olarak kaydedilmiştir. 24 saatte bir olmak üzere petrilerin mediumları değiştirilmiş; 0. saatte ölçüm yapılan noktalardaki yara genişlikleri 24.

ve 48. saatlerde tekrar ölçülmüş (W_t) ve kaydedilmiştir. Aşağıdaki formül (3.2) kullanılarak ölçüm sonuçlarından her petrideki ortalama motilite indeksi değerleri hesaplanmıştır. Deneylerde her grup için üçer petri kullanılmış ve her deney en az üç kez tekrarlanmıştır.

$$MoI = 1 - (W_t / W_0) \quad (3.2)$$

W_0: 0. saatteki yara genişliği

W_t: 24. ve 48. saatlerdeki yara genişlikleri

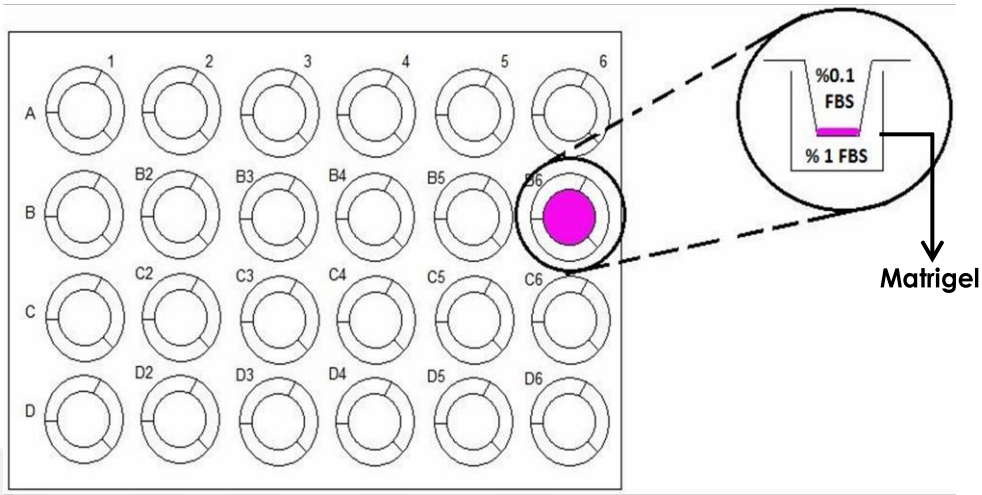


Şekil 3.2. Lateral hücre hareketini belirleyebilmek için kullanılan petrinin tabanına yapılan çizim

3.2.5.2. Transwell invazyon analizi

Naringeninin güçlü metastatik özellikteki sıçan prostat kanser hücresi olan MAT-LyLu hücrelerinin dikey yöndeki hareket yetenekleri üzerindeki etkisi, invazyon analizi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 24 kuyucuklu pleytin kuyucukları içerisine 8.0 μm por çaplı insertler yerleştirilmiş ve insertlerin tabanı 1:7 oranında hazırlanan matrigel (1 ml matrigel : 7 ml % 1 L-Glutamine ilave edilmiş RPMI) ile kaplanmıştır. % 1 L-Glutamin içeren RPMI ile rehidrate edildikten sonra pleyt kuyucuklarına % 1 FBS insertlerin içerisine ise % 0.1 FBS içeren deney ve kontrol [kontrol, pozitif kontrol (TTX) ve DMSO'lu kontrol] mediumları eklenmiş ve her inserte $4x10^4$ hücre ekilerek 48 saat kültür ortamında yaşatılmıştır (Şekil 3.3.). 48. saat sonunda pleyt kuyucuğundaki ve insert içerisindeki mediumlar atılarak her insert 2 kez fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra 20 dk % 96'lık metanol ile fikse edilmiştir. Ardından May-Grünwald eklenip 3 dk sonunda PBS ile yıkandıktan

sonra 8 dk Giemsa içerisinde bekletilip bazal membranı geçen hücrelerin boyanması sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra x40'lık objektifte her insert için 12 alan sayılarak istatistiksel hesaplamaları yapılmıştır.



Şekil 3.3. Pleyt kuyucukları içerisine insertlerin yerleştirilmesi

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

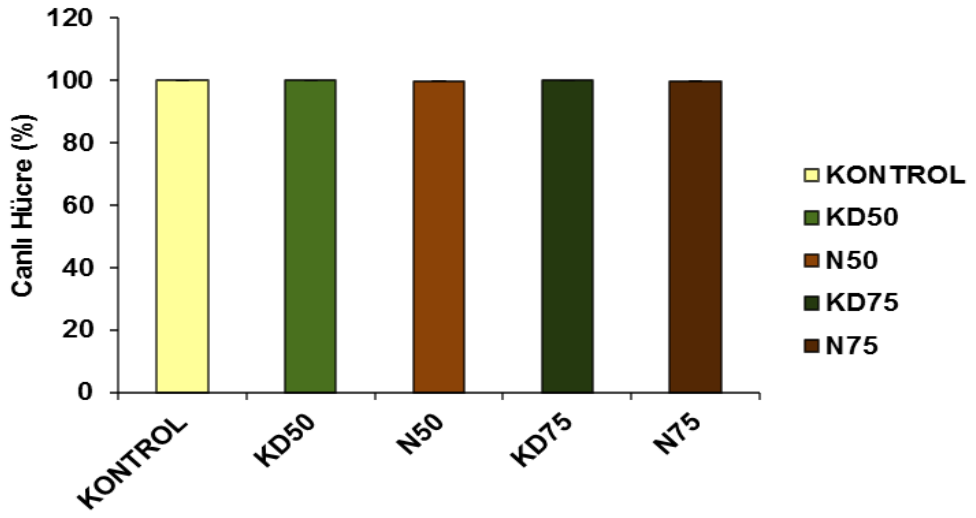
Deneylerden elde edilen veriler, aritmetik ortalamalar ve her bir ortalama değerin standart hatası (±SH) şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, Excel (Office 2010) programında ANOVA varyans analizi, student *t*-testi ve yüzde değerlerin karşılaştırılması testi kullanılarak değerlendirilmiş; anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Naringenin, greyfurt bitkisinde bulunan bir flavanoid bileşik olup, bu çalışmada naringeninin Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücre soyu olan yüksek metastatik özellikteki MAT-Lylu hücrelerine öncelikle toksik etki yapmayan konsantrasyonları belirlenmiştir. Ardından, bu bileşiğin, hücrelerin proliferasyon, ve mitotik aktivite gibi hücre kinetiği parametreleri ile hücre hareketi (migrasyon ve invazyon) üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

4.1.Toksisite

Naringeninin sıçan prostat kanser hücresi olan MAT-Lylu üzerinde toksik bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.3'te anlatılan şekilde tripan mavisi kullanılarak toksisite testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 75 µM ve daha düşük konsantrasyonlarda uygulanan naringeninin, MAT-Lylu hücreleri üzerinde toksik bir etki meydana getirmediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde naringenin için çözücü olarak kullanılan DMSO'nun eklendiği kontrol guplarında da belirlenen konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etki oluşmadığı görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Toksisite grafiği: Deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonlardaki naringeninin MAT-LyLu hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri. ($p>0.05$)

4.2. Hücre Kinetiği Üzerindeki Etkiler

4.2.1. Proliferasyon

Bu çalışmada, bir flavonoid bileşik olan naringeninin, Duning modeli sıçan prostat kanseri MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerinde nasıl bir etki yaptığını tespit etmek için, toksik olmadığı belirlenen konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 75 µM) naringenin içeren deney mediumları, 24 ila 48 saat boyunca hücrelere uygulanmış ve Bölüm 3.2.4.1'de anlatılan şekilde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden öncelikle DMSO'lu kontrol gruplarının absorbans değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Ardından, DMSO'lu kontrol gruplarının absorbansları 1 kabul edilerek deney gruplarına ait normalize edilmiş hücre sayıları hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de sunulan bu veriler kullanılarak, normalize edilmiş canlı hücre sayısının zamana (Şekil 4.2) ve konsantrasyona (Şekil 4.3) göre grafikleri çizilmiştir. DMSO' lu kontrol gruplarında normalize edilmiş hücre sayıları 100 kabul edilerek deney gruplarında naringenin uygulamasından sonraki 24. ve 48. saatlerde hücre çoğalması üzerindeki inhibisyon oranları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). 48. saatteki inhibisyon oranı verileri ile çizilen grafik Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

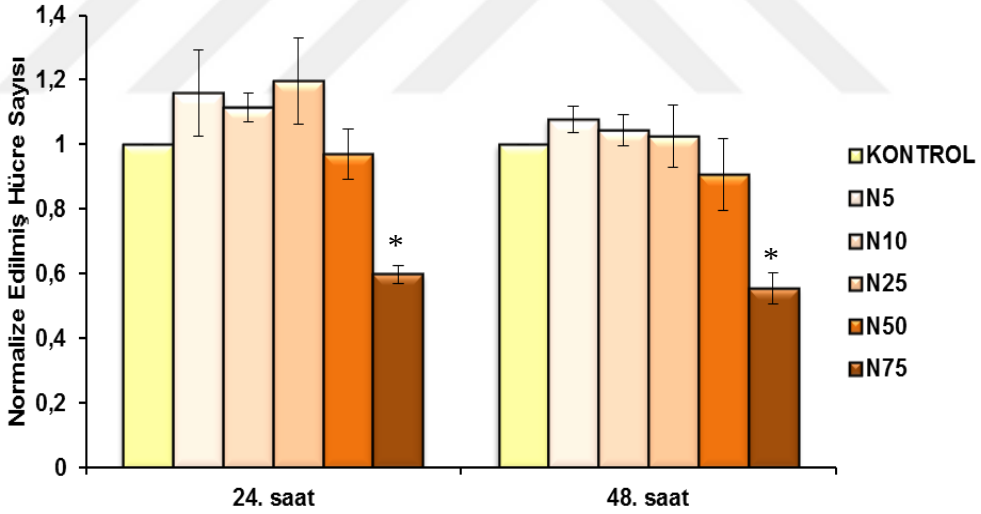
Normalize edilen canlı hücre sayıları ve inhibisyon oranları incelendiğinde, 24. saatte, 5, 10 ve 25 µM konsantrasyonlarda naringeninin MAT-Lylu hücre proliferasyonu üzerinde inhibe edici etkisi olmadığı; 50 ve 75 µM konsantrasyonlarda naringenin uygulanan deney gruplarında ise canlı hücre sayısının azalarak sırasıyla 0.96 ± 0.07 ve 0.59 ± 0.02 olduğu tespit edilmiştir. Naringenin uygulamasına 48 saat süreyle devam edildiğinde canlı hücre sayısının konsantrasyon artışı ve uygulama süresinin uzamasıyla azaldığı görülmektedir (Şekil 4.2., Şekil 4.3.). 48. saatte ölçülen canlı hücre sayısı naringeninin 50 µM konsantrasyonda uygulanmasıyla 0.90 ± 0.10, 75 µM konsantrasyonda uygulanmasıyla 0.55 ± 0.04 bulunmuştur. Elde edilen veriler istatistiksel bakımdan değerlendirilmiş ve 75 µM konsantrasyonda naringenin uygulamasının hem 24. hem de 48. saatte MAT-Lylu

hücre proliferasyonunu anlamlı ($p<0.05$) şekilde inhibe ettiği saptanmıştır. (Çizelge 4.1, Şekil 4.2., Şekil 4.3.).

