



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**DENEYSEL PROSTAT KANSERİNDE TÜMÖR  
METABOLİZMASININ LAKTAT DEHİDROJENAZ İLİŞKİLİ  
DEĞİŞİMİNİN APOPTOZ VE EPİTELYAL MEZENKİMAL  
DÖNÜŞÜM (EMT) ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

ÇAĞRI ÇAKICI

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. TÜRKAN YİĞİTBAŞI

İSTANBUL – 2021

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya  
Tez Sahibi : Çağrı ÇAKICI  
Tez Başlığı : Deneysel Prostat Kanserinde Tümör Metabolizmasının Laktat  
Dehidrojenaz İlişkili Değişiminin Apoptoz ve Epitelyal  
Mezenkimal Dönüşüm (EMT) Üzerindeki Rolü  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 21.05.2021

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Prof.Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Adnan HAŞİMİ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr.Tuğba TUNALI AKBAY

Marmara Üniversitesi

Prof.Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../ ..... tarih ve ...../..... - ..... sayılı kararı ile şekil  
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ÇAĞRI ÇAKICI

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her anda bilgi ve tecrübesi ile destek olan her daim örnek aldığımız saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Neslin Emekli'ye

Doktora Tezime ilgili araştırmanın planlanmasından, tezin basımına kadar her aşamada bana rehberlik eden sorularına ve sorunlarıma çözüm sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na

Yoğun çalışma programına rağmen dokudaki histolojik çalışmalarını geciktirmeden değerlendiren Doç. Dr. Şule Ayla'ya

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımı sırasında yanımda olan her türlü destek ve yardıma gönülden hazır olduklarını bildiğim Dr. Öğr. Üyesi Alpen Ortuğ, Öğr. Gör. Hilal Eren Gözel, Arş. Gör. Ünsal Veli Üstündağ ve Arş. Gör. Feyza Bayramoğlu'na

Sadece Doktora çalışmamda değil hayatımın her anında kendimi huzurlu ve güvende hissetmemi sağlayan benim hayatımı kendi hayatlarının önünde tutan canım annem, babam ve ablama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	5
4.GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi.....	8
4.2. Prostat Kanserinin Etiyolojisi.....	8
4.3. Prostat Kanserinde Histolojik Tipler .....	8
4.4. Prostat Kanserinin Tedavisi.....	9
4.4.1. Prostat Kanser Tedavisinde Cerrahi Olmayan Yöntemler.....	9
4.4.1.1. Androjen Yoksunluk Tedavisi .....	9
4.4.1.2. Ablatif Tedaviler .....	9
4.4.1.3. Radyasyon Tedavisi .....	10
4.4.1.4. Kemoterapi.....	10
4.4.1.5. İmmünoterapiler .....	10
4.4.2. Prostat Kanser Tedavisinde Cerrahi Yöntemler .....	11
4.5. Kanser Metabolizması .....	11
4.6. Warburg Etkisi ve Artmış Anerobik Glikoliz .....	12
4.7. Laktat Metabolizması .....	14
4.8. Laktatın Karsinogeneze Etkisi.....	15
4.9. Laktat Dehidrogenaz Alt Birimleri ve İzofomları.....	16
4.10. Kanserde Terapötik Hedef Olarak Laktat Dehidrogenaz .....	17
4.10.1. LDH İnhibisyonu .....	18
4.11. Apoptoz .....	19
4.11.1. Apoptoz Mekanizmaları .....	20

4.11.2. Apoptoz Ölçümü.....	22
4.12. Epitelyal – Mezenkimal Dönüşüm (EMT).....	23
4.12.1. EMT Belirteçleri.....	24
4.12.1.1. E-Kaderin.....	25
4.12.1.2. N-Kaderin.....	25
4.12.2. EMT Transkripsiyon Faktörleri.....	26
4.12.2.1. Twist.....	26
4.12.2.2. Snail.....	27
4.12.2.3. Zeb.....	27
4.12.3. Prostat Kanserinde EMT.....	28
4.12.4. EMT Laktat Dehidrojenaz İlişkisi.....	31
4.13. D vitamini.....	31
4.13.1. D vitamini Kanser İlişkisi.....	32
4.13.2. D vitamini Prostat Kanseri İlişkisi.....	33
4.13.3. D vitamini EMT İlişkisi.....	34
4.13.4. D vitamini Apoptoz İlişkisi.....	35
<b>5. YÖNTEM VE GEREÇLER.....</b>	<b>37</b>
5.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	37
5.2. Hücre Kültür Deneyleri.....	39
5.3. Elde edilen hücre hatlarının C57BL/6 türü farelere enjeksiyonu.....	39
5.4. Hayvan Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulanan İlaç Dozları.....	40
5.5. Kan Örneklerinin Alınması.....	42
5.6. Doku Örneklerinin Alınması.....	42
5.7. Serum Örneklerinde Bakılan Parametreler.....	43
5.7.1. CK18-M30 Elisa Testi.....	43
5.7.2 Laktat Eliza Testi.....	45
5.7.3. Total Antioksidan Kapasite.....	47
5.7.4. Total Oksidan Seviye (TOS).....	48
5.8. Doku Örneklerinde Bakılan Parametreler.....	49
5.8.1. Doku Takibi.....	49
5.8.2. Karaciğerde HE Boyama.....	50
5.8.3. Böbrekte PAS Boyama.....	50

5.8.4. TUNEL Yöntemi .....	51
5.8.5 Western Blot .....	52
5.8.6. qPCR Analizi .....	54
5.8.6.1. Total RNA izolasyonu .....	54
5.8.6.2. cDNA sentezi .....	55
5.8.6.3. RT-qPCR.....	56
<b>6. BULGULAR</b> .....	<b>58</b>
6.1. Tümör Boyutu Değişimleri .....	59
6.2. CK18-M30 ELİSA Testi ve TUNEL Yöntemi ile Apoptozun Değerlendirilmesi .....	61
6.3. Laktat ELİZA Analizinin Sonuçları .....	64
6.4 TAK Analizinin Sonuçları.....	66
6.5. TOS Analizinin Sonuçları .....	68
6.6. OSİ Analizinin Sonuçları .....	70
6.7. Karaciğerde HE İle Histopatolojik Olarak Doku Hasarının Skorlanması.....	73
6.8. Böbrekte PAS Boyaması ile Glomural Mezengial Matriks Oranı .....	75
6.9. Tümör Dokularında EMT Analizinin Sonuçları.....	77
<b>7. TARTIŞMA</b> .....	<b>83</b>
<b>8. SONUÇ</b> .....	<b>96</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b> .....	<b>97</b>
<b>10. ETİK KURUL ONAYI</b> .....	<b>118</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>120</b>

## ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ

Şekil 4.5.1. Kanser hücrelerinin metabolik adaptasyonları .....	12
Şekil 4.6.1. Warbug etkisi. Normal hücrelerde ve tümör hücrelerinde glikozun metabolik yolu.....	13
Şekil 4.7.1. Pentoz fosfat yolu ile glikoliz ara maddeleri arasındaki bağlantı.....	14
Şekil 4.7.2. Laktat dehidrojenaz reaksiyonu .....	15
Şekil 4.9.1. LDH izoformları ve yapıları .....	16
Şekil 4.10.1. LDH-A, kanserin ayırt edici özelliklerinde kritik roller oynar.....	18
Şekil 4.11.1. Apoptoz'un sitolojisi .....	20
Şekil 4.11.1.1. İntristik ve Ekstrinsik apoptoz yollarının genel işleyiş şeması.....	22
Şekil 4.12.1.1. EMT – MET dönüşümünün gösterilmesi .....	24
Şekil 4.12.2.3.1. Snail, Slug, Twist, ZEB1/2 transkripsiyon faktörlerinin E-kaderin ile ilişkisi .....	28
Şekil 4.12.3.1. Prostat kanserinde EMT mekanizması .....	31
Şekil 4.13.4.1. 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 'ün apoptoza etkisi.....	36
Şekil 5.3.1. Farenin sırtında oluşan tümörün yeri ve görünümü.....	40
Şekil 5.6.1. Farelerden çıkarılan tümör dokuları .....	42
Şekil 5.7.1. Synergy HTX multimode reader cihazı.....	43
Şekil 5.8.5.1. SDS-PAGE elektroforez cihazı ve Trans-Blot sistemi.....	53
Şekil 6.1.1. Tümör boyutlarının değişimi .....	59
Şekil 6.4.1. TAK değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi.....	66
Şekil 6.5.1. TOS değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi .....	69
Şekil 6.6.1. OSİ değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi .....	71
Şekil 6.7.2. Karaciğer HE boyama .....	74
Şekil 6.8.1. Böbrekte glomural mezengial matriks oranı yüzdesinin tedavi gruplarına göre değişimi.....	75
Şekil 6.8.2. Böbrekte PAS boyaması.....	76
Şekil 6.9.1. E-kaderin proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları.....	77
Şekil 6.9.2. N-kaderin proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları .....	78
Şekil 6.9.3. HIF-1 $\alpha$ proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları.....	79



<b>Şekil 6.9.4.</b> Snail proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları .....	80
<b>Şekil 6.9.5.</b> Slug proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları .....	81
<b>Şekil 6.9.6.</b> Twist proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları .....	82



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 4.10.1.</b> LDH inhibisyonu için kullanılan maddeler.....	19
<b>Tablo 5.2.1.</b> Tramp-C2 prostat kanser hücre hattı özellikleri.....	39
<b>Tablo 5.4.1.</b> Deney grupları.....	41
<b>Tablo 5.7.1.1.</b> Standartların Hazırlanması.....	44
<b>Tablo 5.7.2.1.</b> Standart Konsantrasyonları .....	46
<b>Tablo 5.7.3.1.</b> TAK Ölçümü İçin Deney Planı.....	48
<b>Tablo 5.7.4.1.</b> TOS Ölçümü İçin Deney Planı .....	49
<b>Tablo 5.8.5.1.</b> Western blot için kullanılan primer ve sekonder antikörlerin özellikleri.....	53
<b>Tablo 5.8.5.2.</b> Primer ve sekonder antikor için kullanılan dilüsyon oranları .....	54
<b>Tablo 5.8.6.2.1.</b> Mikro tüp içine eklenen kit bileşen hacimleri.....	55
<b>Tablo 5.8.6.2.2.</b> cDNA reaksiyon şartları.....	56
<b>Tablo 5.8.6.3.1.</b> Master karışımının hazırlanması .....	56
<b>Tablo 5.8.6.3.2.</b> qPCR döngüsü.....	57
<b>Tablo 6.1.</b> Çalışmayı tamamlayan hayvan sayıları.....	58
<b>Tablo 6.1.1.</b> Tümör boyut değişimleri.....	60
<b>Tablo 6.2.1.</b> CK18-M30 ELİZA testi sonuçları .....	61
<b>Tablo 6.3.1.</b> Laktat ELİZA testi sonuçları.....	64
<b>Tablo 6.4.1.</b> TAK sonuçları.....	66
<b>Tablo 6.5.1.</b> TOS sonuçları.....	68
<b>Tablo 6.6.1.</b> OSİ sonuçları.....	70
<b>Tablo 6.7.1.</b> Karaciğer histopatolojik doku hasarı skorlaması .....	73
<b>Tablo 6.8.1.</b> Böbrek glomerül mezengial matriks oranı .....	75