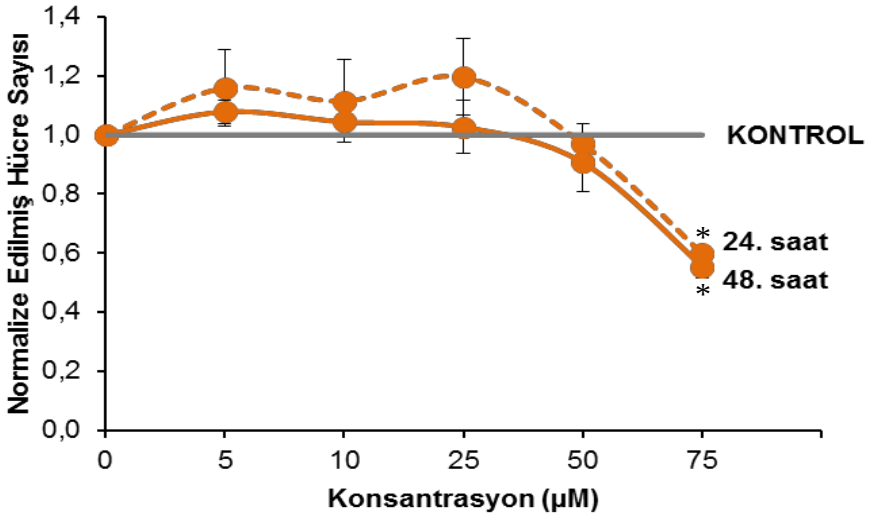
Çizelge 4.1. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda naringenin uygulaması sonucu elde edilen normalize edilen hücre sayıları ve inhibisyon oranları (%)

	Normalize edilmiş hücre sayısı		% İnhibisyon	
	24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol	1.00±0.00	1.00±0.00	-	-
N5	1.15±0.13	1.07±0.04	-15.0	-7.00
N10	1.11±0.14	1.04±0.04	-11.0	-4.00
N25	1.19±0.13	1.02±0.09	-19.0	-2.00
N50	0.96±0.07	0.90±0.10	4.00	10.0
N75	0.59±0.02*	0.55±0.04*	41.0*	45.0*

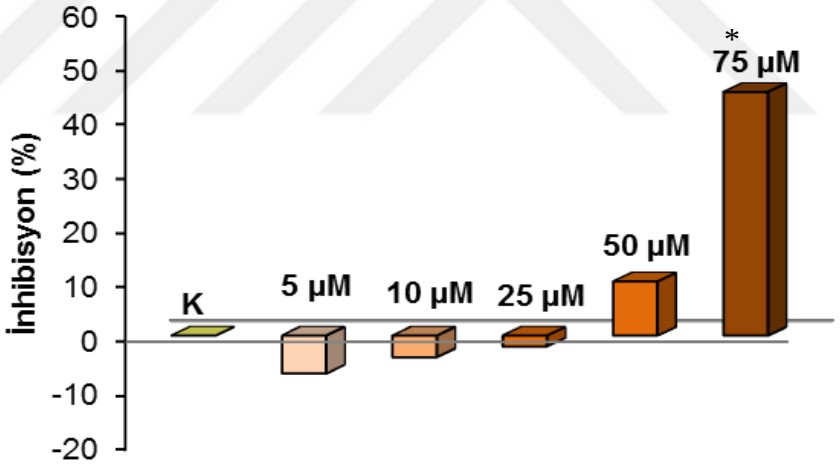
*: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.2. MAT-LyLu hücreleri üzerine Naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen normalize edilmiş hücre sayılarının zamana bağlı grafiği (±SH). *: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)



Şekil 4.3. MAT-LyLu hücreleri üzerine naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen normalize edilmiş hücre sayılarının konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). *: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)



Şekil 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda 48 saat süreyle uygulanması sonucu elde edilen inhibisyon oranları. *: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

Literatürde, naringeninin ve onun çeşitli doğal veya sentetik türevlerinin bazı prostat kanseri hücre soyları üzerinde antiproliferatif aktivite gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. İnsan prostat kanseri PC-3 hücrelerine 48 saat süreyle uygulanan 100 µM naringeninin hücre proliferasyonu üzerindeki inhibisyon etkisinin % 25'ten az olduğu (Knowles ve ark, 2000); DU-145 hücrelerinin çoğalmasını % 50

oranında inhibe eden konsantrasyonun 150 µM olduğu (Manthey ve Guthrie, 2002) bildirilmiştir. Çalışmamızda sıçan prostat kanseri hücre soyu olan MAT-Lylu hücrelerine uyguladığımız 75 µM naringenin, hücre proliferasyonunu 24. saatte % 41 oranında inhibe ederken uygulama süresinin uzamasıyla 48. saatte inhibisyon oranı % 45'e yükselmiştir.

Campbell ve ark. (2006), farklı konsantrasyonlarda (12.5 – 40 µM) naringenin uygulamasının LNCaP hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak zayıf şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca naringeninin, quercetin ve kaempferol gibi başka flavanoidlerle kombine edilerek LNCaP hücrelerine uygulanmasıyla daha kuvvetli inhibisyon oluştuğunu tespit etmişlerdir (Campbell ve ark., 2006). PC-3 insan prostat kanseri hücrelerine naringeninin tek başına ve α-tokoferol ile kombine edilerek uygulandığı bir başka araştırmada, bileşiklerin hücrelerde transglutaminaz aktivitesinin arttırdığı belirlenmiştir (Torricelli ve ark., 2011). Sak (2014), diyetle alınan flavanoidlerin farklı insan kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelediği derlemesinde naringeninin androjen reseptörü taşıyan insan prostat kanseri hücrelerine karşı çok düşük aktivite gösterirken androjen bağımsız insan prostat kanseri hücrelerinin büyümesinin baskıladığını ifade etmiştir. Gao ve ark. (2006), naringeninin, LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde DNA tamir enziminin ekspresyonunu arttırarak bu hücreleri mutajenik değişikliklere karşı koruduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise *Humulus lupulus* bitkisinden izole edilen naringenin türevi 6-prenilnaringenin bileşiğinin, PC-3 ve DU-145 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (Delmulle ve ark., 2006).

Naringenin ve türevlerinin meme (Harmon ve Patel, 2004; Filho ve ark., 2014), kolon (Frydoonfar ve ark., 2003; Yoon ve ark., 2013; Song ve ark.,2016), akciğer (Sak, 2014), mide (Ekambaram ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2015), karaciğer (Totta ve ark., 2004; Chu ve ark., 2016), rahim ağzı (Chen ve ark., 2016), mesane (Liao ve ark., 2014), kanserleriyle lösemi (Li ve ark., 2015) gibi bazı hücre soyları üzerinde de antiproliferatif aktivite sergilediği bildirilmiştir.

Harmon ve Patel (2004), meme kanseri MCF-7 hücrelerine uygulanan 10 µM naringeninin glukoz alımını % 25 oranında inhibe ederek proliferasyonu baskıladığını göstermişlerdir. Frydoonfar ve ark. (2003), naringeninin 0.71-2.85 mmol arasında değişen konsantrasyonlarının HT-29 kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu doza bağlı olarak inhibe ettiğini; Song ve ark., (2016) ise (HCT116 ve SW480 kolon kanseri hücre soylarında) 100 µM konsantrasyonda uygulanan naringeninin p38'i aktive edip ATF 3 (aktive edici transkripsiyon faktörü 3) protein seviyesini arttırarak apoptozu indüklediğini, böylece canlı hücre sayısını azalttığını tespit etmişlerdir. Naringeninin farklı türevlerini tasarlayıp sentez eden Yoon ve ark. (2013), HCT116 hücrelerine uyguladıkları bu bileşiklerin hücre proliferasyonu üzerinde naringeninden daha yüksek bir inhibisyon meydana getirdiğini gözlemlemişlerdir. Meme kanseri hücre soyları MDA-MB231 ve MCF-10A ile çalışan başka bir araştırıcı grubu, naringenin ve onun sentetik türevi naringenin Cu(II)-2,2'-bipyridine (NGENCuB) bileşiklerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini karşılaştırmışlar ve 100 µM konsantrasyonda NGENCuB bileşiğinin naringeninden daha etkin olduğunu ve her iki hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır. Aynı çalışmada naringeninin MDA-MB231 hücre proliferasyonunu 500 – 1000 µM konsantrasyonlarında uygulanmasıyla % 60 oranında azalttığı bildirilmiştir (Filho ve ark., 2014). Bak ve ark., (2011), naringeninin sentetik bir türevini sentez etmişler ve bu bileşiğin akciğer kanseri hücre soyları A549 ve NCI - H460 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca naringenin türevi bu yeni bileşiğin bu hücre soylarında Fas/Fas L ekspresyonunu arttırarak, kaspazları aktive ederek, PI3K/Akt sinyalini baskılayarak apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (Bak ve ark., 2011).

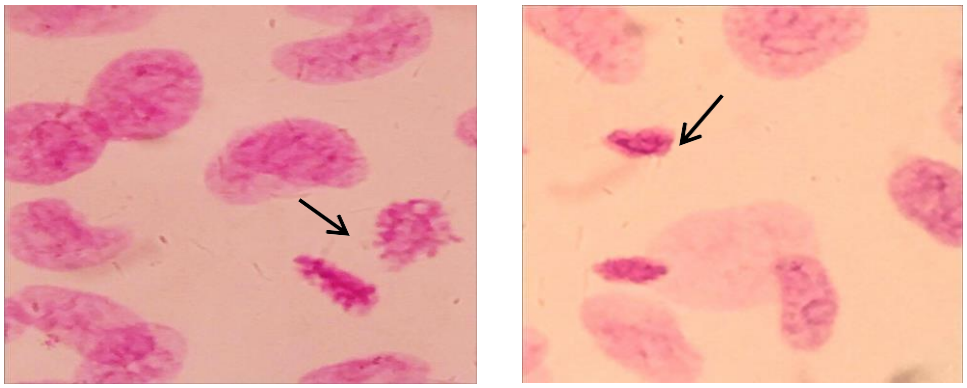
Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş mide kanserinde, naringeninin, tümör boyutunu ve ağırlığını azalttığı *in vivo* olarak gösterilmiştir (Ekambaram ve ark., 2008). Zhang ve ark., (2015), SGC7901 mide kanseri hücrelerinde naringeninin hücre çoğalmasını ve koloni oluşumunu engellediğini saptamışlardır. Karaciğer hücreleri ile yapılan bir çalışmada 17β- östradiolü taklit ederek östrojen reseptörüne bağlanan naringeninin HepG2 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Totta ve ark., 2004). Chu ve ark., (2016) ise naringenin ile naringeninden

ürettikleri eriodiktyolün, antikanser ve antibakteriyel aktivitelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında eriodiktyolün naringeninden daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Naringeninin (25-300 µM) mesane kanseri TSGH-8301 hücrelerinin proliferasyonunu dozun artışıyla uyumlu olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (Liao ve ark., 2014).

Literatürde, naringeninin Dunning modeli sıçan prostat kanseri MAT-Lylu hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bulgularımız bu konuda ilk olup diğer kanser hücre soyları ile yapılan araştırmalarda elde edilen verilerle uyumludur.

4.2.2. Mitoz İndeksi

Naringeninin MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için 5, 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonda naringenin içeren deney mediumları hücrelere 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmıştır. Belirtilen sürelerin sonunda Bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı şekilde Feulgen yöntemi ile boyanarak hazırlanan preparatlarda metafaz, anafaz ve telofaz evrelerindeki hücrelerin (Şekil 4.5.) sayıları kaydedilmiştir.



Şekil 4.5. MAT-LyLu hücrelerinde mitoz bölünme (ok ile işaretli) [ışık mikroskobu (x100)]

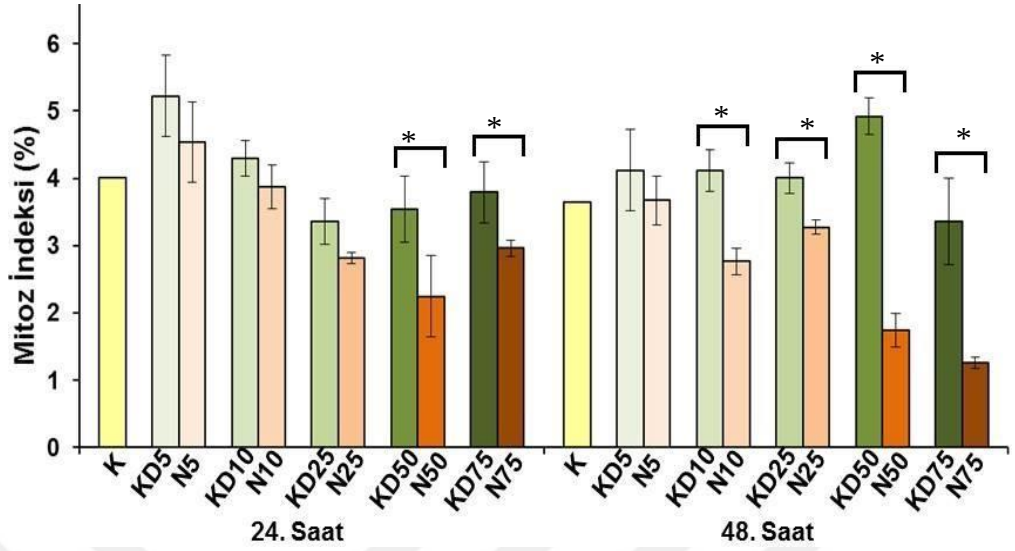
Elde edilen verilerden formül (3.1) kullanılarak hesaplanan mitoz indeksi (%) değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Mitotik indeks değerlerinin zamana bağlı çizilen grafiği Şekil 4.6'da izlenmektedir. Sadece normal büyüme mediumu

uygulanan kontrol grubunda 24. saatte % 4.00 olan mitotik indeks değeri 48. saatte % 3.64 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.2 incelendiğinde DMSO'lu kontrol gruplarında saptanan mitotik indeks değerleri ile kontrol grubundan elde edilenler arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$); naringeninin 10 µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda ise MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesinin azaldığı görülmektedir. Buna göre mitotik indeksin 48. saatte N10 grubunda % 2.76 iken N75 grubunda % 1.26'ya gerilediği dikkati çekmektedir. Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş; 24. saatte 50 ve 75 µM; 48. saatte ise 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonlarda naringenin uygulanan gruplarda tespit edilen mitoz indeksi değerleri ile kontrol (DMSO) grupları arasındaki farkın anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. MAT-LyLu hücreleri üzerine naringeninin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)	
	24. saat	**48. saat**
Kontrol	4.00±0.50	3.64±0.43
KD5	5.22±0.61	4.12±0.60
KD10	4.29±0.27	4.12±0.30
KD25	3.36±0.34	4.00±0.23
KD50	3.54±0.50	4.92±0.27
KD75	3.79±0.46	3.36±0.65
N5	4.52±0.59	3.67±0.36
N10	3.87±0.32	2.76±0.19*
N25	2.81±0.08	3.27±0.10*
N50	2.24±0.60*	1.74±0.24*
N75	2.95±0.12*	1.26±0.08*

*: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.6. Mat-LyLu hücreleri üzerine naringenin maddesinin uygulanması sonucunda elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri. N: Naringenin, KD: DMSO'lu kontrol grupları. *: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

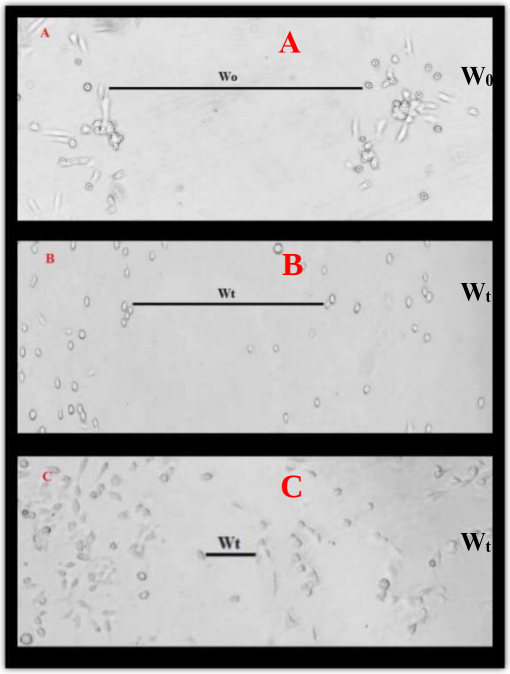
Elde ettiğimiz verilere göre sadece normal büyüme mediumu uygulanan kontrol grubunda mitotik indeks değeri 24. saatte % 4.00, 48. saatte ise % 3.64 olarak belirlenmiştir. Verilerimiz literatür bilgisi ile uyumlu olup, bir çalışmada MAT-LyLu hücrelerinin mitotik indeksinin, 24. saatte % 4.44, 48. saatte ise % 4.25 olduğu bildirilmiştir (Gümüşhan, 2010). Sabarinathan ve ark. (2011), C6 glioma taşıyan sıçanlara ağız yoluyla ve 30 gün süreyle 50 mg/kg naringenin uygulanması sonucunda siklin D1 ve CDK4 ekspresyon seviyelerinin dikkat çekici biçimde azaldığını saptamışlardır. Başka bir araştırmada naringenin türevi bir bileşik olan 2S-naringeninin, vasküler düz kas hücrelerinde, hücre döngüsünü G0/G1'de tutukladığı, siklin D1, siklin E, siklin bağımlı kinazlar CDK2 ve CDK4 ile PCNA ekspresyonlarını azalttığı ve böylece DNA sentezini, mitoz bölünmeyi ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2012). Attia (2008), turunçgillerden elde edilen başka bir flavonoid olan naringinin, 50 mg/kg dozda uygulandığında, fare kemik iliğinde lomefloxacinin meydana getirdiği mutajenik hasar ile mitotik aktivitede azalmayı önlemeye yardımcı olabileceğini göstermiştir.

4.3. Hücre Hareketi Üzerindeki Etkiler

Naringeninin, yüksek metastatik özellikteki MAT-LyLu hücrelerinin hareket yeteneği üzerindeki etkilerini incelemek için bileşiğin hücre proliferasyonu üzerinde etki oluşturmayan konsantrasyonları (5 ve 10 μM) ile çalışılmıştır. Bu amaçla lateral yöndeki hücre hareketi Bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı gibi yara kapanma analizi; dikey yöndeki hücre hareketi ise Bölüm 3.2.5.2'de anlatıldığı şekilde invazyon analizi ile değerlendirilmiştir.

4.3.1. Migrasyon (yara kapanma analizi)

Kontrol, pozitif kontrol (TTX), DMSO'lu kontrol ve deney (naringenin) grubu petrilerde oluşturulan yara genişlikleri 0, 24 ve 48. saatlerde ölçülerek kaydedilmiştir (Şekil 4.7.). Ölçüm sonuçları formül (3.2)'de yerine konarak hücrelerin motilite indeksleri hesaplanmıştır. Her grupta tespit edilen 24. ve 48. saatlerdeki motilite indeksi ortalamaları ile kontrole göre motilite indeksinde meydana gelen değişim oranları (%) Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Motilite indeksi ortalamalarının zamana göre çizilen grafiği ise Şekil 4.8'de verilmiştir. Çizelge değerleri ve grafik incelendiğinde sadece normal büyüme mediumu uygulanan kontrol grubunda 24. saatte 0.35±0.02 olan motilite indeksinin naringenin konsantrasyonu kadar DMSO içeren kontrol gruplarında (KD5 ve KD10) 0.37±0.01 ve 0.37±0.02 olduğu görülmektedir. 48. saatte de motilite indeksleri DMSO'lu kontrol gruplarında (KD5: 0.68±0.01 KD10: 0.67±0.02) kontrol grubu (0.65±0.01) ile benzer bulunmuştur. Kontrol ve DMSO'lu kontrol grupları arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. MAT-LyLu hücrelerinde hücre hareketi A) 0. saatte (W_0), B) 24. saatte (W_t) ve C) 48. saatte (W_t) ölçülen yara genişlikleri

Spesifik bir VGSC bloklayıcısı olan ve deneylerimizde pozitif kontrol olarak kullandığımız TTX için literatürde 200nM (Yıldırım ve ark., 2012), 600 nM (Gumushan-Aktas ve Altun, 2016) ve 6 µM (Fraser ve ark., 1999; Fraser ve ark., 2003) konsantrasyonlarda uygulandığında MAT-LyLu hücreleri üzerinde hücre proliferasyonunu inhibe edici veya toksik herhangi bir etki oluşturmadığı; ayrıca hücrelerin lateral yöndeki hareketini baskıladığı bildirilmiştir. Elde ettiğimiz veriler literatür ile uyumlu olup 600 nM konsantrasyondaki TTX'in MAT-LyLu hücrelerinin lateral yöndeki hareketlerini baskılayarak 48. saatte kontrol grubunda 0.65±0.01 olan motilite indeksini 0.50±0.03'e düşürdüğü tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucuna göre her iki deney saatinde kontrol ile TTX (600 nM) gruplarının motilite indeksleri arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır. Bu bulgu aynı zamanda, deneylerimizde kullandığımız MAT-LyLu hücrelerinin VGSC'leri eksprese ettiğini ve yüksek metastatik karakterini koruduğunu göstermektedir.

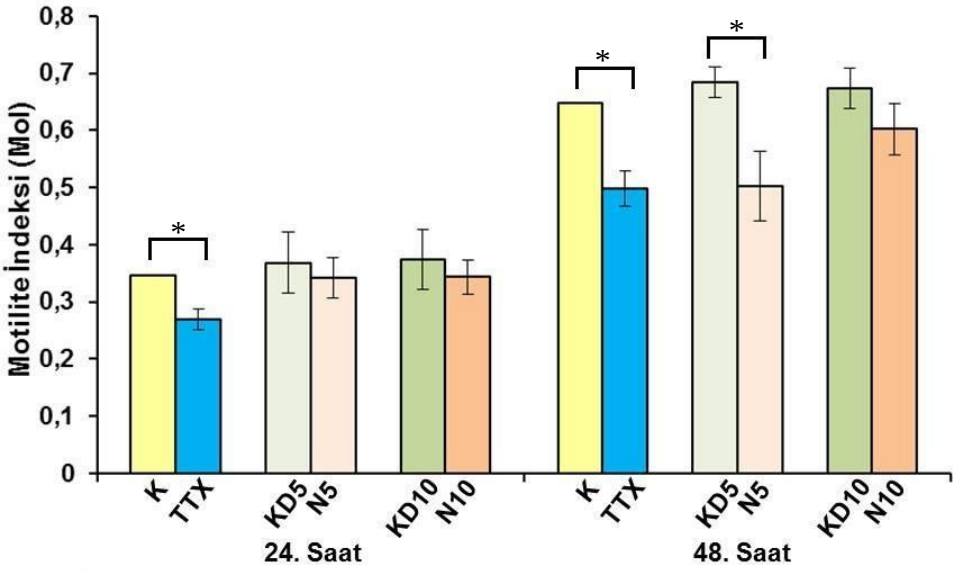
Çizelge 4.3. ve Şekil 4.8. incelendiğinde MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonunu etkilemeyen 5 ve 10 µM konsantrasyonlardaki naringeninin 24 ve