## SİMGELER VE KISALTMALAR

**PK:** Prostat kanseri

**LDH:** Laktat dehidrogenaz

**EMT:** Epitelden mezenkime geçiş

**MET:** Mezenkimal-epitelyal dönüşümün

**AYT:** Androjen yoksunluk tedavisi

**LHRH:** Lüteinizan hormon salan hormon

**HIFU:** Yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason

**RFA:** Radyofrekans ablasyonu

**PDT:** Fotodinamik terapi

**IRE:** Geri dönüşümsüz eletroporasyon

**GNP:** Altın nanopartikül ile direkt ablasyon

**BT:** Brakiterapi

**Bcl-2:** B hücresi lenfoma

**RP:** Radikal prostatektomi

**TCA:** Trikarboksilik asit döngüsü

**NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

**<sup>18</sup>F-FDG:** <sup>18</sup>F-florodeoksiglukoz

**PET:** <sup>18</sup>F-florodeoksiglukoz

**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

**SiRNA:** Küçük interferansçı RNA

**Apaf-1:** Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

**TNF:** Tümör nekroz faktör

**ECM:** Hücre dışı matriksin

**MMP:** Matriks metalloproteinaz

**EGFR:** Epidermal büyüme faktörü reseptörü

**ROS:** Reaktif oksijen türleri

**TGF $\beta$ :** Dönüştürücü büyüme faktör-beta

**FGF:** Fibroblast büyüme faktörü

**HGF:** Hepatosit büyüme faktörü

**BMP:** Kemik morfogenetik proteini

**HIF-1 $\alpha$ :** Hipoksiye bağlı faktör-1 alfa

**AR:** Androjen reseptörü

**ER $\beta$ 1:** Östrojen reseptörü  $\beta$

**25 (OH) D:** 25-hidroksi D vitamini

**1,25 (OH) 2D:** 1,25-dihidroksi vitamin D

**VDBP:** Vitamin D bağlayıcı proteini

**VDR:** D vitamini reseptörü

**RXR:** Retinoik asit reseptörü

**CDK:** Sikline bağlı kinaz

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**FBS:** Fötal sığır serum

## 1. ÖZET

### **DENEYSEL PROSTAT KANSERİNDE TÜMÖR METABOLİZMASININ LAKTAT DEHİDROJENAZ İLİŞKİLİ DEĞİŞİMİNİN APOPTOZ VE EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM (EMT) ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

Çalışmamızda oluşturulan deneysel prostat kanser modelinde LHD-A inhibitörünün 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ve Dosetaksel ile kombinasyonunun apoptoz, oksidatif stres ve EMT mekanizmaları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç için, 70 adet C57BL/6 türü erkek fare kullanılmıştır. Kontrol grubu ve 6 adet tedavi grubu oluşturulmuştur. Elde edilen serum örneklerinden CK18-M30, laktat ve total antioksidan kapasitesi, total oksidan statüsü ve oksidatif stres indeksi değerleri hesaplanmıştır. Tümör doku örneklerinden ise apoptoz analizi için TUNEL boyaması, EMT için western blot ve qPCR analizi yapılmıştır. Alınan karaciğer ve böbrek dokularında kullanılan ajanların oluşturduğu doku hasarının anlaşılması için karaciğerde hematoksilen-eozin, böbrek dokularında ise periyodik asit schiff boyaması yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde uygulanan LDH-A inhibitörü ile Warburg etkisinin tersine döndürüldüğü laktat sonuçlarına bakılarak görülmüştür. Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi gruplarının oksidatif stresi ve apoptozu istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı görülmüştür (p<0,05). Oksidatif stresin artması ile nefrotoksik olan Dosetaksel'in böbrek üzerindeki hasarı arttırdığı ancak LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavisinin oksidatif stresi daha fazla arttırmış olması ile böbrek üzerinde daha fazla hasar oluşturduğu gözlemlenmiştir. EMT üzerine etkisi incelendiğinde LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunun E-kaderin ekspresyonunu arttırdığı ve N-kaderin ekspresyonunu da anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür (p<0,05). Snail, Slug ve Twist transkripsiyon faktörlerinin de ekspresyonunu azaltmıştır (p<0,05). HIF-1 $\alpha$  protein ekspresyonunu diğer gruplardan farklı şekilde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ve bunun EMT'nin MET'e dönüşümü açısından önemli olduğu görülmüştür (p<0,05). Sonuç olarak, çalışmamızda Dosetakselin LDH-A inhibitörü ile kombine tedavisinin prostat kanseri tedavisinde, apoptoz ve metastaz mekanizmaları üzerine etkisinin tek başına Dosetaksel tedavisine göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Bu tez TÜBİTAK (1002 – 119S850) tarafından desteklenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, EMT, LDH-A inhibisyonu, Prostat kanseri



## **2. ABSTRACT**

### **THE ROLE OF LACTATE DEHYDROGENASE-RELATED ALTERATION OF TUMOR METABOLISM ON APOPTOSIS AND EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSFORMATION (EMT) IN EXPERIMENTAL PROSTATE CANCER**

In this study, we aimed to investigate the effects of the combination of LDH-A inhibitor with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamin and Docetaxel on apoptosis, oxidative stress and EMT mechanisms in the experimental prostate cancer model created in our study. For this purpose, 70 male C57BL/6 mice were used. A control group and 6 treatment groups were formed. CK18-M30, lactate and total antioxidant capacity, total oxidant status and oxidative stress index values were calculated from obtained serum samples. TUNEL staining for apoptosis analysis, western blot and qPCR analysis for EMT were performed from tumor tissue samples. In order to understand the tissue damage caused by the agents used in the liver and kidney tissues taken, hematoxylin-eosin staining was performed in the liver and periodic acid schiff staining in the kidney tissues. When the results were examined, it was seen by looking at the lactate results that the Warburg effect was reversed with the LDH-A inhibitor applied. Docetaxel and LDH-A inhibitor + Docetaxel treatment groups significantly increased oxidative stress and apoptosis ( $p < 0.05$ ). It has been observed that Docetaxel, which is nephrotoxic with the increase of oxidative stress, increases the damage on the kidney, but LDH-A inhibitor + Docetaxel treatment has increased the oxidative stress more, causing more damage on the kidney. When the effect on EMT was examined, it was observed that the LDH-A inhibitor + Docetaxel group increased the expression of E-cadherin and significantly decreased the expression of N-cadherin ( $p < 0.05$ ). Snail also decreased the expression of Slug and Twist transcription factors ( $p < 0.05$ ). It was observed that HIF-1 $\alpha$  protein expression was statistically significantly decreased, different from the other groups, and this was important for the conversion of EMT to MET ( $p < 0.05$ ). In conclusion, in our study, it was observed that the combined treatment of Docetaxel + LDH-A inhibitor had a more effective effect on the apoptosis and metastasis mechanisms than docetaxel alone in the treatment of prostate cancer.

This thesis was supported by TÜBİTAK (1002 - 119S850).

**Key Words:** Apoptosis, EMT, LDH-A inhibition, Prostate cancer





### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri (PK), erkeklerde insidansı birinci, akciğer ve kolon kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin üçüncü nedenidir (1).

Kanserde önemli bir fenomen olan Warburg etkisi, metabolizmanın kanser hücrelerinin proliferasyonlarını ve anabolik büyümelerini desteklemek için anaerobik glikolize dayalı olarak programlandığını ifade eder. Anaerobik glikolizin sonucu olarak glukoz metabolizması yön değiştirir. Ağırlıklı olarak 'Pirüvat-Asetil KoA' dönüşümü ile krebs siklusu üzerinden gerçekleşen oksidatif fosforilasyon yoluyla metabolize edilmek yerine, pirüvat üzerinden laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi aracılığıyla laktata katabolize edilir. Hücre glukoz metabolizmasından kazanması gereken 32 ATP yerine, 2 ATP kazanmış olur. Artan glukoneogenez nedeniyle hastalarda kaşeksi ve ölüm meydana gelir. LDH-A kanser hücresinde bulunan, anaerobik glikolizin ana düzenleyicisi olan LDH formudur. Aktif olarak pirüvatın düzeyini azaltır ve tümör dokularında laktat düzeylerini artırır (2). Artan laktat düzeyi nedeni ile tümör mikro-çevresi aside doğru kayar ve bu da tümör fizyolojisini değiştirir. LDH-A aktivitesi artışı; tümör büyümesini ve metastazını destekler, migrasyon ve invazyonu artırır (3). LDH-A'nın bu özelliklerinden dolayı LDH-A inhibitörü ile kombine tedaviler son dönemlerde meme, kolon, akciğer kanserlerinde güncel araştırma konusu olmuştur. Yapılan çalışmalarda LDH-A inhibisyonunun çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antiproliferatif bir etkiye sahip olduğu ve tümör progresyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle LDH-A, yeni anti-kanser ajanların gelişimi için dikkat çeken bir hedef olmuştur (4).

Son yıllarda daha düşük dozlarda kemoterapi yapılmasını sağlayan sinerjik etki gösteren yeni kemoterapi rejimleri önem kazanmaktadır. Dosetaksel taksan türevi olan, prostat kanserinin birinci basamak tedavisi için etkili anti-mikrotübül kemoterapötik bir ilaçtır. Bu nedenle, Dosetaksel'in kombine ve karşılaştırmalı in vitro ve in vivo çalışmaları, PK'ine karşı yeni tedavi ajanları geliştirmek için önemlidir (5).

D vitamini yağda eriyen vitaminler arasında yer almakta olup aynı zamanda endojen olarak uygun biyolojik ortamda da sentezlenebilen hormon ve hormon öncüsü bir steroldür (6). D vitamininin aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> farklı

mekanizmalar üzerinden apoptoz indüksiyonu, hücre farklılaşmasının uyarılması, anti-inflamatuar, anti-proliferatif etki, anjiyogenez, invazyon ve metastaza etki ederek kansere karşı koruyucu etki gösterebilir (7).

Epitelden mezenkimal geçiş (EMT), geniş bir doku türü ve gelişim evreleri yelpazesinde doğal olarak meydana gelen biyolojik hücre programdır. EMT yara iyileşmesi, doku fibrozu ve kanser ilerlemesi dahil olmak üzere çeşitli patolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (8). EMT kanser hücrelerinde metastazın en önemli basamağıdır. EMT'ye epitelyal ve mezenkimal belirteçlerdeki değişikliklere bakılarak karar verilmektedir. Epitelyal belirteçlerdeki (E-kaderin) azalma ve mezenkimal belirteçlerdeki (N-kaderin, vimentin) artma hücrenin EMT'ye gittiğinin göstergesidir. Kanser hücrelerinde EMT'nin önlenmesi veya EMT'den mesenkimal-epitelyal (MET)'e dönüşümün sağlanması metastazın önlenmesi için etkili bir strateji olabilir (9). Kanser hücrelerinde, EMT biyobelirteçleri arasında yer alan SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB1/2 gibi transkripsiyon faktörleri önemli rol oynar. Bu transkripsiyon faktörlerinin tamamı hücrelerarası bağlantıların ana bileşeni olan E-kaderin'in baskılayıcılarıdır ve kanser hücrelerinde mezenkimal durumun korunması için gereklidir (10).

İn-vitro ve in-vivo ortamda yapılan EMT çalışmalarında, kanser hücrelerinde E-kaderin seviyesinin düştüğü ve N-kaderin, vimentin gibi mezenkimal biyobelirteçlerin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca çalışmalarda Snail, Slug, Twist ve ZEB1/2 konsantrasyonlarının E-kaderini baskılamak üzere arttığını çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir (11-15). TGF- $\beta$ , BMP, Wnt- $\beta$ -catenin, Notch, Hedgehod, ve Hipoksi sinyal yolları tarafından uyarılan EMT'de Snail, Slug, Twist ve ZEB1/2, E-kaderini baskılamak üzere yolağın sonunda yer alırlar (16). Hipoksi yolağında yer alan ve Twist'ten önce gelen HIF-1 $\alpha$  tümör hücrelerinin hipoksiye adaptasyonunda anahtar bir rol oynar ve hipoksiye yanıt veren en kritik sinyal yolağıdır (17). HIF-1 $\alpha$  ile indüklenen EMT metastazda önemlidir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  seviyelerinin yükselmesi ile hücrelerin EMT'ye gittiği bulunmuştur (18-20). Yapılan çalışmalara bakıldığında HIF-1 $\alpha$ 'nın hipoksik ortamlarda LDH-A ekspresyonunu değişik kanser türlerinde arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (21-23). Ayrıca kanser hücrelerinde LDH-A aktivitesindeki artış ile laktik asit artar ve laktik asidoz meydana gelir.