48 saat süreyle uygulanması sonucunda hücrelerin hareket ettikleri mesafenin konsantrasyon artışından bağımsız olarak azaldığı görülmektedir. KD5 grubunda 24. saatte 0.37±0.01 olan motilite indeksi 5 µM naringenin uygulanmasıyla 0.34±0.04'e gerilemiştir. Motilite indeksindeki azalmanın uygulama süresinin uzamasıyla arttığı ve 48. saatte KD5 grubunda 0.68±0.01 olarak ölçülen motilite indeksinin naringenin (5 µM) uygulanmasıyla % 26.5 oranında azalarak 0.50±0.06 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve 48. saatte KD5 ve N5 gruplarının motilite indeksleri arasındaki farkın anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. MAT-LyLu hücrelerine 10 µM konsantrasyonda naringenin uygulanmasıyla motilite indeksi hem 24 (KD10: 0.37±0.02; N10: 0.34±0.03) hem de 48. saatte (KD10 0.67±0.01; N10: 0.60±0.05) azalmış ancak aradaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. MAT-LyLu hücreleri üzerine Naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (±SH) değerleri ve kontrol grubuna oranla deney gruplarının motilite indekslerinde tespit edilen % değişim oranları

	Motilite İndeksi (MoI) [a]		**Motilite İndeksindeki Değişim (%) [b]**	
	24. saat	**48. saat**	**24. saat**	**48. saat**
Kontrol	0.35±0.01	0.65±0.01	--	--
TTX (600 nM)	0.27±0.01	0.50±0.03	22.86 (↓)*$^{\Psi}$	23.07 (↓)*$^{\Psi}$
KD5	0.37±0.01	0.68±0.01	--	--
KD10	0.37±0.02	0.67±0.01	--	--
N5	0.36±0.04	0.50±0.06	2.70 (↓)$^{\gamma}$	26.47 (↓)*$^{\gamma}$
N10	0.34±0.03	0.60±0.05	8.11 (↓)$^{\gamma}$	10.45 (↓)$^{\gamma}$

a: MoI = 1 - (W_t / W_0)
b: (↓): Motilite indeksinde azalış.
***:** İstatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0,05$).
$^{\Psi}$: Kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.
$^{\gamma}$: DMSO'lu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

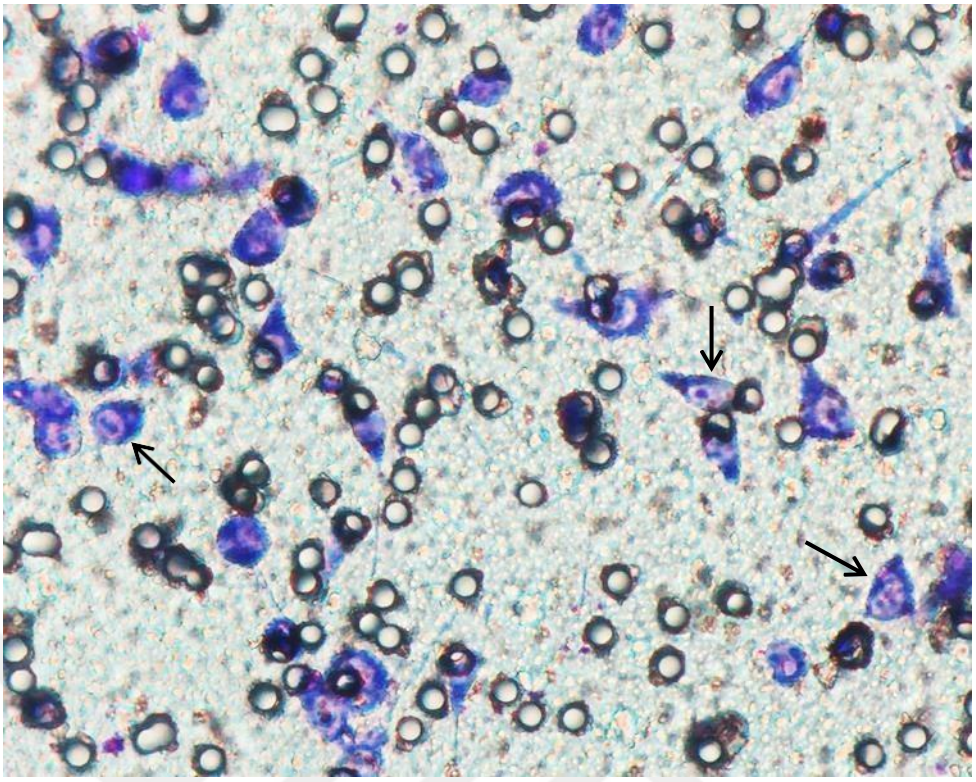


Şekil 4.8. MAT-LyLu hücreleri üzerine Narigenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksleri (MoI). K: Kontrol, TTX: Pozitif kontrol, N: Naringenin, KD: DMSO'lu kontrol grupları
*: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

Literatürde; doğal bileşik naringeninin, VGSC'leri aşırı şekilde eksprese eden (Diss ve ark., 1998) ve güçlü metastatik karakterinin VGSC ekspresyonu ile bağlantılı olduğu daha önceki çalışmalarla ortaya çıkarılmış olan MAT-LyLu hücrelerinin (Smith ve ark., 1998) lateral yöndeki hareketi üzerindeki etkisini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan bulgularımız sahadaki ilk verilerdir.

4.3.2. İnvazyon

Naringeninin, MAT-LyLu hücrelerinin dikey yöndeki hareketi üzerindeki etkisini incelemek üzere Bölüm 3.2.5.2'de anlatılan şekilde invazyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kontrol, pozitif kontrol (TTX 600nM), DMSO'lu kontrol (KD5, KD10) ile migrasyon deneyinde de kullanılan konsantrasyonlarda (5 ve 10 μM) naringenin içeren mediumların uygulandığı deney grupları (N5, N10) oluşturulmuştur. 48 saatlik uygulama süresi sonunda bazal membranlar boyanarak sayımları yapılmış (Şekil 4.9.) ve veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



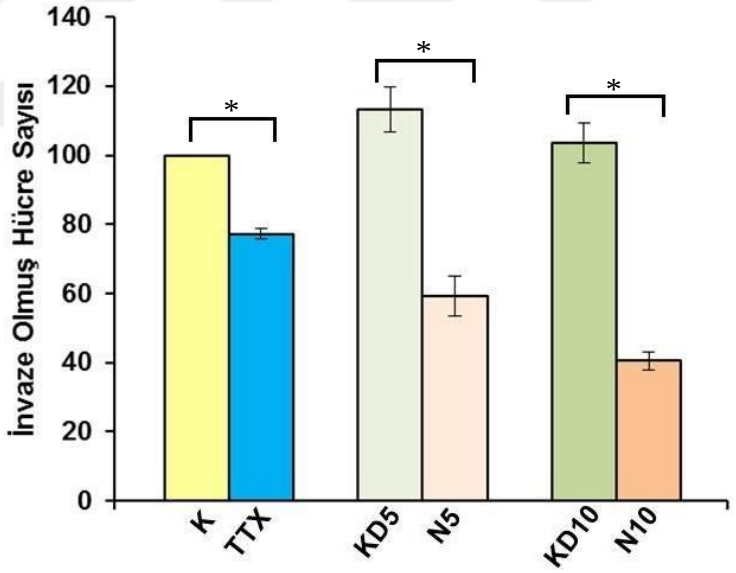
Şekil 4.9. Normal büyüme mediumu uygulanmış grupta (Kontrol) invaze olmuş MAT-LyLu hücreleri (ok ile işaretli). [invert mikroskop(x40)]

Elde edilen veriler Çizelge 4.4.'te, bu veriler ile çizilen grafik Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak uyguladığımız 600 nM TTX'in, invaze olmuş MAT-LyLu hücre sayısını kontrole göre % 22.7 oranında azalttığı ve aradaki bu farkın istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımız literatür ile uyumlu olup Grimes ve ark. (1995), 600 nM TTX'in MAT-LyLu hücrelerinde invazyonu % 14 – 51 aralığında olmak üzere ortalama % 32.9 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Bulgularımıza göre DMSO'lu kontrol gruplarında saptanan invaze olmuş hücre sayısının kontrol ile benzer olduğu ve kontrol grubu ile aralarında istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulunmadığı da ($p>0.05$) belirlenmiştir. 5 µM konsantrasyonda naringenin uygulanmasıyla invazif hücre sayısının % 47.8 oranında azaldığı saptanmıştır. Konsantrasyonun artışıyla invaze olan hücre sayısı daha da azalmış ve KD10 grubunda 103.7±11.4 iken 10 µM naringenin uygulanan N10 grubunda % 60.9'luk azalmayla 40.5±2.52 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirilmiş, sırasıyla N5 ve N10 grupları ile KD5 ve KD10 grupları arasındaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine Naringenin maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen invaze olmuş hücre sayıları (±SH) ile kontrol ve KD gruplarına oranla deney gruplarının motilite indekslerinde tespit edilen % değişim oranları.

	İnvaze olmuş hücre sayısı	**İnvaze olmuş hücre sayısındaki değişim (%)**
Kontrol	100.0±0.01	--
TTX (600 nM)	77.32±1.35*	22.69 (↓)*$^{\psi}$
KD5	113.3±15.5	--
KD10	103.6±11.4	--
N5	59.14±6.80*	47.80 (↓)*$^{\gamma}$
N10	40.54±2.51*	60.87 (↓)*$^{\gamma}$

(↓): İnvaze olmuş hücre sayısında azalış.
*: İstatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0,05$).
$^{\psi}$: Kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.
$^{\gamma}$: DMSO'lu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.10. MAT-LyLu hücreleri üzerine naringeninin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu tespit edilen invazif hücre sayısı. K: Kontrol, TTX: Pozitif kontrol (600 nM TTX), N: Naringenin, KD: DMSO'lu kontrol grupları.
*: İstatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

Literatürde, naringeninin, farklı kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu azalttığı; dolayısıyla antimetastatik aktiviteye sahip olabileceğini gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Lee ve ark. (2009), naringenini vasküler düz kas

hücrelerine uygulanmışlar ve 25 μM konsantrasyondaki naringeninin tümör nekroze edici faktör (TNFα) tarafından indüklenen matriks metalloproteinaz 9 (MMP9) ekspresyonunu inhibe ederek hücrelerin migrasyon ve invazyonunu azalttığını belirlemişlerdir. Bir araştırıcı grubu Aspc-1 ve Panc-1 pankreas kanseri hücrelerine 50 μM naringenin uygulanmasının TGF-β /Smad3 aracılı epidermal mezenşimal dönüşüm için belirteç olan vimentin ve N-kaderin ile matriks metalloproteazlar MMP2 ve MMP9 ekspresyonlarını hem mRNA hem de protein düzeyinde azalttığını böylece hücrelerin migrasyon ve invazyonunu baskıladığını göstermişlerdir (Lou ve ark., 2012). Liao ve ark., (2014) ise mesane kanseri hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 300 μM) naringenin uygulamasının MMP2'yi inhibe ederek hücre göçünü azaltıp metastazı baskıladığını tespit etmişlerdir. B16/F10 melanoma taşıyan farelere oral yolla naringenin verilen bir araştırmada, farelerin akciğerlerindeki metastaz sayısının kontrole göre % 69 oranında azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Lentini ve ark., 2007). Du ve ark., (2009), 4T1 (meme kanseri) ve LLC (akciğer kanseri) hücreleri ile akciğer metastazı; bleomisin ile pulmoner fibrozis oluşturdukları farelere 100 mg/kg naringenin uygulanmasının, akciğerde doğrudan tümör büyüme faktörü TGF-β1'i azaltarak metastazları baskıladığını ve bleomisin ile oluşturulmuş pulmoner fibrozis mikroçevresini iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir. Başka bir araştırıcı grubu, naringenin ile naringeninin bakır [Cu(II)] ve 2,2-bipyridine ile oluşturdukları kompleksinin farklı konsantrasyonlarını (1-100 μM) MDA-MB231 ve MCF-10A meme kanseri hücrelerine uygulamışlar ve bu yeni bileşiğin 100 μM konsantrasyonda MDA-MB231 hücrelerinde migrasyonu, invazyonu ve MMP9 protein seviyesini naringeninden daha yüksek oranda baskıladığını saptamışlardır (Filho ve ark., 2014).

Literatürde Naringeninin iyon kanalları üzerindeki etkilerine dair birkaç çalışma olduğu görülmüştür. Saponara ve ark., (2006), naringeninin damar genişletici aktiviteye sahip olduğunu, bu etkinin vasküler düz kas hücrelerinde Ca^{2+} ile aktive K^+ kanalı BK_{Ca}'nın aktivasyonu sayesinde gerçekleştiğini göstermişlerdir. Aynı araştırıcılar başka bir çalışmalarında quercetin, myricetin, kaempferol, naringenin gibi farklı flavoidler ile çalışmışlar ve bunlar içerisinden naringeninin kan damarında bulunan L tipi kalsiyum kanalı $Ca_v1.2$'yi blokladığını tespit etmişlerdir (Saponara ve

ark., 2011). Ancak çoğu metastatik kanserlerde ekspresyonunun kesin olarak arttığı gösterilmiş olan VGSC'ler üzerinde naringeninin aktivitesine ilişkin herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Çalışmalarımızda kullandığımız Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücreleri olan MAT-LyLu hücre soyu yüksek metastatik özelliktedir (Isaacs ve ark., 1986); VGSC ekspresyonu artmıştır (Diss ve ark., 2001) ve metastatik aktivitesi, artan VGSC ekspresyonu ile ilişkilidir (Grimes ve ark., 1995; Fraser ve ark., 1999; Djamgoz ve ark., 2001, Brackenbury ve Djamgoz, 2006). Toksik olmayan ve hücre proliferasyonunu etkilemeyen konsantrasyonlardaki (5 ve 10 µM) naringeninin hücre migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığı şeklindeki bulgularımız, bileşiğin VGSC'leri inhibe edebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, naringeninin MAT-LyLu hücrelerinin invazyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin, TTX'in ortaya çıkardığı inhibisyon etkisinden daha yüksek olması (TTX: % 22.69; 5 µM N: % 47.80; 10 µM N: % 60.87) dikkat çekicidir. Bu bakımdan bulgularımız mekanizmayı aydınlatmak üzere ileri moleküler çalışmalar yapılması için umut vericidir.

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında turunçgillerde doğal olarak bulunan bir flavonoid bileşik olan naringeninin, güçlü metastatik karakterli MAT-LyLu hücrelerinin hem kinetik özellikleri (proliferasyon, mitoz indeksi) hem de hareket yetenekleri (migrasyon, invazyon) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle tripan mavisi kullanılarak toksisite deneyi gerçekleştirilmiş; toksik etki meydana getirmeyen konsantrasyonlar (5, 10, 25, 50 ve 75 µM) baz alınarak hücre kinetiği parametleri (proliferasyon: MTT analizi; mitoz indeksi: Feulgen boyama yöntemi) incelenmiştir. Hücre proliferasyonunu etkilemeyen 5 ve 10 µM konsantrasyonlardaki naringenin, metastatik fenotipin belirteçleri olan migrasyon ve invazyon analizlerinde kullanılmıştır.

Çalışmamızda naringeninin MAT-LyLu hücrelerinin kinetik özellikleri ve hareketi üzerindeki etkileri ilk kez araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Deneylerde kullanılan konsantrasyonlarda (5-75 µM) naringenin içeren mediumlar ile deney mediumları kadar çözücü (DMSO) eklenmiş kontrol (KD) mediumlarının MAT-LyLu hücreleri üzerinde toksik etki meydana getirmediği belirlenmiştir.
2. Naringenin, 75 µM konsantrasyonda hücre çoğalmasını inhibe etmiştir. Mitotik aktivitenin 48. saatte 10, 25, 50, ve 75 µM konsantrasyonlarda proliferasyon ile uyumlu şekilde azaldığı görülmüştür.
3. Hücre proliferasyonunu etkilemeyen 5 ve 10 µM gibi düşük konsantrasyonlardaki naringeninin, hücrelerin hem lateral (migrasyon) (sadece 5 µM naringenin) hem de vertikal (invazyon) (5 ve 10 µM naringenin) yönlerdeki hareketini baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca naringeninin MAT-LyLu hücrelerinin invazyonu üzerindeki inhibe edici etkisi, TTX'in ortaya çıkardığı inhibisyon etkisinden daha yüksek bulunmuştur.

Tüm bulgular birlikte incelendiğinde naringeninin yüksek konsantrasyonlarda antiproliferatif, düşük konsantrasyonlarda ise hücre hareketini engelleyici aktiviteye sahip olabileceği ortaya çıkmaktadır. Naringenin, metastatik fenotipin belirteçleri olan migrasyon ve invazyonu inhibe etmesi nedeniyle, potansiyel VGSC blokeri bir antimetastatik ajan olarak değerlendirilmesi amacıyla ileri moleküler çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca naringenin doğal bir bileşik olduğundan günlük diyetle tüketilebilir oluşunun, kanser ve metastazların önlenmesine destek sağlayabileceği de düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

ADAMS, J.M. and CORY, S., 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene, 26: 1324–1337.

AGGARWAL, B.B., SHISHODIA, S., TAKADA, Y., BANERJEE, S., NEWMAN, R.A., BUESO-RAMOS C.E. and PRICE, J.E., 2005. Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. Clinical Cancer Research, 11(20): 1557-3265.

AKERELE, O., 1992. WHO guideline for assessment of herbal medicines. Fitoterapia, 62(2): 99-110.

ANISIMOV, V.N., UKRAINTSEVA, S.V. and YASHIN, A.I., 2005. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans?. Nature Reviews Cancer, 5: 807-819.

ANONYMUS., 2017. Naringenin. http://www.pkdiet.com/diet_naringenin.php. [Erişim tarihi: 30 Aralık 2016]

ARCANGELI, A., BECCHETTI, A., MANNINI, A., MUGNAI, G., DEFILIPPI, P., TARONE, G., DELBENE, M.R., BARLETTE, E., WANKE, E. and OLIYOTTO, M., 1993. Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. J Cell Biol., 122: 1131–1143.

ARCANGELI, A., DELBENE, M.R., RICUPURE, L., BALLERINE, L. and OLIYOTTO, M., 1988. Fibronectin hyperpolarizes the plasma membrane potential of murine erythroleukemia cells. Ann NY Acad Sci, 551: 242–244.

ATTIA, S.M. 2008. Abatement by naringin of lomefloxacin-induced genomic instability in mice. Mutagenesis, 23(6): 515-521.

AZMAN, A.M.N., SAMSUR, M., and OTHMAN, M., 2014. Distribution of Tetrodotoxin Among Tissues of Pufferfish from Sabah and Sarawak Waters. Sains Malaysiana, 43(7): 1003-1011.

BAERISWYL, V., and CHRISTOFORI, G., 2009. The angiogenic switch in carcinogenesis. Seminars in Cancer Biology, 18(5): 329–337.

BAK, Y., KIM, H., KANG, J.W., LEE, D.H., KIM, M.S., PARK, Y.S., KIM, J.H., JUNG, K.Y., LIM, Y., HONG, J. and YOON, D.Y., 2011. A Synthetic Naringenin Derivative, 5-Hydroxy-7, 40 -diacetyloxyflavanone-N-phenyl Hydrazone (N101-43), Induces Apoptosis through Up-regulation of Fas/FasL Expression and Inhibition of PI3K/Akt Signaling Pathways in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. Journal of Agriculturel and Food Chemistry, 59(18): 10286–10297.

BAK, Y., KIM, H., KANG, J.W., LEE, D.H., KIM, M.S., PARK, Y.S., KIM, J.H., JUNG, K.Y., LIM, Y., HONG, J. and YOON, D.Y., 2016. Naringenin-Mediated ATF3 Expression Contributes to Apoptosis in Human Colon Cancer. Biomolecules and Therapeutics, 24(2): 140–146.

BERGERS, G. and BENJAMIN, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nature Reviews Cancer, 3: 401-410.

BERX, G. and ROY, V.F., 2009. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biology, 1(6): a003129.

BHOWMICK, N.A., NEILSON, E.G. and MOSES, H.L., 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Nature, 18(432): 332-337.

BIELEFELDT, K., 2000. Differential effects of capsaicin on rat visceral sensory neurons. Neurosciene, 101(3): 727-36.

BLASCO, M.A., 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. Genetics, 6(8): 611-622.

BOCKMAN, C.S., BRADLEY, M.E., DANG, H.K., ZENG, W., SCOFIELD, M.A. and DOWD, F.J., 2001. Molecular and pharmacological characterization of muscarinic receptor subtypes in a rat parotid gland cell line: comparison with native parotid gland. J Pharmacol Exp Ther. 297(2): 718-26.

BODE, A.M. and DONG, Z., 2011. The two faces of capsaicin. Cancer Research, 71(8): 2809-2814.

BRACKENBURY, W.J., and DJAMGOZ, M.B.A., 2006. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na+channel expression in MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. The Journal of Physicology, 573(2): 343–356.

BUNKER, C.H., PATRICK, A.L., KONETY, B.R., BRUFSKY, A.M., VIVAS, A.M., BECICH, M.J., TRUMP, D.L. and KULLER, L.H., 2002. High prevalence of screening-detected prostate cancer among Afro-Caribbeans: the Tobago Prostate Cancer Survey. Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention, 11(8): 726-729.

BURKHART, D.L. and SAGE, A., 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. Nature Reviews Cancer 8(9): 671-682.

CAMPBELL, J.K., KING, J.L., HARMSTON, M., LILA, M.A. and ERDMAN, A.J.W., 2006. Synergistic Effects of Flavonoids on Cell Proliferation in Hepa-1c1c7 and LNCaP Cancer Cell Lines. Journal of Food Science, 71(4): 358-363.

CAMPBELL, T.M., ANA, M.J. and FITZGERALD, E.M., 2013. Functional expression of the voltage-gated Na+-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. J. Cell., 126: 4939-4949.

CANNON, L., BISHOP, D.T. and SKOLNICK, M., 1982. Genetic epidemiology of prostate cancer in the Utah Mormon genealogy. Cancer Surv, 1(1): 47-69.

CARMELIET, P., 2005. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. Oncology, 69(3): 4–10.

CARTER, B., BEATY, T.H., STEINBERG, G.D., CHILDS, B. and WALSH, P.C., 1992. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc. Natl. Acad Sci., 89(8): 3367-3371.

CATTERALL, W.A., 2000. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. Neuron, 26(1): 13–25.

CAVALLARO, U. and CHRISTOFORI, G., 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nature Reviews Cancer, 4: 118-132.

CESTELE, S. and CATTERALL, W. A., 2000, Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie, 82: 883-892.

CHENG, N., CHYTIL, A., SHYR, Y., JOLY, A. and MOSES, H.L., 2008. Transforming Growth Factor-B Signaling–Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. Moleculer Cancer Research, 6(10): 1521-1533.

CHU, L.L., PANDEY, R.P., JUNG, N., JUNG, H.J., KIM, E.H. and SOHNG, J.K., 2016. Hydroxylation of diverse flavonoids by CYP450 BM3 variants: biosynthesis of eriodictyol from naringenin in whole cells and its biological activities. Microbial Cell Factories, 15: 135.