Ortaya çıkan asidoz HIF-1 $\alpha$  üzerinden apoptoza direnç gelişmesine neden olur (24,25). Ancak LDH-A inhibe edildiği durumda HIF-1  $\alpha$  ekspresyonun yönü ve HIF-1  $\alpha$ 'nin Twist üzerinden EMT'ye olan etkisindeki değişim bilinmemektedir. Bu bilgiler ışığında artmış LDH aktivitesinin kanser hücrelerine daha agresif bir karakter kazandırdığı ve invaziv özelliğini arttırdığı söylenebilir. Ancak henüz In-vivo ortamda LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü- Doksetaksel kombine tedavisinin PK'inde EMT üzerine etkileri bilinmemektedir.

Çalışmamızda oluşturulan deneysel PK modelinde Doksetaksel, 1,25(OH) $_2$ D $_3$  vitamini, LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü + 1,25(OH) $_2$ D $_3$  vitamini, LDH-A inhibitörü + Doksetaksel kombine tedavilerinin apoptoz, oksidatif stres ve EMT biyobelirteçleri (E-kaderin ve N-kaderin), transkripsiyon faktörleri (Snail, Slug, Twist) ve EMT sinyal yollarından biri olan hipoksi sinyal yolağı (HIF-1 $\alpha$ ) üzerine etkilerinin anlaşılması amaçlanmıştır.

## **4.GENEL BİLGİLER**

### **4.1. Prostat Kanserinin Epidemiyolojisi**

Kanser, bir dizi genetik bozukluk sonucu oluşan kompleks bir hastalıktır. Tüm dünyada, kalp hastalıklarından sonra en sık rastlanan ölüm nedeni olması nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur (26). Nüfusun artışı, artan nüfusun yaşlanması ve kanser riskini arttıran çevresel ve davranışsal faktörler nedeni ile kanser vakalarının ve kansere bağlı ölümlerin sayısının hızla artması beklenmektedir (27). PK, dünya genelinde erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür ve gelişmiş ülkelerde kanser vakaları giderek artış göstermektedir (28). 2017 yılında Amerikan Kanser Derneği, yeni tanı konmuş PK vakalarının sayısını 161.360 olarak bildirmiş ve erkeklerde tümörlerin %20'sini oluşturduğunu söylemiştir. Ayrıca, insidansı birinci ve mortalitesi üçüncü sırada yer almaktadır (29).

### **4.2. Prostat Kanserinin Etiyolojisi**

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi PK'nin de etyopatogenezi tam olarak ortaya konulamamıştır. Yaş, ırk, diyet alışkanlıkları ve genetik etkenlerin PK üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir (30,31). 50 yaş ve üzeri erkeklerde PK görülme sıklığı giderek artmaktadır. Ailesinde PK öyküsü olmayanlara göre erkek kardeşi veya babası PK olan kişilerde PK insidansı 2 ila 3 kat daha fazladır. Bir kişinin herhangi bir zaman aralığında PK'ne yakalanmış üç aile üyesi varsa, ailede PK öyküsü olmayan birine göre 10 kat daha fazla PK'ne yakalanma olasılığı vardır. Ayrıca diyet alışkanlıkları PK etiyojisinde faktör olabilir. Yüksek yağlı diyet ve yüksek kalsiyum alımı PK olasılığını artırmaktadır. Irk PK olmayı etkileyen diğer bir faktördür. Afro-Amerikanların PK'ne beyaz ırktan daha fazla yakalandıkları bilinmekle beraber asyalılarda PK'ne yakalanma sıklığı diğer ırklara göre düşük seviyededir (32,33).

### **4.3. Prostat Kanserinin Histolojik Tipleri**

PK'nin; epitelyal tümörler, epitelyal olmayan tümörler, çeşitli tümörler, ikincil tümörler, sınıflandırılmamış tümörler ve tümör gibi görünen lezyonlar ve epitelyal anormallik olmak üzere 6 tane histolojik tipi mevcuttur (34).

#### **4.4. Prostat Kanserinin Tedavisi**

PK tedavisinde cerrahi yöntemlerin yanında, androjen yoksunluk tedavisi (AYT), ablatif tedaviler, radyasyon terapisi, kemoterapi ve immünoterapiler cerrahi olmayan yöntemler olarak kullanılmaktadır (35). Gen terapisi gibi biyolojik yöntemlerin kullanılması ve hormon terapisi gibi farklı yaklaşımlar birlikte veya tek başına kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir tedavi yönteminin varlığından bahsetmek mümkün değildir (36).

##### **4.4.1. Prostat Kanseri Tedavisinde Cerrahi Olmayan Yöntemler**

###### **4.4.1.1. Androjen Yoksunluk Tedavisi**

Androjenler sakal, cinsel işlev ve kas kütlesi gibi erkek özelliklerini destekleyen hormonlardır. PK hücrelerinin büyümeleri için androjene ihtiyaçları vardır. Androjen yoksunluk tedavisi (AYT), 1941'de Huggins ve Hodges'un yaptıkları çalışmalarından bu yana ileri PK tedavisinde kullanılmaktadır (37). Bu tedavi yönteminde androjenlerin etkilerini bloke edip PK büyümesinin yavaşlatılabilmesi hedeflenmektedir. Nadir durumlarda, testislerden birini veya her ikisini çıkarmak için ameliyat gerekebilir. İlaçla tedavide genellikle; lüteinizan hormon salan hormon (LHRH) agonistleri ve LHRH antagonistleri, anti-androjenler, östrojenler, abirateron ve enzalutamid gibi ilaç tedavileri uygulanmaktadır. Bu tedaviler oral veya enjeksiyon şeklinde uygulanır. AYT uygulanan hastaların en az %90'ında biyokimyasal, %70-80'inde klinik etki başarısına ulaşıldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu etkilerin geçici olduğu ve hastaların en az %50'sinin iki yıl içinde hastalığının nüks ettiğini gösteren raporlar vardır. Ek olarak, sürekli tedavi gerekliliği nedeniyle AYT, sıcak basması, yorgunluk, depresyon, erektil disfonksiyon, cinsel zayıflık ve jinekomasti gibi çeşitli yan etki riskini artırır (38).

###### **4.4.1.2. Ablatif Tedaviler**

PK için ablatif tedaviler, "radikal tedavinin" yan etkileri ve aşırı tedavi endişesi nedeniyle artan ilgi görmüştür. Yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (HIFU), kriyoterapi, ve hedefli ablasyon tedi odak lazer ablasyonu (FLA),

radıofrekans ablasyonu (RFA), fotodinamik terapi (PDT), geri dönüşümsüz eletroporasyon (IRE), altın nanopartikül ile direkt ablasyon (GNP) řu anda kullanılan ablatif tedaviler arasında yer almaktadır (39,40).

#### **4.4.1.3. Radyasyon Tedavisi**

PK tedavisi için iki radyoterapi kategorisi vardır: (1) dış ışın RT (EBRT) ve (2) brakiterapi (BT). Brakiterapi normalde düşük ve orta dereceli PK için yapılırken EBRT PK'nın herhangi bir aşaması için kullanılabilir. Bununla birlikte, EBRT sonrası brakiterapi takviye tedavisi, orta derecede yüksek riskli PK vakaları için de uygulanmaktadır. EBRT'de, radyasyon ışınları kanserli hücreleri yok etmek için belirlenen bir dozda tümör hacmine odaklanır. Brakiterapi işleminde ise radyoaktif izotoplar kalıcı veya geçici olarak tümör hacmine çok yakın bir yere yerleştirilir. (41).

#### **4.4.1.4. Kemoterapi**

PK tedavisinde Dosetaksel, kabazitaksel, paklitaksel, mitoksantron gibi kemoterapötik ajanlar ve estramustine, prednisone, satraplatin gibi adjuvan ajanlar kullanılmaktadır (42).

Dosetaksel, mikrotübüllere bağlanarak ve androjen reseptörü nükleer translokasyonunu önleyerek ve B hücresi lenfoma (Bcl-2) fosforilasyonu yoluyla apoptoza neden olarak çalışan bir taksan türevidir (42). Paklitaksel, tubulini hedefleyen birkaç hücre iskelet ilacından biridir. Paklitakselin antitümör etkileri, mitotik iğ düzeneği, kromozom segregasyonu ve hücre bölünmesindeki kusurlu alanlara bağlanmıştır (43). Kabazitaksel yarı sentetik tübülün bağlayıcı bir taksan ilacıdır. Bu ilaç ile yapılan hücre kültür deneylerinde Dosetaksel kadar güçlü olduğu ve paklitaksele ve Dosetaksele dirençli modellerde antitümör aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Mitoksantron ise DNA interkalasyonu ve hasarına müdahale etmeye hizmet eden bir antrasendion, Tip II topoizomeraz inhibitörüdür (42).

#### **4.4.1.5. İmmünoterapiler**

İmmünoterapinin amacı vücudun bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser hücreleri ile savaşmaya veya kanser hücrelerini yok etmeye yardımcı olmaktır. Halihazırda geliştirilmekte olan immünoterapötik stratejiler iki kategoriye ayrılabilir:

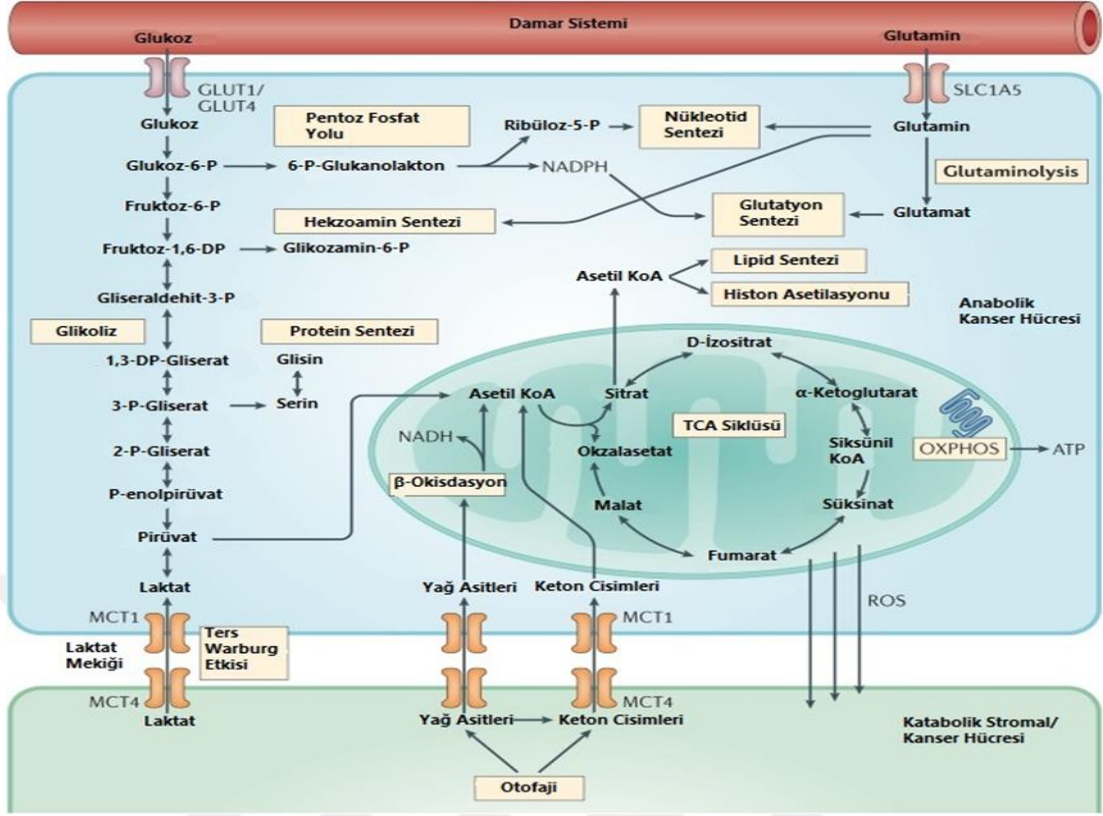
birincisi, bağışıklık efektör fonksiyonlarını (örn., Sitokinler, aşular, onkolitik virüsler, uyarıcı hücre transferleri ve adjuvanlar) uyarmayı veya arttırmayı amaçlayan tedavileri içerir ve ikincisi, bağışıklık kontrol noktalarını ve diğer bağışıklık modülatörlerini hedefleme gibi bağışıklık baskılayıcı mekanizmalara karşı koyma stratejilerini içermektedir (44).