COLLINS, A.T. and MAITLAND, N.J., 2006. Prostate cancer stem cells. European Journal of Cancer, 42(9): 1213-1298.

CRAWFORD, E.D., 2003. Epidemiology of prostate cancer. Urology, 62(6): 3-12.

CUSHNIE, T.P. and LAMB , A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26(5): 343–356.

DAVIS, C.P., 2016. Understanding Cancer: Malignant Tumors vs. Benign Tumors. http://www.onhealth.com/content/1/cancer_types_treatments. [Erişim tarihi: 1 Ocak 2017]

DELMULLE, L., BELLAHCENE, A., DHOOGE, W., COMHAIRE , F., ROELENS, F., HUVAERE , K., HEYERICK , A., CASTRONOVO , V., and KEUKELEIRE, D.D., 2006. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (Humulus lupulus L.) in human prostate cancer cell lines. Phytomedicine, 13(9-10): 732–734.

DESHPANDE, A., SICINSKI, P. and HINDS, P.W., 2005. Cyclins and CDKs in development and cancer: a perspective. Oncogone, 24: 2909–2915.

DISS; J.K.J., STEWART, D., FRASER, S.P., BLACK, J.A., HAJJ, S.D., WAXMAN, S.G.,. ARCHER, S.N., and DJAMGOZ; M.B.A., 1998. Expression of skeletal muscle-type voltage-gated Na‡ channel in rat and human prostate cancer cell lines. FEBS Letters, 427(1): 5-10.

DISS, J.K., ARCHER, S.N., HIRANO, J., FRASER, S.P. and DJAMGOZ, M.B.A., 2001. Expression profiles of voltage-gated Na+ channel α-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. The Prostate, 9: 83-91.

DJAMGOZ, M.B.A., MYCIELSKA, M., MADEJA, Z., FRASER, S.P. and 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 Journal of Cell Science, 114: 2697-2705.

DJAMGOZ, M.B.A., and ONKAL, R., 2013. Persistent Current Blockers of Voltage-Gated Sodium Channels: A Clinical Opportunity for Controlling Metastatic Disease. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 8(1): 66-84.

DJAMGOZ, M.B.A., 2014. Biophysics of Cancer: Cellular Excitability ("CELEX") Hypothesis of Metastasis. Journal of Clinical & Experimental Oncology, S1:005.

DORAI, T., CAO, Y.C., DORAI, B., BUTTYAN, R. and KATZ, A.E., 2001. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. The Prostate, 47(4): 293-303.

DU, G., JIN, L., HAN, X., SONG, Z., ZHANG, H. and LIANG, W., 2009. Naringenin: A Potential Immunomodulator for Inhibiting Lung Fibrosis and Metastasis. Cancer research, 69(7): 3205–3212.

EKAMBARAM, G., RAJENDRAN, P., MAGESH, V. and SAKTHISEKARAN, D., 2008. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N′-nitro-N nitrosoguanidine–induced gastric carcinogenesis in rats. Nutrition Research, 8(2): 106-112.

EVAN, G. and LITTLEWOOD, T., 1998. A Matter of Life and Cell Death. Science, 281(5381): 1317-1322.

FERRARA, N., 2009. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. Cytokine & Growth Factor Reviews, 21(1): 21-26.

FIDLER, I.J., 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nature Reviews Cancer, 3: 453-458.

FILHO, J.C.C., SARRIA, A.L.F., BECCENERI, A.B., FUZER, A.M., BATALHÃO, J.R., SILVA, C.M.P., CARLOS, R.M., VIEIRA, P.C., FERNANDES, J.B., and COMINETTI, R.M., 2014. Copper (II) and 2,2′-Bipyridine Complexation Improves Chemopreventive Effects of Naringenin against Breast Tumor Cells. Plos One, 9(9): e107058.

FRANZ, M.C., ANDERLE, P., BURZLE, M., SUZUKI, Y., FREEMAN, M.R., HEDIGER, M.A., and KOVACS, G., 2013. Zinc transporters in prostate cancer. Molecular Aspects of Medicine, 34(2-3): 735-741.

FOSTER, B.A., GINGRICH, J.R., KWON, E.D., MADIAS, C. and GREENBERG, N.M., 1997. Characterization of Prostatic Epithelial Cell Lines Derived from Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate (TRAMP) Model. Cancer Research, 57: 3325-3330.

FOZZARD. H.A. and LIPKIND, G.M., 2010. The Tetrodotoxin Binding Site is within the Outer Vestibule of the Sodium Channel. Marin Drugs, 8(2): 219-234.

FRASER, S.P., DING, Y., LIU, A., FOSTER, C.S., and DJAMGOZ, M.B.A., 1999. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. Cell and Tissue Research, 295(3): 505–512.

FRASER, S. P., SALVADOR, V., MANNING, E. A., MIZAL, J., ALTUN, S., RAZA, M., BERRIDGE, R. J. and DJAMGOZ, M. B. A., 2003. Contribution of functional voltage-gated Na+ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. Journal of Cellular Physiology, 195(3): 479-487.

FRASER, S.P., DISS, J.K., CHIONI, A.M., MYCIELSKA, M.E. and PAN, H., 2005. Voltage gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. Clinical Cancer Research, 11(15): 5381-5389.

FRASER, S.P. and PARDO, L.A., 2008. Ion Channels: Functional expression and therapeutic potential in cancer. Embo Reports, 9(6): 512–515.

FRASER, S.P., GUNDUZ, I.O., BRACKENBURY,W.J., FITZGERALD, E.M., CAMPBELL, T.M., COOMBES,R.C. and DJAMGOZ,M.B.A., 2014. Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: hormones, growth factors and auto-regulation. Philosophical Transactions of The Royal Society B, 369: 1638.

FRYDOONFAR, H.R., MCGRATH, D.R. and SPIGELMAN, A.D., 2005. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid Naringenin. Colorectal Disease, 5(2): 149-152.

GABRIEL P., HAAS M.D., WAEL, A. and SAKR, M.D., 1997. Epidemiology of prostate cancer. A Cancer Journal for Clinicians, 47(5): 273-287.

GAO, K., HENNING, S.M., T, NIU, Y., YOUSSEFIAN, A.A., SEERAM, N.P., XU, A., and HEBER, D., 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. The Journal of Nutritional Biochemistry, 17(2): 89-95.

GAO, R., SHEN, Y., CAI, J., LEI, M. and WANG, Z., 2010. Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. Oncology Reports, 23: 1293-1299.

GAO, W., SHI, Y., LIN, W.Y., CHIA, J., WU,C., YU, J., CHAN, W. and WONG, T.S., 2015. Diagnostic value of methylated human telomerase reverse transcriptase in human cancers: a meta-analysis. Fronties in Oncology, 5: 296.

GERSZON, J., RODACKA, A. and PUCHAŁA, M., 2014. Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases. Advances in Cell Biology, 4(2): 12-30.

GRIMES, J.A., FRASER, S.P., STEPHENS, G.J., DOWNING, J.E.G., LANIADO, M.E., FOSTER, C.S., ABEL, P.D. and DJAMGOZ, M.B.A., 1995. Differential expression of voltage-activated Na+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. FEBS Letters, 369(2-3): 290-294.

GRONBERG, H., DAMBER, L. and DAMBER, J.E., 1996. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. Cancer, 77(1): 138-143.

GOLDWASSER, J., COHEN, P.Y., LIN, W., KITSBERG, D., BALAGUER, P., POLYAK, S.J., CHUNG, R.T., YARMUSH, M.L. and NAHMIAS, Y., 2011. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. Journal of Hepatology, 55(5): 963-971.

GUMUSHAN-AKTAS, H., ALTUN, S., 2016. Effects of Hedera helix L. extracts on rat prostate cancer cell proliferation and motility. Oncology Letters, 12(4): 2985-2991.

GÜMÜŞHAN, H., 2010. Çeşitli Bitkilerden ve Hayvanlardan Elde Edilen Ekstraktların Sıçan Prostat Kanseri Üzerine Etkisi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, İstanbul, 274s.

HANAHAN, D. and FOLKMAN., 1996. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. Cell, 86(3): 353–364.

HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. Cell, 100(1): 57-70.

HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 114(5): 646-674.

HARMON, A.W. and PATEL, Y.M., 2004. Naringenin Inhibits Glucose Uptake in MCF-7 Breast Cancer Cells: A Mechanism for Impaired Cellular Proliferation. Breast Cancer Research and Treatment, 85 (2): 103-110.

HAVSTEEN, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochemical Pharmacology, 32(7): 1141–1148.

HILLE, B., 1968. Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve. The Journal of General Physiology, 51(2): 199-219.

HILLE, B., 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. University of Washington. 788s.

HOANG, B.A., SHAW, D.G., PHAM, P. and LEVINE, S.A., 2006. Neuro-bioenergetic concepts in cancer prevention and treatment. Medical Hypotheses, 68(4): 832–843.

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. and 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.

HUGO Gene Nomenclature Committee, 2016. Gene family: Sodium channels, voltage gated (SCN). http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/184.

HYNES, N.E. and MACDONALD, G., 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. Current Opinion in Cell Biology, 21(2): 177-184.

ISAACS, J.T., ISAACS, W,B., FEITZ, W.F.J. and SCHERES, J., 1986. Establishment and characterization of seven dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. The Prostate, 9(3): 261–281.

KANNAPPAN, S. and ANURADHA, C.V., 2010. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. European Journal of Nutrition, 49(2): 101–109.

KAO, C.Y. and NISHIYAMA, A., 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. The Journal of Physiology, 180(1): 50–66.

KELLE, I., 2006. Ağrı Tedavisinde Alternatif İlaçlar. Dicle Tıp Dergisi, 33(3): 192-200.

KELLER, D.I., ROUGIER, J.S., KUCERA, J.P., BENAMMAR, N., FRESSART, V., GUICHENEY, P., MADLE, A., FROMER, M., SCHLÄPFER, J., and ABRIEL, H., 2005. Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations. Cardiovascular Research, 3(24): 510-519.

KHEIFETS, J., ROZHAVSKY, B., SOLOMONOVICH, Z.G., MARIANNA, R. and SOROKSKY, A., 2012. Severe Tetrodotoxin Poisoning after Consumption of Lagocephalus sceleratus (Pufferfish, Fugu) Fished in Mediterranean Sea, Treated with Cholinesterase Inhibitor. Case Reports in Critical Care, Article ID: 782507, 3 pages.

KIM, C,S., PARK, W,H., PARK, J.Y., KANG, J.H., KIM, M.O., KAWADA, T., YOO, H., HAN, I.S. and YU, R., 2004. Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells. Journal of Medicinal Food, 7(3): 267-273.

KING, R.J.B. and ROBBINS, M.W., 2006. Cancer Biology. Pearson Education. England, 55s.

KNOWLES, L.M., ZIGROSSI, D.A., TAUBER, R.A., HIGHTOWER, C. and MILNER, J.A., 2000. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. Nutrition and Cancer, 38(1): 116-122.

KOHLER, B.A., WARD, E., MCCARTHY, B.J., SCHYMURA, M.J., RIES, L.A.G., EHEMAN, C., JEMAL, A., ANDERSON, R.N., AJANI, U.A. and EDWARDS, B.K., 2011. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2007, Featuring Tumors of the Brain and Other Nervous System. Journal of the National Cancer Institute, 103 (9): 714-736.

KUFE, D.W., POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R.R., BAST, R.C., GANSLER, T.S., HOLLAND, J.F. and FREI, E., 2003. Genitourinary tract, Neoplasm of the prostate cancer medicine. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books

KUMAR, V., ABBAS, A.K. and ASTER, J.C., 2015. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 1421s.