#### **4.4.2. Prostat Kanseri Tedavisinde Cerrahi Yöntemler**

Radikal prostatektomi (RP), PK tedavisi için 150 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır (45). RP, tüm prostat ve seminal veziküllerin eksizyonunu ve pelvik lenfadenektomiyi içerir. 1948'de bir perineal insizyonla yapılan retropubik yaklaşım kullanılmış, sonrasında gelişmiş görüntüleme yöntemlerinin rezeksiyon kolaylığı ve pelvik lenfadenektomi yapma yeteneğini artırması nedeniyle popülerlik kazanmıştır (46). Ameliyatın amaçları kanserin negatif cerrahi sınırlarla radikal rezeksiyonu ve normal periprostatik dokuların korunması, böylece üriner kontinansı korumak ve erektil disfonksiyondan (ED) kaçınmaktır (47).

#### **4.5. Kanseri Metabolizması**

Tümör progresyonunda yaygın olan düzensiz metabolizma, kanseri hücrelerinin büyümesi ve bölünmesi için önemli bir kaynak sağlar. Normal erişkin dokularla karşılaştırıldığında; karbonhidrat, lipit ve amino asit metabolizmaları tümörlerde önemli transformasyonel değişikliklere uğrayabilir. Kanseri ilişkili bilinen metabolik değişiklikler arasında glikoz ve amino asitlerin düzensiz alımı, glikoliz / trikarboksilik asit döngüsü (TCA), biyosentez ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) üretimi için döngü ara maddeleri ve artan azot ihtiyacı yer almaktadır. Kanseri için etkili terapötik stratejiler geliştirmek için, kanseri metabolizmasında olan değişiklikleri, kanseri hücresinin metabolik adaptasyonunu anlamak gerekmektedir (**Şekil 4.5.1**) (48).

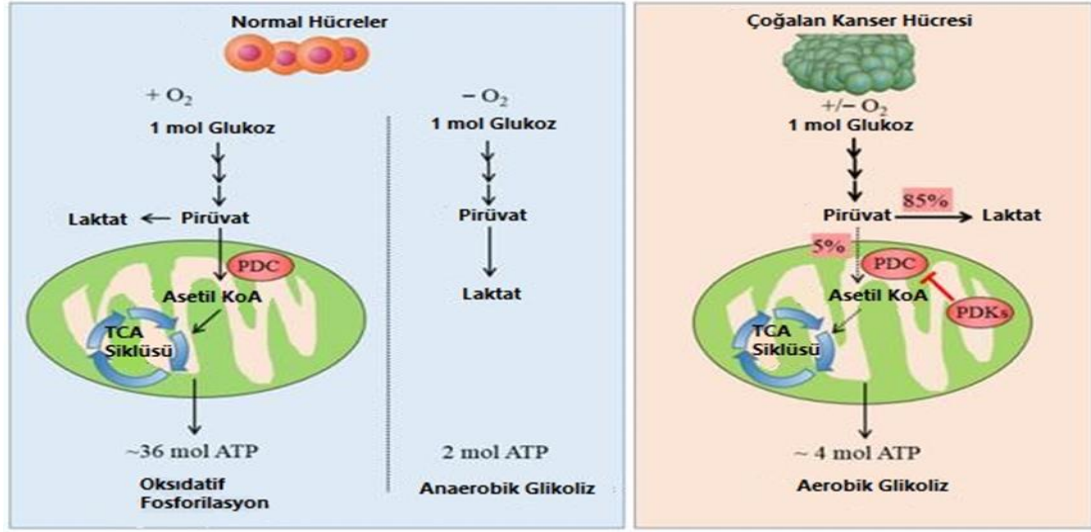


Şekil 4.5.1. Kanser hücrelerinin metabolik adaptasyonları (49)

#### 4.6. Warburg Etkisi ve Artmış Anerobik Glikoliz

Otto Warburg, kanser hücrelerinin büyük miktarlarda glikoz tükettiğini ve glikozun çoğunu oksijen varlığında bile laktata metabolize ettiğini bildirmiştir (50). Bu fenomen artmış anerobik glikoliz veya Warburg etkisi olarak adlandırılır ve kanser ve çoğu normal doku arasında çarpıcı bir metabolik farkı temsil eder (51). Kanserde önemli bir fenomen olan Warburg etkisi, kanser hücrelerinin proliferasyonlarını ve anabolik büyümelerini desteklemek için anerobik glikolize dayalı olarak programlandığını ifade eder. Anerobik glikoliz sonucu olarak glukoz yön değiştirir. 'Pirüvat-Asetil KoA' dönüşümü ile krebs siklusu üzerinden gerçekleşen oksidatif fosforilasyon yoluyla metabolize edilmek yerine, pirüvat üzerinden LDH enzimi aracılığıyla laktata dönüştürülür. Hücre glukoz metabolizmasından kazanması gereken 32 ATP yerine, 2 ATP kazanmış olur. Artan glukoneogenez nedeniyle hastalarda kaşeksi ve ölüm meydana gelir (Şekil 4.6.1) (2).





**Şekil 4.6.1.** Warbug etkisi. Normal hücrelerde ve tümör hücrelerinde glikozun metabolik yolu (52).

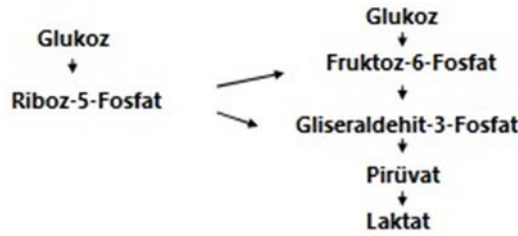
Bu enerji düşünün ortadan kaldırılması amacı ile hücrenin içine daha fazla glukoz alımının yapılabilmesi için glukoz taşıyıcıları GLUT1, GLUT2, GLUT3 ve GLUT4'ün ekspresyonlarında artış gözlenir. Kanser hücresinin daha fazla glukoz tüketme durumu ve glukoz taşıyıcı proteinlerdeki ekspresyon artışları kanser tanı yöntemlerinin gelişmesine de neden olmuştur. Radyoaktif florin etiketli glikoz analogu 18F-florodeoksiglukoz (18F-FDG) alımına bağlı kanser tanı ve tedavi yöntemi olan pozitif elektron emisyon tomografisi (PET)'in klinik olarak tümör teşhisi, evrelemesi ve tedaviye yanıtın izlenmesinde kullanılmasının prensibini oluşturmuştur (53).

Hipoksi, pre-malign lezyonlarda oksijen yokluğunda bile metabolik aktivitelerin sürdürülebilir olmasını sağlayan anaerobik metabolizmaya dönüşüm şeklinde adaptif bir karakter gelişir. Vasküler düzenlenme ile yeni kan damarlarının oluşumu ve sağ kalımını destekleyen hipoksi ile indüklenen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonu gerçekleşir. Biyoenerjetik açıdan bakıldığında, hipoksi daha iyi hayatta kalacakları için anaerobik glukoz metabolizmasının artış gösterdiği hücreleri seçer. Glikolizin artışının, hipoksi/anoksiye başarılı bir adaptasyon olmasına rağmen, artan asit üretimi nedeniyle hücre dışı pH'ta önemli düşüslere neden olan negatif sonuçlara sahiptir (54)

Normal hücrelerin asidik bir mikroçevreye uzun süre maruz kalması p53- ve kaspaz-3-bağımlı apoptoz ve nekroz ile sonuçlanır. Apoptoz için fizyolojik tetikleyici, hücre içi asidoz ile oluşan transmembran H<sup>+</sup> + gradyanının çökmesi olabilir. Hücre içi pH, aynı anda eksprese olan birden fazla H<sup>+</sup> taşıyıcı ailesi tarafından sağlanır. Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> değişimi ve vakuolar H<sup>+</sup> -ATPazlar, apoptoza direnç gösterebilir (55).

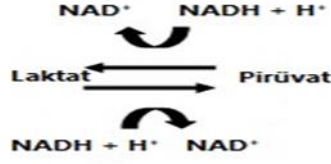
#### 4.7. Laktat Metabolizması

Kanser ve diabetes mellitus (DM) gibi bazı hastalıklar, laktat metabolizmasındaki değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir. Laktat metabolizması, laktik asidoz ile sonuçlanan çeşitli durumları anlamak için de önemlidir. İskelet kası fizyolojisini ve fiziksel egzersize yanıtı anlamak için de laktat metabolik yolları önemlidir. Bir hidroksikarboksilik asit olan laktat'ın L-laktat ve D-laktat olmak üzere iki stereo izomeri vardır. İnsanlarda glukoz, glikoliz ve pentoz fosfat yolunu kullanarak metabolize edilir. Glukoz; NADH ve ATP üretmek için glikoliz, NADPH ve riboz 5-fosfat üretmek için pentoz fosfat yolunu kullanır. Pentoz fosfat yolunda açığa çıkan ara ürünler glikoliz ile bağlantıyı sağlar (Şekil 4.7.1) (56).



Şekil 4.7.1. Pentoz fosfat yolu ile glikoliz ara maddeleri arasındaki bağlantı (56)

Glikoliz, sitozolde glikozun piruvata yıkımı ve daha sonra oksijen yoksa L-laktata dönüştüren metabolik bir yoldur. Eğer ortamda oksijen var ise pirüvat Asetil-KoA üzerinden TCA siklüsüne girer ve H<sub>2</sub>O ve CO<sub>2</sub> oluşturur. Glikolizin son aşamasında, pirüvat, LDH enzimi yardımı ile sitoplazmada L-laktata indirgenirken, NADH, NAD<sup>+</sup> 'ya oksitlenir. Glikolizin devam etmesi için NAD<sup>+</sup> 'nın LDH ile sitosolik rejenerasyonu gereklidir. Bu yüzden LDH enzimi çift yönlü çalışan ve glikolizin devamlılığını sağlayan bir enzimdir (Şekil 4.7.2) (56).



**Şekil 4.7.2.** Laktat dehidrojenaz reaksiyonu

İnsanlarda D-laktatın fizyolojik kaynakları arasında ekşi süt, yoğurt, pekmez, elma, domates, turşu, bira ve şaraplar ve sindirim sistemindeki sindirilmemiş karbonhidratların bakteriyel fermantasyonu vardır. Ayrıca D-laktat, endojen olarak glioksalaz sistemi yoluyla metilglükolden oluşturulur. Sağlıklı kişilerde ekzojen D-laktat ağırlıklı olarak piruvata dönüşür, az miktarda D-laktat böbrek atılımına uğrayabilir (56).

Kanser ve laktat metabolizması arasındaki ilişki ise Warburg etkisi ile açıklanmaktadır. Normal hücrelerin malign transformasyonu, çoğu solid tümörde normoksik koşullar altında bile glukoz alımının ve laktat oluşumunun artmasına neden olur. Bu durum, hücre solunum, onkojenik değişiklikler, glikolitik enzimlerin ve metabolit taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu sonucu olduğu kabul edilmektedir (57).