KUNZELMANN, K., 2016. Ion channels in regulated cell death. Cellular and Molecular Life Sciences, 73(11-12): 2387-2403.

LANGCAKE, P., and PRYCE, R.J., 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. Cellular and Molecular Life Sciences, 33(2): 151-152.

LANIADO, M.E., LALANI, E.N., FRASER, S.P., GRIMES, J.A. and BHANGAL, G., 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer lines: contribution to invasion in vitro. The American Journal of Pathology, 150(4): 1213–1221.

LEE, C.H., JEONG, T.S., CHOI, Y.K., HYUN, B.H., OH, G.T., KIM, E.H., KIM, J.R., HAN, J.L. and BOK, S.H., 2001. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. Biochemical and Biophysical Research Communications, 284(3): 681-688.

LEE, E.J., KIM, D.I., KIM, W.J., MOON, S.K., 2009. Naringin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and AKT phosphorylation in tumor necrosis factor-α-induced vascular smooth muscle cells. Molecular Nutrition Food Research, 53(12): 1582-1591.

LEE, J.H., JEONG, S.M., KIM, J.H., LEE, B.H., YOON, I.S., LEE, J.H., CHOI, S.H., KIM, D.H., RHIM, H., KIM, S.S., KIM, J.I., JANG, C.G., SONG, J.H. and NAH, S.Y., 2005. Characteristics of ginsenoside Rg3-mediated brain Na+ current inhibition. Molecular Pharmacology, 68 (4) 1114-1126.

LEE, J.J., YI, H., KIMA, I.S., KIMA, Y., NHIEM, N.X., KIM, Y.H. and MYUNG, C.S., 2012. (2S)-Naringenin from Typha angustata inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via a G0/G1 arrest. Journal of Ethnopharmacology, 139(3): 873-878.

LEE, M.J., JEONG, D.Y., KIM, W.S., KIM, H.D., KIM, C.H., PARK, W.W., PARK, Y.H., KIM, K.S., KIM, H.M., and KIM, S.D., 2000. A Tetrodotoxin-Producing Vibrio Strain, LM-1, from the Puffer Fish Fugu vermicularis radiatus. Applied and Environmental Microbiology, 66(4): 1698-1701.

LEMMON, M.A., and SCHLESSINGER, J., 2010. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Cell, 141(7): 1117-1134.

LENTINI, A., FORNI, C., PROVENZANO, B. and BENINATI, S., 2007. Enhancement of transglutaminase activity and polyamine depletion in B16-F10 melanoma cells by flavonoids naringenin and hesperitin correlate to reduction of the in vivo metastatic potential. Amino Acids, 32(1): 95-100.

LI, C.L., LIU, X.F., LI, G.X., BAN, M.Q., CHEN, J.Z., CUI, Y. ZHANG, J.H. and WU, C.F., 2016. Antinociceptive Effects of AGAP, a Recombinant Neurotoxic Polypeptide: Possible Involvement of the Tetrodotoxin-Resistant

Sodium Channels in Small Dorsal Root Ganglia Neurons. Frontiers in Pharmacology, 7: 496.

LI, J., FENG ,L., XING, Y., WANG, Y., DU, L., XU, C., CAO, J., WANG, Q., FAN, S., LIU, Q. and FAN, F., 2014. Radioprotective and Antioxidant Effect of Resveratrol in Hippocampus by Activating Sirt1. İnternatinol Journal of Molecular Sciences, 15(4): 5928-5939.

LI, R.F., FENG, Y.Q., CHEN, J.H., GE, L.T., XIAO, S.Y. and ZUO, X.L., 2015. Naringenin suppresses K562 human leukemia cell proliferation and ameliorates Adriamycin-induced oxidative damage in polymorphonuclear leukocytes. Experimental and Therapeutic Medicine, 9(3): 697–706.

LIAO, A.C.H., KUO, C.C., HUANG, Y.C., YEH, C.W., HSEUH, Y.C., LIU, J.Y. and HSU, L.S., 2014. Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP2. Molecular Medicine Reports, 10(3): 1531-1536.

LIPKIND, G.M., AND FOZZARD, H.A., 2005. Molecular Modeling of Local Anesthetic Drug Binding by Voltage-Gated Sodium Channels. Mol Pharmacol., 68:1611–1622.

LIU, L., YANG, T. and SIMON, S.A., 2004. The protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, decreases excitability of nociceptive neurons. Pain, 112(1-2): 131-141.

LO, Y,C., YANG, Y.C., WU, I.C., KUO, F.C., LIU, C.M., WANG, H.W., KUO, C.H., WU, J.Y. and WU, D.C., 2005. Capsaicin-induced cell death in a human gastric adenocarcinoma cell line. World J Gastroenterol., 11(40): 6254-6257.

LOU, C., ZHANG, F., YANG, M., ZHAO, J., ZENG, W., FANG, X., ZHANG, Y., ZHANG, C. and LIANG, W., 2012. Naringenin Decreases Invasiveness and Metastasis by Inhibiting TGF-β-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells. Plos One, 7(12): e50956.

LOWE, S.W., CEPERO, E. and EVAN, G., 2004. Intrinsic tumour suppression. Nature, 432: 307-315.

LUO, J., SHARMA, N., SEFTOR, E.A., LARCO, J.D., HEIDGER, P.M., HENDRIX, M.J.C. and LUBAROFF, D.M., 1997. Heterogeneous Expression of Invasive and Metastatic Properties in a Prostate Tumor Model. Pathology and Oncology Research, 3(4): 264-271.

MACGABHAN, F. and POPEL, A.S., 2008. Systems biology of vascular endothelial growth factors. Microcirculation, 15(8): 715-738.

MANTHEY, J.A., and GUTHRIE, N., 2002. Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six Human Cancer Cell Lines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21): 5837–5843.

MANTEGAZZA, M., CURIA, G., BIAGINI, G., RAGSDALE, D.S. and AVOLI, M., 2010. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. The Lancet Neurology, 9(4): 413-424.

MARCIL, J., WALCZAK, J.S., GUINDON, J., NGOC, A.H., LU, S. and BEAULIEU, P., 2006, Antinociceptive effects of tetrodotoxin (TTX) in rodents. British Journal of Anaesthesia, 96(6): 761-768.

MATSUBARA, S., WADA, Y., GARDNER, T.A., EGAWA, M., PARK, M.S., HSIEH, C.L., ZHAU, E.H., KAO, C., KAMIDONO, S., GILLENWATER, J.Y. and CHUNG, L.W.K., 2001. A Conditional Replication-competent Adenoviral Vector, Ad-OC-E1a, to Cotarget Prostate Cancer and Bone Stroma

in an Experimental Model of Androgen-independent Prostate Cancer Bone Metastasis. Cancer Research, 61(16): 612-619.

MEHDI, A.L., TOZAWA, K., FISHER, A., SHENTAG, L., LEE, A. and MUSCHEL, R.J., 2000. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. Nature Medicine, 6: 100-102.

MAKALE, M., 2007. Cellular mechanobiology and cancer metastasis Birth Defects Research (Part C) 81: 329–343.

MYCIELSKA, M.E. and DJAMGOZ, M.B.A., 2004. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. Journal of Cell Science, 117: 1631-1639.

NAH, S.Y., KIM, D.H. and RHIM, H., 2007. Ginsenosides: Are Any of them Candidates for Drugs Acting on the Central Nervous System? Europen Journal of Neurology, 13(4): 381-404.

NARAHASHI, T., HAAS, H.G. and TERRIEN, E.F., 1967. Saxitoxin and tetrodotoxin: Comparison of nerve blocking mechanism. Science 157(3795):1441—1442.

NARAHASHI, T., 2008. Tetrodotoxin -A brief history. Neuromorphology. Prodeceedings of The Japan Academy, Series Physical and Biological Sciences, 84(5): 147–154.

NAVONE, N.M., LOGOTHETIS, C.J., ESCHENBACH, A.C. and TRONCOSO, P., 1999. Model systems of prostate cancer: uses and limitations. Cancer and Metastasis. Nature Research, 17(4): 361-371.

NELSON, M., SLATER, R.M., FORREST, L.C., BRACKENBURY, W.J., 2014. The sodium channel β1 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.

NIETO, F.R., COBOS, E.J., TEJADA, M.A., FERNANDEZ, C.S., CANO, R.G., CENDÁN, C.M., 2012. Tetrodotoxin (TTX) as a Therapeutic Agent for Pain. Marine Drugs, 10(2): 281-305.

OLIVEIRA, J.C., ANTONIETTO, R.C.K., SCALABRINI, A.C., MARINHO, T.S., PERNOMIAN, L., WILSON, J., CORREA, N. and RESTINI, C.B.A., 2012. Antioxidant Protective Effects of the Resveratrol on the Cardiac and Vascular Tissues from Renal Hypertensive Rats. Open Journal of Medicinal Chemistry, 2: 61-71.

OLTEAN, S., FEBBO, P.G. and GARCIA-BLANCO, M.A., 2008. Dunning rat prostate adenocarcinomas and alternative splicing reporters: powerful tools to study epithelial plasticity in prostate tumors in vivo. Clinical and Experimental Metastasis, 25(6): 611-619.

ÖZALPAN, A., 2001, Temel Radyobiyoloji, 1. Baskı, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 353s.

PAN, M.H., LAI, C.S., and HO, C.T., 2010. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. Food Funct. Royal Society of Chemistry, 1: 15-31.

PERONA, R., 2006. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. Oncology, 8(2): 77-82.

PREVARSKAYA, N., SKRYMA, R. and SHUBA, Y., 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. Trends in Moleculer Medicine, 16(3): 107-121.

PIETTA, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. Journal of Natural Products, 63(7): 1035–1042.

POSTMA, S.V., and CATTERALL, W.A., 1984. Inhibition of binding of [3H]batrachotoxinin A 20-alpha-benzoate to sodium channels by local anesthetics. Molecular Pharmacology, 25 (2) 219-227.

RAICA, M., CIMPEAN, M.A. and RIBATTI, D., 2009. Angiogenesis in pre-malignant conditions. European Journal of Cancer, 45(11): 1924-1934.

RAVISHANKAR, D., RAJORA, AK., GRECO, F. and OSBORN, H.M., 2013. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. The International Journal of Biochemistry Cell Biology, 45(12):2821-2831.

REDDY, L., ODHAV,B. and BHOOLA, K.D., 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. Pharmacology & Therapeutics, 99(1): 1-13.

ROGER, S., ROLLIN, J., BARASCU, A., BESSON, P., RAYNAL, .P.I., IOCHMANN, S., LEI, M., BOUGNOUX, P., GRUEL, Y. and GUENNEC, J.Y., 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes, 1616(2): 107–111.

SABARINATHAN, D., MAHALAKSHMI, P. and VANISREE, A.J., 2011. Naringenin, a flavanone inhibits the proliferation of cerebrally implanted C6 glioma cells in rats. Chemico-Biological Interactions, 189(1-2): 26-36.

SAK, K., 2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. Pharmacognosy Rewiev, 8(16): 122–146.

SALDAMLI, İ., 1998. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 527s.

SANTELL, R.C., KIEU, N. and HELFERICH, W.G., 2000. Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. The Journal of Nutrition, 130(7): 1665-1669.

SAPONARA, S., TESTAI, L., IOZZI, D., MARTINOTTI E.,, MARTELLI, A., CHERICONI, S., SGARAGLI, G., FUSI, F. and CALDERONE, V., 2006. (+/−)-Naringenin as large conductance Ca2+-activated K+ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells. British Journal of Pharmacology, 49(8): 1013–1021.

SAPONARA, S., CAROSATI, E., MUGNAI , P., SGARAGLI, G. and FUSI, F., 2011. The flavonoid scaffold as a template for the design of modulators of the vascular Cav1.2 channels. British Journal of Pharmacology, 164: 1684–1697.