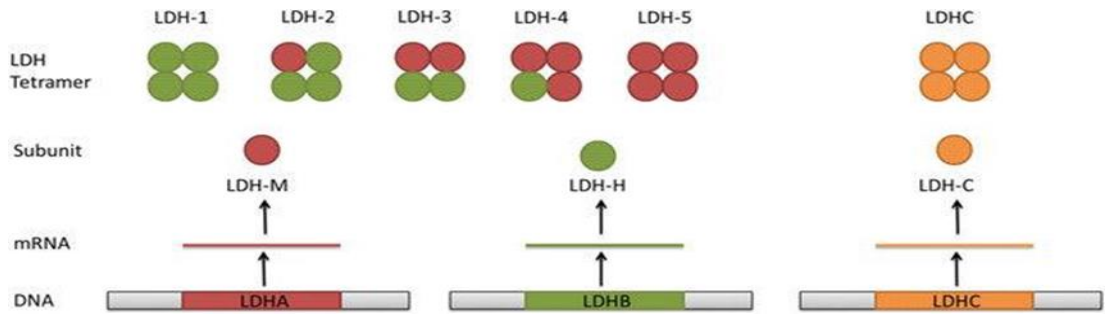
#### **4.8. Laktatın Karsinogeneze Etkisi**

Glikolitik tümörlerde kanser hücrelerinin laktat seviyeleri 40 kata kadar yükselir ve bu artış kanserin agresifliği yanında kötü sağkalım ile yüksek korelasyon gösterir (58). Bu nedenle, laktatın artışının yanında, transforme olmuş hücrelerin sınırları içinde ve ötesinde, aday kanser hücrelerinde laktat, monokarboksilat taşıyıcı-4 (MCT4) ve monokarboksilat taşıyıcı-1 (MCT1) ekspresyonunu yükseltir. Bu durum laktatı, tümör büyümesinin ve karsinogenezin düzenlenmesinde anahtar bir molekül yapar. Hanahan ve Weinberg, kanser araştırma tarihinin en çok alıntılanan makalesinde, kanserin belirleyici özelliklerini proliferasyon için sinyal verme, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi indükleme, istila ve metastazı aktive etme şeklinde

tanımlamıştır (59,60). Laktat, karsinogenezdeki tüm bu süreçlere katkıda bulunmaktadır (61).

#### 4.9. Laktat Dehidrogenaz Alt Birimleri ve İzofomları

LDH, vücutta yaygın olarak bulunan hücre içi bir enzimdir. Enerji kaynağı olarak glikozu kullanan dokularda düzeyi yüksektir. Tetramerik bir protein olan ve çift yönlü olarak çalışan LDH enzimi (L-laktat: NAD oksidoredüktaz (LDH); EC 1.1.1.27), anaerobik koşullar altında NADH'nin NAD<sup>+</sup>'ya oksidasyonu ile piruvatın laktata dönüşümünü sağlar ve glikolizin devamlılığı için laktatın piruvata dönüşümünü katalize eder (62). LDH, kofaktör olarak NAD / NADH kullanır. LDH, LDHA (M) ve LDHB (H) şeklindeki iki ayrı gen tarafından kodlanan M ve H alt birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan bir homo veya hetero-tetramerdir. Altı izoformda bulunan LDH'nin beş tanesi M (kas) ve H (kalp) olarak adlandırılan iki alt biriminin kombinasyonuna bağlıdır. Kalpte LDH-1 (4H); retiküloendotelial sistemde LDH-2 (3H1M), akciğerlerde LDH-3 (2H2M), böbreklerde LDH-4 (1H3M) ve karaciğer ve çizgili kasta LDH-5 (4M) bulunmaktadır. Altıncı izoform ise, testiste homotetramerik bir LDH-C'dir. Yalnızca testis ve spermde eksprese edilir ve muhtemelen LDH-A geninin bir kopyasıdır (63,64) (Şekil 4.9.1). İzoenzimler dokuya özgü bir şekilde dağıtılır. LDH-1 ve LDH-2 ağırlıklı olarak kalp kasları, böbrek ve eritrositlerde bulunur. LDH-4 ve LDH-5 izoenzimleri karaciğer ve iskelet kasında baskındır. LDH-2-4 dalak, akciğerler, endokrin bezleri ve trombositler gibi birçok dokuda bulunur. Bu dağılımın bir sonucu olarak, LDH'daki bir artış bir dizi farklı dokudaki (iskelet veya kalp kası, böbrek, karaciğer) hasarı yansıtabilir. Hücre nekrozu olduğunda veya hücrelerin neoplastik proliferasyonu LDH üretiminin artmasına neden olduğunda LDH seviyeleri yükselebilir (65).



Şekil 4.9.1. LDH izoformları ve yapıları (63)

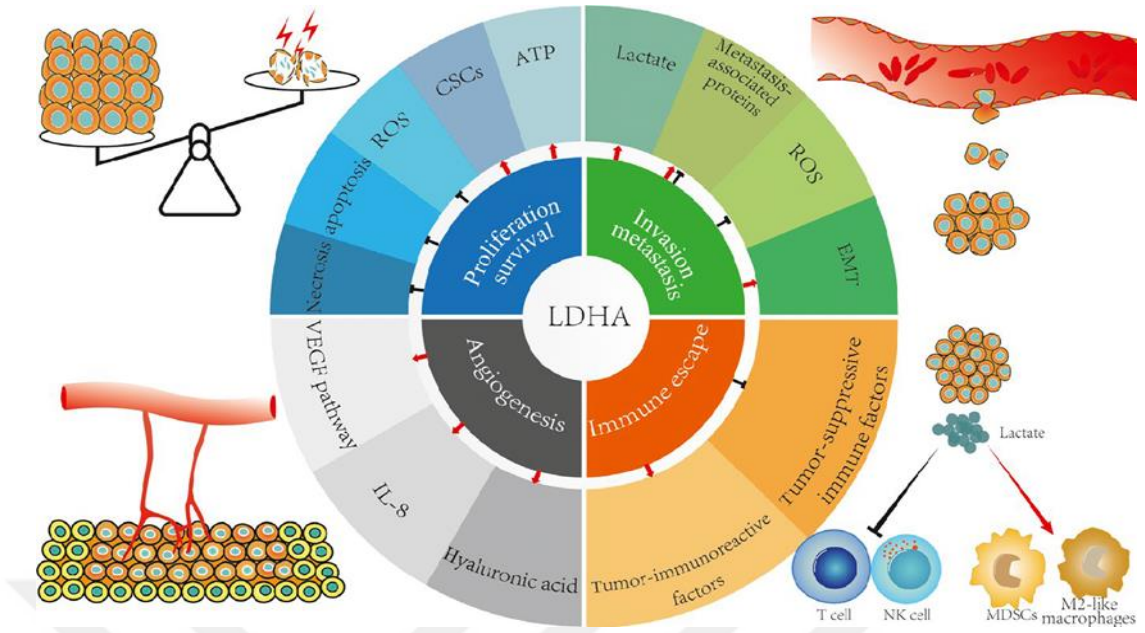
#### 4.10. Kanserde Terapötik Hedef Olarak Laktat Dehidrogenaz

Kanser hücreleri, proliferasyonlarını ve anabolik büyümelerini desteklemek için anerobik glikolize göre programlanmıştır. Eskiden glikolizin atık ürünü olarak görülen laktat, kanser gelişimi, sürdürülmesi ve metastazının kritik bir düzenleyicisi olarak görülmektedir ve kanserdeki terapötik ajanlar için hedef haline gelmiştir (66).

Laktatın hücre zarları boyunca geçişine izin veren monokarboksilat taşıyıcılar, bağışıklık sisteminin potansiyel modülatörleri ve kanserin tanı ve tedavisi için potansiyel hedefler olarak araştırılmaktadır (56).

Hem normal hücrelerde hem de kanser hücrelerinde laktat homeostazı, monokarboksilik asit belirteçleri tarafından sağlanır: MCT1 (SLC16a1), MCT2 (SLC16a7), MCT3 (SLC16a8) ve MCT4 (SLC16a3) (67). Bu taşıyıcılar laktatın içe ve dışa doğru akışını plazma membranına yönlendirir ve kanser hücreleri tarafından üretilen aşırı laktat seviyeleri MCT'ler tarafından hücre dışına çıkarılırlar. Taşıma, pH'a, hücre içi ve hücre dışı laktat konsantrasyonuna ve asetat, piruvat, bütirat ve keton cisimleri dahil olmak üzere diğer MCT substratlarının seviyelerine bağlıdır (68,69). Protonların laktat ile birlikte taşınması laktatın toksik birikmesini ve hücre içi ortamın asitleşmesini önler. Buna göre MCT'ler tarafından laktat taşınması, kanser hücreleri için terapötik bir zayıflığı temsil eder (66).

Warburg etkisinde LDH-A'nın oynadığı anahtar rol ve bu metabolik yolun kanser hücrelerindeki oksijenden bağımsız olarak görülme sıklığı, LDH-A fonksiyonunun insan tümörlerindeki önemini vurgulamaktadır (70). LDH-A, birçok kanser türünde yükselir ve tümör büyümesi, invazyonu, metastazı gibi kanserin birçok ayırt edici özelliği ile bağlantılıdır (**Şekil 4.10.1**). Yapılan son çalışmalarda, LDH-A ekspresyonunun RNA etkileşimi ile düşürüldüğünü, kanser hücrelerinin malign davranışının in vitro ve in vivo ciddi şekilde etkilendiğini gösteren açık kanıtlar vardır (71).



**Şekil 4.10.1.** LDH-A, kanserin ayırt edici özelliklerinde kritik roller oynar (72).

LDH-A ekspresyonunun aksine, LDH-B, tümörlere göre habis olmayan dokularda yüksek oranda eksprese edilir. Malign tümörlerde, LDH-B'nin promotor hipermetilasyonu tarafından susturulduğu görülmektedir; bu primer meme tümörlerinde ve primer prostat tümörlerinde yüksek sıklıkta görülür. Bununla birlikte, LDHB ekspresyonunun tümörlerde yaygın olarak azaldığına inanılmakla birlikte, bazı kanser hücrelerinde kısmen upregüle edildiği tarif edilmiştir (72).

Ayrıca 2015 yılında yapılan bir çalışmada, sadece LDHA düzeyi ile kıyaslandığında LDHB / LDHA oranının meme kanseri hücrelerinin metabolik kapasitesini daha iyi yansıttığı rapor edilmiştir. Kanser hücrelerindeki LDHB / LDHA oranını azalması meme kanserinin daha agresif olduğunu düşündürmektedir ve bu oran “Glikolitik İndeks” olarak tanımlanmıştır (73).

#### 4.10.1. LDH İnhibisyonu

LDH inhibisyonu, normal aktiviteler ve yeterli oksijen kaynağı durumunda, genellikle glikozu  $CO_2$  ve  $H_2O$ 'ya tamamen indirgeyen sağlıklı hücelere zarar vermeden tümör hücrelerinin anerobik glikolizini bloke eder (70).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda LDH-A ve LDH-B inhibisyonu için çeşitli molekül ve kimyasallar kullanılmaktadır (**Tablo 4.10.1**).

**Tablo 4.10.1.** LDH inhibisyonu için kullanılan maddeler

<b>MOLEKÜL</b>	<b>HEDEF ALDIĞI YER</b>
AT-101 (gossypol)	LDH-A ve LDH-B
FX-11	LDH-A ve LDH-B
Galloflavin	LDH-A ve LDH-B
N-hydroxyindole	LDH-A
Sodyum Okzamat	LDH-A

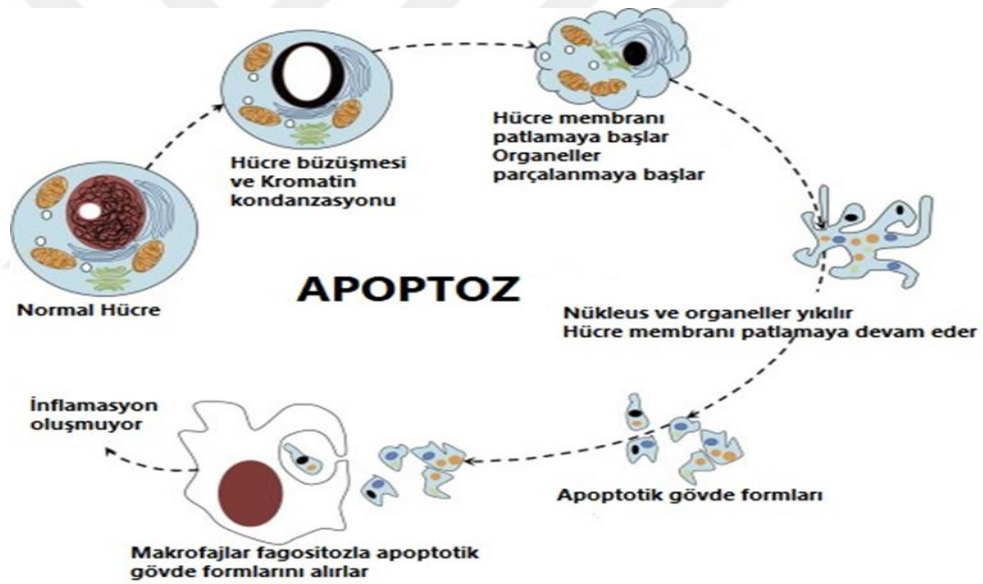
LDH inhibisyonu için iyi bir spesifiteye sahip olan sodyum okzamat hayvan deneyleri için 3g/kg'a kadar toksik özellik göstermemektedir. Ancak LDH-A ve LDH-B arasında hiçbir seçicilik göstermez ve ikisinin de aktivitesini inhibe eder (74).

Son yıllarda LDH inhibisyonu küçük interferansçı RNA (siRNA) tekniği kullanılarak LDH geninin susturulması ile de yapılabilmektedir. Kanser hücre kültür çalışmalarında bu yöntem LDH inhibisyonunun sağlanması için çok efektif bir yöntem olmakla beraber hayvan kanser çalışmalarında direkt uygulanamamasından dolayı çok tercih edilmemektedir.

#### **4.11. Apoptoz**

Nekroz, otofaji ve apoptoz olmak üzere üç çeşit hücre ölüm mekanizması bulunmaktadır. Nekroz, hipoksi veya iltihaplanma gibi dış yaralanmaların neden olduğu kontrolsüz bir alternatif hücre ölüm şeklidir ve apoptozun aksine nekroz, hücrenin işlevini yerine getiremediği anda ani bir şok (radyasyon, ısı, kimyasallar, hipoksi, vb.) ile çok ciddi şekilde hasar gördüğü enerjiden bağımsız bir hücre ölüm şeklidir (75). Otofaji, makro proteinler veya hatta tüm organeller gibi hücrenel bileşenlerin, parçalanma için lizozom halinde sekestre edildiği bir işlemdir (76). Apoptoz ise, programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılmaktadır ve genellikle farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterizedir. Apoptoz, normal hücre döngüsünün sağlanması, bağışıklık sisteminin

düzenli gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerin düzenli gerçekleşmesi için hayati bir bileşen olarak kabul edilir. Uygunsuz apoptoz (çok az veya çok fazla) nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türünün oluşumuna neden olan önemli bir faktördür (77). Hücrede ters giden bir durum olduğu veya yaşlı hücrenin programlı bir şekilde öldürülmesi gerektiğinde apoptoz başlar. İlk olarak hücre büzülmesi ve kromatin yoğunlaşması gerçekleşir. Hücre membranı patlamaya ve organeller parçalanmaya başlar. Nükleus ve organeller yıkılır ve hücre membranının patlamaya devam etmesi ile apoptotik gövde formları oluşur. Oluşan apoptotik gövde formları makrofojlardan fagozitoz yoluyla alınır ve atılırlar (Şekil 4.11.1). İnsan vücudunda, günde yaklaşık  $1 \times 10^9$  hücrenin apoptoz geçirdiği tahmin edilmektedir (78).



Şekil 4.11.1. Apoptoz'un sitolojisi (79)

#### 4.11.1. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz iki yoldan oluşur: İntrensik (mitokondriyal yol) ve ekstrinsik (ölüm reseptör yolu) yol.

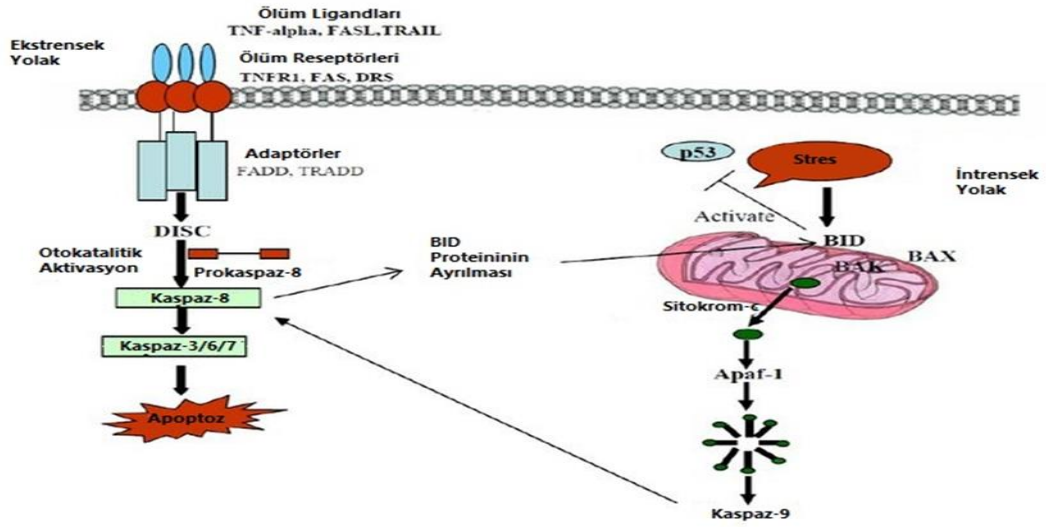
İntrensik yol ile gerçekleşen apoptoz, oksidatif stres, mitokondriyal bozukluk, terapötik kanser ajanları, hipoksi, iskemik-reperfüzyon hasarı ve iyonlaştırıcı ışınlar gibi DNA hasarına neden olan herhangi bir uyarandan tetiklenebilir. Mitokondriyal hasar, Sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasını kolaylaştıran dış



mitokondriyal zarın geçirgenliğinin artmasına neden olabilir. Serbest bırakılan Sitokrom C daha sonra kaspaz adaptörü apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'i bağlar, böylece prokaspaz 9'u aktive ederek ve "apoptozom" olarak adlandırılan bir kompleks oluşturarak apoptotik kaskadı tetikler. Bu kompleks, sırasıyla, kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazları aktive ederek DNA parçalanmasına ve hücre ölümüne yol açar (**Şekil 4.11.1.1**) (80).

Bütün intrinsik apoptoz olayları öncelikle Bcl-2 protein ailesi proteinlerinin aktivasyonunda büyük rol oynayan p53 tümör baskılayıcı protein tarafından kontrol edilir. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri pro-apoptotik (Bax, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad ve Blk) veya anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-X, ve BAG) olarak ikiye ayrılır. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri, mitokondrielerin membran bütünlüğünü belirler ve sitokrom C salınımı sürecinde yer alır (81).

Ekstrinsik yolla başlatılan apoptoz sürecinde öncelikle tümör nekroz faktörü (TNF) gen familyasına ait membrana bağlı ölüm reseptörleri aracılığıyla sinyal gönderilir. İlk sinyal Fas ligand/ FasR, TNF/TNF R1, Apo2L/DR4 veya TNF'ye bağlı apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) R1 gibi ligandlar ve hücre zarı ölüm reseptörleri arasındaki etkileşimler ile sağlanır ve bu reseptörlerin ölüm etki alanlarının ligasyonu ile sonuçlanır. Fas ligand'ın reseptörüne bağlanması adaptör proteini Fas ile ilişkili ölüm etki alanının (FADD) bağlanmasına neden olurken, TNF/tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) etkileşimi TNFR ile ilişkili ölüm etki alanının (TRADD) bağlanmasına neden olur ve bu da pro-kaspaz-8 aktivasyonu ile sonuçlanır. Pro-kaspaz-8, ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) yardımıyla otokatalitik olarak aktive edilir. Aktif kaspaz-8 ya Bid'i teşvik eder, böylece intristik yol da dış sinyalle birleşir ve aktive edilir, ya da caspase-3 ve caspase-7 ve apoptozun aktivasyon süreci intrinsik uyarımlarla aynı son yol ile sonlandırılır. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesi Bid, intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar arasında ortak bir moleküldür. Daha sonra, apoptozom oluşumu Bak ve Bax molekülleri ile sitokrom salınımı ile indüklenir (**Şekil 4.11.1.1**) (82).



Şekil 4.11.1.1. İntristik ve Ekstrinsik apoptoz yollarının genel işleyiş şeması (83)

#### 4.11.2. Apoptoz Ölçümü

80'li yıllarda morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz daha sonra DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'lı yıllarda apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştığının bulunması üzerine kaspaz aktivasyonu ölçülerek apoptoz belirlendi. 90'lı yılların sonunda fosfotidilserin translokasyonu ile apoptoz saptandı. 2000'li yıllarda sadece apoptotik epitelyal hücrelerde kaspaz aktivitesi ile kırılan bir protein olan keratin 18'in özgün formunu saptayan antikorlar kullanılarak apoptoz daha spesifik olarak saptandı.

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan çok sayıda yöntem vardır (84).

##### 1- Morfolojik görüntüleme yöntemleri

Işık mikroskobu ( hematoksilen boyama , giemsa boyama)

Floresan mikroskobu

Elektron mikroskobu

Faz-kontrast mikroskobu

##### 2- İmmüno histokimyasal yöntemler

Annexin V yöntemi

Tunnel yöntemi

M30 yöntemi

Kaspaz 3 yöntemi

### 3- Biyokimyasal yöntemler

Agaroz jel elektroforezi

Western blotting

Flow sitometri (DNA azalması – Annexin V)

### 4- Moleküler biyoloji yöntemleri

DNA microarray

### 5- İmmünolojik yöntemler

Elisa (DNA fragmantasyonu, M30 düzeyi, Annexin V)

Fluorimetrik yöntem (Kaspaz aktivasyonu)

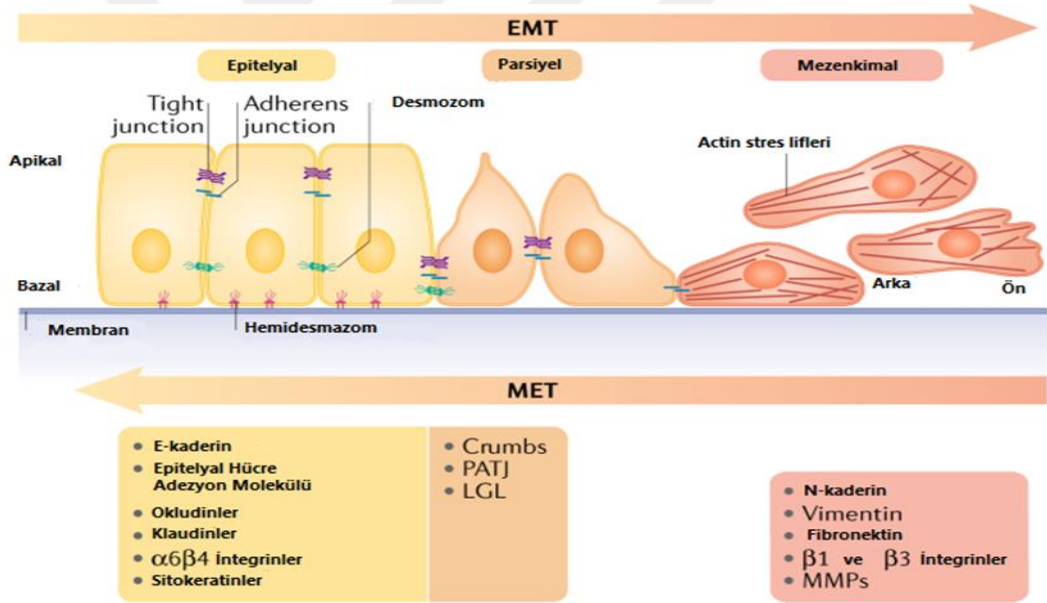
## **4.12. Epitelyal – Mezenkimal Dönüşüm (EMT)**

EMT ilk olarak erken embriyojenik morfogenezde merkezi bir farklılaşma süreci olarak keşfedilmiştir (85). Normal epitel hücrelerinin hücre polaritesi ve yapışma gibi özelliklerini kaybettiği, migrasyon ve invazyon gibi mezenkimal hücrelerin özelliklerini kazandığı patolojik bir olgudur (86). Bu işlem hem morfolojik hem de moleküler seviyelerde gerçekleşir. EMT, yara iyileşmesi, doku fibrozu ve kanser metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Kadınlarda EMT, plasenta oluşumu ve doğum sonrasında, inflamasyon ve doku onarımı ile uyumlu fibroblast oluşumu şeklinde görülür. Gelişmekte olan embriyo ve yetişkinlerde MET meydana gelebilir, böylece belirli bir yere göç ettikten sonra mezenkimal hücreler epitelyal hücrelere dönüşür (87). EMT, gelişim ve yara iyileşmesi sırasında normal olarak değerlendirilen bir süreç olmakla birlikte, fibrozis ve kanser metastazı dahil olmak üzere farklı patolojilerinde rol oynamaktadır (88). EMT kanser hücrelerinde metastazın en önemli basamağıdır. EMT'ye epitelyal ve mezenkimal belirteçlerdeki değişikliklere bakılarak karar verilmektedir. Epitelyal belirteçlerdeki (E-kaderin) azalma ve mezenkimal belirteçlerdeki (N-kaderin, vimentin) artma hücrenin EMT'ye gittiğinin göstergesidir. Kanser hücrelerinde EMT'nin önlenmesi veya EMT'den

MET'e dönüşümün sağlanması metastazın önlenmesi için etkili bir strateji ve ilaç araştırmaları için bir hedef olabilir (89).