SARKAR, P.H., and LI, Y., 2003. Soy Isoflavones and Cancer Prevention. Cancer Investigation, 21(5): 744-757.

SCARDINO, P.T. 2005. Dr. Peter Scardino's Prostate Book: The Complete Guide to Overcoming Prostate Cancer, Prostatis and BPH. Vatan Yayınları, 469s.

SCHOLZ, A., VOGEL, W., 2000. Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. Pain, 89: 47–52.

SCHWAB, A., WOJNOWSKI, L., GABRIEL, K., OBERLEITHNER, H., 1994. Oscillating activity of a Ca2+-sensitive K+ channel. J Clin Invest, 93: 1631–1636.

SCHWARTZ, D.M., FIELDS, H.L., DUNCAN, K.G., DUNCAN, J.L., JONES, M.R., 1998. Experimental study of tetrodotoxin, a long-acting topical anesthetic. American Journal of Ophthalmology, 125(4): 481-487.

SHARKEY, R.G.,JOVER, E., COURAUD, F., BADEN, D.G., and CATTERALL, W.A., 1987. Allosteric modulation of neurotoxin binding to voltage-sensitive sodium channels by Ptychodiscus brevis toxin 2. Molecular Pharmocology, 31 (3) 273-278.

SHAY, J.W. and WRIGHT, W.E., 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. Molecular Cell Biology, 1: 72-76.

SHEN, C.A. and SHEN, M.M. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. 14: 2410-2434.

SHERR, C.J. and MCCORMICK, F., 2002. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell, 2(2): 103-112.

SHIRAI, T., ASAMOTO, M., AKAHASHI, S., and IMAIDA, K., 2002. Diet and prostate cancer. Toxicology, 181-182(27): 89-94.

SHIN, V.Y., LIU, E.S., KOO, M.W., LUO, J.C., SO, W.H. and CHO, C.H., 2002. Nicotine supresses gastric wound repair via the inhibition of polyamine and K+ channel expression. Europen Journal of Pharmacology, 444(1-2): 115-121.

SHISHODIA, S., AMIN, H.M., LAI, R., AGGARWAL, B.B., 2005. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. Biochemical Pharmocology, 70(5): 700-713.

SHON, K.J., STOCKER, M., TERLAU, H., STUHMER, W., JACOBSEN, R., WALKER, C., GRILLEY, M., HILLYARD, D.R., GRAY, W.R., and OLIVERA, B.M., 1998. α-Conotoxin PVIIA Is a Peptide Inhibiting the Shaker K+ Channel. The Journal of Biological Chemistry, 273: 33-38.

SIEGEL, R.L., MILLER, K.D., JEMAL, A., 2016. Cancer statistics, 2016. CA:A Cancer Journal For Clinicians, 66(1):7-30.

SIGMA-ALDRICH, 2016. Naringenin. https://www.sigmaaldrich.com/european-export.html.

SIMMONS, O.S., HOROWITZ, J.M., 2006. Biochemical and Functional Analysis of Homeoprotein Nkx3.1. North Carolina State University, 282s.

SIWAK, D.R., SHISHODIA, S., AGGARWAL, B.B., and KURZROCK, R., 2005. Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. Cancer, 104(4): 879-890.

SMITH, P., RHODES, N.P., SHORTLAND, A.P., FRASER, S.P., DJAMGOZ, M.B.A., KE, Y. and FOSTER, C.S., 1998. Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells, FEBS Letters, 423(1): 19-24.

SONG, H.M., PARK, G.H., EO, H.J. and JEONG, J.B., 2016. Naringenin-Mediated ATF3 Expression Contributes to Apoptosis in Human Colon Cancer. Biomolecules and Therapeutics, 24(2): 140–146.

STEVENS, M., PEIGNEUR, S. and TYTGAT, J., 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. Fronties in Pharmacology, 2(71): 1-13.

STEWART, B.W. and WILD, C.P., 2014. World Cancer Report 2014. Lyon: World Health Organization; IARC Nonserial Publication, 632s.

STEWART, J,R., ARTIME, M,C. and O'BRIAN, C.A., 2003. Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. The Journal of Nutrition, 133(7): 2440-2443.

STAUNTON, L.,, TONRY, C., LIS, R., ESPINA, V., LIOTTA, L., INZIATARI, R., BOWDEN, M., FABRE, A., OLEARY, J., FINN, S.P., LODA, M. and PENNINGTON, S.R., 2016. Pathology-driven Comprehensive Proteomic Profiling of the Prostate Cancer Tumour Microenvironment. Molecular Cancer Research, 15(3): 1–13.

SULAYMAN, D., DIB-HAJJ, P., JOEL, A.B. and WAXMAN, S.G., 2009. Voltage-Gated Sodium Channels: Therapeutic Targets for Pain. Pain Medicine, 10(7): 1260-1269.

TANG, X.Q., BI, H., FENG, J.Q. and CAO, J.G., 2005. Effect of curcumin on multidrug resistance in resistant human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR. Acta Pharmacol Sinica, 26(8): 1009-1016.

TENNANT, T.R., KIM, H.K., SOKOLOFF, M. and RINKER-SCHAEFFER, C.W., 2000. The Dunning model. The Prostate, 43(4): 295-302.

TIRYAKIOGLU, D., BILGIN, E., HOLDENRIEDER, S., DALAY, N. and GEZER, U., 2013. miR-141 and miR-375 induction and release are different from PSA mRNA and PCA3 upon androgen stimulation of LNCaP cells. Biomedical Reports, 1(5): 802-806.

TOCRIS,2016.Tetrodotoxin.https://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=1906#.WHTgrFWLTIU. [Erişim tarihi: 10 Ocak 2017].

TORRICELLI, P., RICCI, P., PROVENZANO, B., LENTINI, A., TABOLACCI, C., 2011. Synergic effect of α-tocopherol and naringenin in transglutaminase-induced differentiation of human prostate cancer cells. Amino Acids, 41(5): 1207–1214.

TOTTA, P. ACCONCIA, F., LEONE, S., 2004. Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: involvement of estrogen receptor α and β signalling. IUBMB Life, 56 (8): 491-498.

TUOYA, BABA, N., SHIMOISHI, Y., MURATA, Y., TADA, M., KOSEKI, M., TAKAHATA, K., 2006. Apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells. Life Sciences, 78(13): 1515-1519.

UEHARA, H., KIM, S.J., KARASHIMA, T., SHEPHERD, D.L., FAN, D., TSAN, R., KILLION, J.J., LOGOTHETIS, C., MATHEW, P. and FIDLER, I.J., 2003. Effects of Blocking Platelet-Derived Growth Factor-Receptor Signaling in a Mouse Model of Experimental Prostate Cancer Bone Metastases. Journal of the National Cancer Institute, 95(6): 458-470.

ULRICH, S., WOLTER, F. and STEIN, J.M., 2005. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. Moleculer Nutrition Food Research, 49(5): 452-461.

VIEWEG, J., ROSENTHAL, F.M., BANNERJI, R., HESTON, W.D.W., FAIR, W.R., GANSBACHER, B. and GILBOA, E., 1994. Immunotherapy of Prostate Cancer in the Dunning Rat Model: Use of Cytokine Gene Modified Tumor Vaccines. Cancer Research, 54(7): 1760-1765.

WAYNE, S.J., BAUMGARTNER, K., BAUMGARTNER, R.N., BERNSTEIN, L., BOWEN, D.J. and BARBASH, R.B., 2006. Diet quality is directly associated

with quality of life in breast cancer survivors. Breast Cancer Research and Treatment, 96(3): 227-232.

WEI, H., BOWEN, R., CAI, Q., BARNES, S. and WANG, Y., 1995. Antioxidant and Antipromotional Effects of the Soybean Isoflavone Genistein. Proc Soc Exp Biol Med., 208(1): 124-130.

WILLIAMS, G.M., WILLIAMS, C.L., and WEISBURGER, J.H., 1999. Diet and cancer prevention: the fiber first diet. Toxıcology Sciences, 52(1): 72-86.

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., TEH. C.Z., and PAFFENBARGER, R.S., 1995. Prostate Cancer in Relation to Diet, Physical Activity, and Body Size in Blacks, Whites, and Asians in the United States and Canada. J Natl Cancer Inst., 87(9): 652-661.

WILLIAMS, MANN, C.S., DUBOIS, M. and RAYMOND, N., 1999. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene, 18(55): 7908-7916.

WITSCH, E., SEKA, M. and YARDEN, Y., 2010. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. Physiology, 25(2): 85-101.

WOLTER, F., ULRICH, S. and STEIN, J., 2004. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. Moleculer Nutrition Food Research, 49(5): 452-461.

YANG, L., LI, Q., LIU, X. and LIU, S., 2016. Roles of Voltage-Gated Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels NaV1.3 and NaV1.7 in Diabetes and Painful Diabetic Neuropathy. International Journal of Molecular Sciences, 17(9): 1479.

YANG, N., LI, Q., LIU, X. and LIU, S., 2016. Roles of Voltage-Gated Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels Nav1.3 and Nav1.7 in Diabetes and Painful Diabetic Neuropathy. International Journal of Moleculer Sciences, 17(9): 1479.

YANG, Z.H., YU, H.J., PAN, A., DU, J.Y., RUAN, Y.C., KO, W.H., CHAN, H.C. and ZHOU, W.L., 2008. Cellular Mechanisms Underlying the Laxative Effect of Flavonol Naringenin on Rat Constipation Model. PLOS One, 3 (10): e3348.

YENERMAN, M., Genel Patoloji. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.1455s.

YI, L.T., LI, C.F., ZHAN, X., CUI, C.C., XIAO, F., ZHOU, L.P. and XIE, Y., 2010. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 34(7): 1223-1228.

YILDIRIM, S., ALTUN, S., GUMUSHAN, H., PATEL, A. and DJAMGOZ, M.B.A., 2012. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. Cancer Letters, 323(1): 58-61.

YOON, H., KIM,T.W., SHIN, S.Y., PARK, M.J., YONG, Y., KIM, D.W., ISLAM, T., LEE, Y.H., JUNG, K.Y. and LIM, Y., 2013. Design, synthesis and inhibitory activities of naringenin derivatives on human colon cancer cells. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 23(1): 232-238.

ZHANG, H., ZHONG, X., ZHANG,X., SHANG, D., ZHOU, Y., ZHANG, C., 2015. Enhanced anticancer effect of ABT-737 in combination with naringenin on gastric cancer cells. Experimental and Therapeutic Medicine, 11(2): 669–673.

ZHU, W., JIA, Q., WANG, Y., ZHANG, Y., XIA, M., 2012. The anthocyanin cyanidin-3-O-β-glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. Free Radical Biology and Medicine, 52(12): 314–327.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Tuba AKGÜN

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa / 06.03.1990

Telefon : 05416170403

e-mail : akgun.e.t@hotmail.com

EĞiTiM

Derece	Adı	İlçe	İl	Bitirme Yılı
Lise	: Osmangazi Lisesi	Merkez	Ş.urfa	2007
Lisans	: Harran Üniversitesi	Merkez	Ş.urfa	2013
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi	Merkez	Ş.urfa	2017

UZMANLIK ALANI

Hücre Biyolojisi : Hücre kültürü, Hücre canlılığı ve sitotoksisite testleri, in vitro yara iyileşme testleri, mitotik aktivite, invazyon testleri, Western Blot, PCR

YABANCI DiLLER: İngilizce

KATILDIĞI KONGRELER

22. ULUSAL BİYOLOJİ KONGRESİ

3rd ANTICANCER AGENT DEVELOPMENT CONGRESS