#### 4.12.1. EMT Belirteçleri

Epitel hücreleri normalde lateral hücre-hücre bağlantıları (sıkı bağlantı bölgeleri, yapışma bölgeleri, geçit bağlantıları ve desmozomlar) tarafından bir arada tutulur. Apikal-bazal polarite gösterirler ve hemidesmozomlar ve  $\alpha6\beta4$  integrinler yoluyla altta yatan bazal membran ile etkileşirler. Ek olarak, epitel hücreler, epitel hücre katmanlarının çeşitli fiziksel streslere dayanıklılığını sağlamak için desmozomları stabilize eden spesifik sitokeratinleri ifade eder. EMT'nin aktivasyonu, hücre polaritesinin kaybı, hücre-hücre bağlantılarının bozulması, altta yatan bazal zarın bozulması ve hücre dışı matriksin (ECM) yeniden düzenlenmesi ile sonuçlanır (90).



Şekil 4.12.1.1. EMT – MET dönüşümünün gösterilmesi (90)

Tümör hücrelerinde EMT durumunda mezenkimal durumun göstergesi olan N-kaderin, vimentin, fibronektin,  $\beta1$  ve  $\beta3$  integrin ve matriks metalloproteinaz (MMP) 2,3,9 upregüle olmaktadır. E-kaderin, desmoplakin, sitokeratin, okludin ve  $\alpha6\beta4$  integrin gibi epitelial belirteçler ise down regüle olmaktadır (Şekil 4.12.1.1) (91).

#### **4.12.1.1. E-Kaderin**

Epitelyal hücre yapışma molekülü kaderin 1 (CDH1; epitelyal kaderin (E - kaderin) olarak da bilinir) iyi bilinen bir büyüme ve invazyon baskılayıcıdır. E-kaderin, doku organizasyonunu ve apoptozu bloke eden karmaşık mekanizmalarla tümör oluşumunu ve tümör yayılımını baskıladığı bilinmektedir. Bu mekanizmaların,  $\beta$ -katenin ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi protoonkogenik moleküllerin inhibisyonu ile birleştiğinde biyofiziksel yapışma süreçlerini ve mekanotransdüksiyon esaslı hücre içi sinyalleri içerdiği düşünülmektedir. Malign karsinom hücreleri E-kaderin fonksiyonunu çeşitli şekillerde ortadan kaldırır ve metastaz gelişimini sağlarlar (92).

#### **4.12.1.2. N-Kaderin**

N-kaderin, homotipik ve heterotipik hücre-hücre yapışmasına doğrudan aracılık eden klasik kaderinlerin kalsiyum bağımlı adezyon molekülü ailesinin bir üyesidir. Gelişim döneminde, N-kaderin kardiyak ve nöral dokuların oluşumu sırasında morfogenetik süreçlerde önemli bir rol oynar ve osteogenez, iskelet miyogenezi ve vaskülatürün olgunlaşmasında rol oynar. Yetişkinlik döneminde ise N-kaderin, nöral hücreler, endotel hücreleri, stromal hücreler ve osteoblastlar dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipinde eksprese edilir ve sinaps fonksiyonu, vasküler stabilite ve kemik homeostazi için tamamlayıcıdır. N-kaderin normal epitel hücrelerinde tipik olarak yoktur veya düşük seviyelerde eksprese edilirken, epitelyal kanser hücrelerinde N-kaderin'in anormal ekspresyonu, meme, prostat, ürotelyal ve pankreas kanseri gibi epitelyal malignitelerin iyi belgelenmiş kanser türlerinde görülür ve hastalık prognozu ile ilişkilidir (93).

EMT'nin belirlenmesindeki en önemli olaylardan biri E-kaderin ekspresyonunun down regülasyonu ve N-kaderin'in up regülasyonu veya de novo ekspresyonudur. Bu olay "kaderin değişimi" olarak ifade edilir ve artan migrasyon ve invaziv davranış ile ilişkilidir (94,95). E-kaderin down-regülasyonunun önemli bir sonucu, stabil epitelyal hücre-hücre bağlantılarının, apiko-bazal hücre polaritesinin ve epitelyal doku yapısının kaybıdır, böylece kanser hücrelerinin primer tümör bölgesinden salınmasını kolaylaştırır. E-kaderinin migrasyonu baskılayıcı rolünün aksine, N-kaderin, E-kaderin ekspresyonuna bakılmaksızın tümör hücrelerini geliştirmiş

migrasyon ve invaziv kapasiteye sahip hale getirir. Bu nedenle, N-kaderin artışının epitelyal kanser metastazı ve hastalık ilerlemesinde kritik bir adım olduğu görülmektedir (96,97,98).

#### **4.12.2. EMT Transkripsiyon Faktörleri**

Malign tümörlerde epitelyalden mezenkimale dönüşümün sağlanması için bir hücre bağlantı proteini olan E-kaderinin transkripsiyon faktörleri tarafından baskılanması gerekmektedir. Bu şekilde kanser hücrelerinin metastazı sağlanmaktadır. EMT'nin gücü öncelikle, hücreysel yeniden programlanmayı tetikleyebilen EMT-uyarıcı transkripsiyon faktörlerinin potansiyeline bağlıdır (99). EMT transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan faktörler arasında  $\delta$ EF1 ailesi dahil olmak üzere two zinc finger faktörleri (Zinc-finger E-box binding homeobox 1(ZEB1) / $\delta$ EF1 [d-kristalin /E2-box faktör 1] ve ZEB2/SIP1 [Smad ile etkileşen protein1]), Snail ailesi (Snail, Slug ve Smuc) ve temel sarmal döngü-sarmal faktörleri (Twist ve E12/E47) yer almaktadır. Bunlar arasında,  $\delta$ EF1 ailesi proteinlerinin (ZEB1 /  $\delta$ EF1 ve ZEB2 / SIP1) seviyeleri özellikle EMT fenotipleri ve kanser hücrelerinin agresifliği ile pozitif ilişkilidir (100).

Snail, Zeb ve Twist, EMT'yi indükleyen yaygın hücre dışı uyarılar (TGF- $\beta$ , Wnt ve büyüme faktörleri gibi) tarafından aktive edilir. Bunlar arasında en çok çalışılan TGF-  $\beta$ 'nın EMT'yi desteklemek için Snail, Zeb1 ve Twist'i up regüle ettiği bilinmektedir. EMT ayrıca hipoksi, reaktif oksijen türleri (ROS) ve DNA hasarının neden olduğu genotoksik stres gibi stresi indükleyen hücre koşulları tarafından tetiklenir. Stres koşulları ile uyarılan EMT, kemoterapi ve radyoterapiye direnç gelişimini kolaylaştırır, tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını artırır ve kanser kök hücreleri benzeri özellikler sağlar (101).

##### **4.12.2.1. Twist**

Twist (Twist1 olarak da bilinir) ve Twist ile ilişkili protein (Twist2) geniş homolojiyi paylaşır. Twist1 nöral tüp oluşumu için gereklidir ve iskelet gelişimi sırasında osteogenik ve kondrojenik hücrelerin mezenkimal öncüllerden farklılaşmasının düzenlenmesinde ve yeniden modellenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Öte yandan Twist2, benzer mekanizmalar yoluyla osteoblast

gelişimi sırasında osteoblast olgunlaşmasını engelleyerek hücreleri preosteoblast fenotipinde korur. Anormal bir Twist1 ifadesi veya gen metilasyonu sıklıkla metastatik karsinomlarda bulunur. Twist1'in aşırı ekspresyonu; PK, epitelyal yumurtalık kanseri gibi jinekolojik kanser, ürotelyal ve mesane kanseri, tiroid kanseri gelişimi ve ilerlemesi ile de ilişkilidir. Twist1, Akt (serin / treonine özgü bir protein kinaz), sinyal transdüseri ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3), mitojenle aktifleştirilen protein kinazı (MAPK), Ras, TGFβ ve Wnt sinyalleme dahil olmak üzere farklı sinyal yollarından kanser metastazında önemli bir rol oynar (102,103).

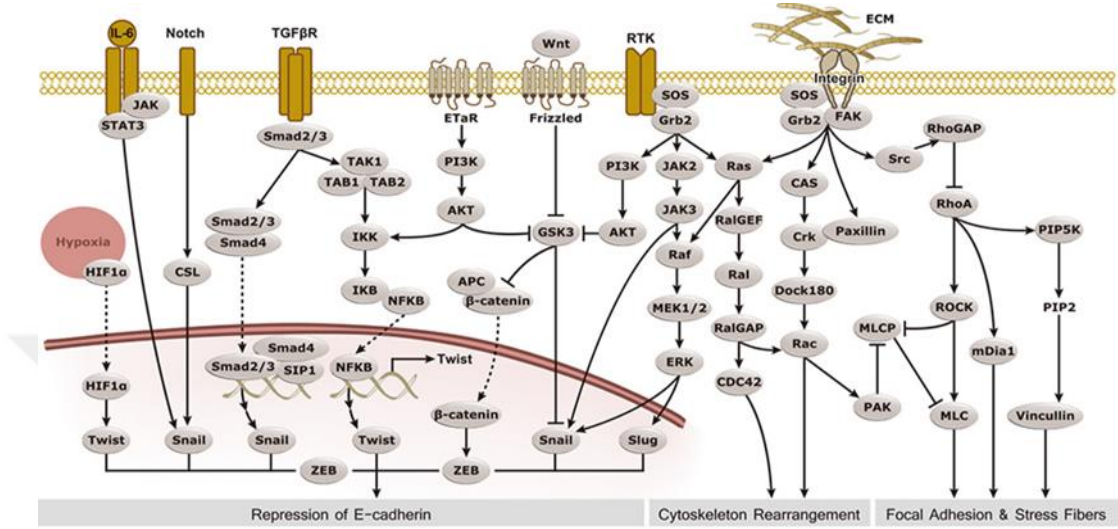
#### **4.12.2.2. Snail**

Drosophila embriyonik proteini Snail, mezoderm ve nöral krest oluşumu ve omurgalı ve omurgasız embriyoların merkezi sinir sistemi (CNS) gelişimi gibi uygun gelişim için gerekli olan transkripsiyon faktörü içeren bir zinc finger proteindir. Snail süper ailesi, Snail1 ve Snail2'yi (Slug olarak da bilinir) içerir ve tüm aile üyeleri transkripsiyonel baskılayıcıları kodlar ve E-box hekza-nükleotid DNA motifine bağlanan yüksek oranda korunmuş bir karboksi terminal alanı ile benzer bir organizasyonu paylaşır. Snail / Slug ekspresyonu, epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), TGFβ, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), Wnt, Notch, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) ve sitokinler gibi çoklu sinyal moleküllerinin kritik bir düzenleyicisi olduğu için kanser metastazı ile yakından ilişkilidir. Tümör mikroçevresinden gelen sinyal moleküllerinin, farklı hücresel bağlamlarda Snail / Slug'u aktive ettiği gösterilmiştir. Aktif Snail/ Slug, E-kaderin'i down regüle ederek ve hücre migrasyonu, invazyonu ve tümör progresyonunu teşvik ederek belirgin şekilde EMT'yi uyarır (104,105).

#### **4.12.2.3. Zeb**

Zeb ailesi (Zeb1 ve Zeb2), omurgalı embriyosunun normal gelişimi sırasında nöral krest hücrelerinin ve türev yapıların oluşumunda önemli bir rol oynayan bir grup zinc finger / homeodomain transkripsiyon faktörüdür. Zeb proteinleri, E-kaderin'i regüle ederek ve uzak organlara hücre migrasyonunu, invazyonunu ve nihayetinde metastazı kolaylaştırarak vimentin, fibronektin, N-kaderin ve MMP'ler gibi bir dizi diğer mezenkimal markeri düzenleyerek EMT'yi indükler. Zeb proteinlerinin ekspresyonu; büyüme ve steroid hormonları, hipoksiye bağlı faktör-1

alfa (HIF-1 $\alpha$ ) hipoksik koşullarda, FGF, insülin büyüme faktörü 1, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) reseptörü, Ras-ERK2-Fra1, NF- $\kappa$ B ve Janus kinaz (JAK) / STAT3 ve TGF $\beta$  / Smad, Wnt ve Notch gibi klasik sinyal yolları gibi çeşitli sinyal molekülleri tarafından aktive edilir (102,106).



**Şekil 4.12.2.3.1.** Snail, Slug, Twist, ZEB1/2 transkripsiyon faktörlerinin E-kaderin ile ilişkisi (107)

### 4.12.3. Prostat Kanserinde EMT

Kanser olan çoğu hasta, primer tümörlerin hayati organ ve dokulara metastaz yapması nedeni ile hastalığa yenik düşmektedir. PK kemiğe metastaz yapma eğilimindedir (108). Liu ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada aktif androjen reseptörü (AR)'nin E-kaderin ekspresyonunu down regüle ederek PK'inde metastazın teşvik edilmesine neden olduğu gösterilmiştir (109). Ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Snail; E-kaderini, E kaderin E-box bölgesine bağlanarak ve PK hücrelerinde transkripsiyonu baskılayarak regüle edebilir. Prostat tümörlerinde, Snail'ın yüksek ekspresyonu E-kaderin ekspresyonunun düşmesine neden olur (110).

PK'inde,  $\alpha$  ve  $\beta$ -kateninlerin ekspresyon seviyeleri klinik tümör derecesi ve evresi ile güçlü bir korelasyon gösterir ve düşük eksprese edilirler. Vimentin mezenkimal hücrelerde eksprese edilen bir tip III ara filament proteinidir ve hücre bütünlüğünü koruyan dinamik bir bağ görevi görür. Agresif, hormona duyarsız PK



hücrelerinde aşırı eksprese edilen vimentinin, invaziv fenotipi geliştirdiği bilinmektedir. Klinik PK'de, N-kaderin, vimentin ve fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin birlikte ekspresyonu, tümör mikroçevresinde nadirdir; bununla birlikte, Gleason 4 prostat tümörlerinde eşlik eden N-kaderin aşırı ekspresyonu ve E-kaderin down regülasyonu, zayıf diferansiye tümörleri karakterize eden kaderin değişiminin güçlü bir göstergesidir (111).

Standart TGF $\beta$  sinyali TGF $\beta$  ligandının tip II reseptörlerine (TGF $\beta$ RII) bağlanması yoluyla meydana gelir ve Smad proteinleri, Smad 2 ve Smad 3 yoluyla sinyal yayılımını başlatır. Reseptör substratı (RS) Smadlar olarak bilinen fosforlanmış Smadlar 2 ve 3, çekirdeğin içindeki Smad4 ile aprotein kompleksi oluşturur ve DNA bağlayıcı kofaktörlerle ilişkisini kolaylaştırır ve TGF $\beta$ 'ye cevap olarak sıralı transkripsiyonel programları aktive eder. İlerlemiş PK'indeki artmış TGF $\beta$  ekspresyonu PK progresyonu ile koreledir (112). PK'inde TGF $\beta$  sinyali farklı yollar üzerinden de başlatılabilir. Her biri EMT'ye farklı katkıları olan Erk / MAPK, JNK / p38MAPK, PI3 K / Akt yolları bu efektörler arasında bulunmaktadır (113).

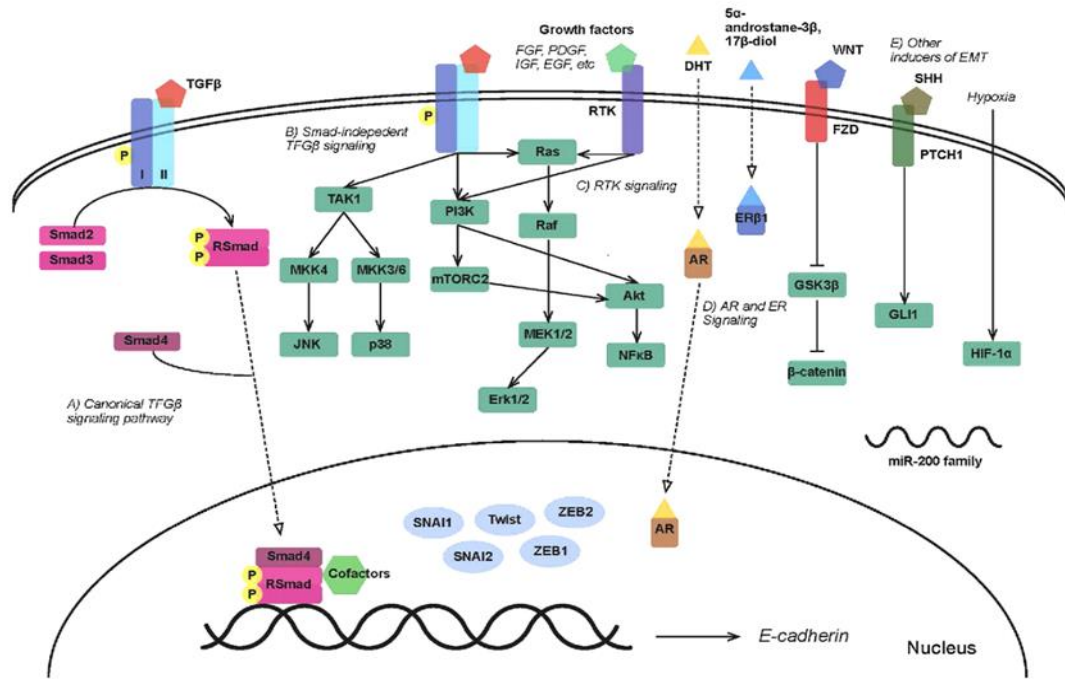
Östrojen reseptörü  $\beta$  (ER $\beta$ 1) ve ligandı 5a-androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol'ün temel rolü epitelyal fenotipin korunmasıdır. TGF $\beta$  ile indüklenen EMT durumunda ER $\beta$  ekspresyonunun azaldığı gözlenir. Çeşitli çalışmalarda gösterildiği gibi ER $\beta$ 1, HIF-1 $\alpha$ 'yı işlevsel olarak dengesizleştirir, dolayısıyla EMT'yi desteklediği bilinen bir transkripsiyon faktörü olan VEGF A'yı bastırır. Azalmış ER $\beta$  ekspresyonu EMT'yi teşvik etmek için tek başına yeterlidir ve PK'inde yüksek Gleason tümörlerinin karakteristik özelliğidir (114).

PK'deki EMT mekanizmaları transkripsiyon faktörleri olan Snail, Slug Twist ve Zeb ile düzenlenir. Transkripsiyon faktörleri Snail ve Slug, epitelyal gen ekspresyonlarını baskılayarak kanser ilerlemesine katkıda bulunur. Snail, Akt sinyalinin aktive ederek TGF $\beta$ 'nin neden olduğu EMT'nin yönlendirilmesinde gerekli gibi görünmektedir, bu da EMT'de Akt aktivasyonunun önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Metastatik PK'de Snail genini içeren bölgenin analizinde, PK progresyonunda Gleason skoru ile önemli ölçüde ilişkili olan Snail aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. PTEN / TP53 kaybı olan bir fare modelinde Snail ailesi baskılayıcı

aktivitesinin fonksiyonel analizi, Slug'ın TGF $\beta$  ile indüklenen EMT'nin ana regülatörü olduğu ve Snail'in nispeten küçük bir rol oynadığı bulunmuştur (115,116).

ZEB aktivasyonu Ras / MAPK veya Wnt /  $\beta$ -katenin sinyalini aktive eden büyüme faktörleri yoluyla gerçekleştirilir. ZEB1'in PK'indeki baskılayıcı etkileri, ZEB1 tarafından E-kaderin promotörüne alınan NAD'ye bağlı histon deasetilaz olan SIRT1'e bağlıdır. Mezenkimal fenotip sergileyen PK hücrelerinde, ZEB1'in inhibisyonu N-kaderin ve fibronektini azaltırken, E-kaderin ekspresyonunu geri kazandırır. PK'inde ZEB1, IGF tarafından Erk / MAPK'ya bağlı bir şekilde aktive edilebilir (117).

Hipoksik koşullar altında aktive edilen HIF-1 $\alpha$ , doğrudan Twist ekspresyonunu düzenleyerek EMT'yi indükler. Hipoksi yolağında yer alan ve Twist'ten önce gelen HIF-1 $\alpha$  tümör hücrelerinin hipoksiye adaptasyonunda anahtar bir rol oynar ve hipoksiye yanıt veren en kritik sinyal yolağıdır (118). HIF-1 $\alpha$  ile indüklenen EMT metastazda önemlidir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  seviyelerinin yükselmesi ile hücrelerin EMT'ye gittiği bulunmuştur (119,120,19). Twist, tümörojenik dönüşüm mekanizmalarını geçersiz kılarak erken yaşlanmayı karakteristik olarak inhibe edebilir. Klinik PK'inde Twist'in aşırı ekspresyonu, prostat epitelyumunun metastatik davranışı ve malign transformasyonu ile ilişkilidir. Twist ekspresyonunun fonksiyonel inhibisyonu, MET'e morfolojik geri dönüşüm ile sonuçlanır, bu da bir EMT transkripsiyon faktörünün baskılanmasının MET'e dönüşüm döngüsünü indükleyebileceğini gösterir (**Şekil 4.12.3.1**) (111).



Şekil 4.12.3.1. Prostat kanserinde EMT mekanizması (111)

#### 4.12.4. EMT Laktat Dehidrojenaz İlişkisi

Yapılan çalışmalara bakıldığında EMT sinyal yollarından olan HIF-1 $\alpha$ 'nın hipoksik ortamlarda LDH-A ekspresyonunu değişik kanser türlerinde arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (21,22,121). Kanser hücrelerinde LDH-A aktivitesindeki artış ile laktik asit artar ve laktik asidoz meydana gelir. Ortaya çıkan asidoz HIF-1 $\alpha$  üzerinden apoptoza direnç gelişmesine neden olur (25,122). Bu bilgiler ışığında artmış LDH aktivitesinin kanser hücrelerine daha agresif bir karakter kazandırdığı ve invaziv özelliğini arttırdığı söylenebilir.

#### 4.13. D vitamini

D vitamini yağda eriyen vitaminler arasında bulunan kolesterolden sentezlenen bir steroid hormondur. Az sayıda gıda doğal olarak D vitamini içerirken genel olarak ultraviyole B ışınlarına maruz kalma yoluyla deride sentezlenir (123). D vitamini başlangıçta biyolojik olarak inaktif bir öncül olarak sentezlenir, yarı ömrü 12-16 saattir. Karaciğerde, 3 haftalık bir yarılanma ömrüne sahip olan kolekalsiferol ana dolaşım formu olan 25-hidroksi D vitamini (25 (OH) D) 'ye dönüştürülür. Uzun yarılanma ömrü nedeniyle, 25 (OH) D, bireysel D vitamini seviyelerini değerlendirmek için en güvenilir bileşiktir. Son olarak molekül böbrekte kalsitriol

olarak da bilinen biyolojik olarak aktif forma, 1,25-dihidroksi vitamin D (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)'ye dönüştürülür. D vitamini formları dolaşımında vitamin D bağlayıcı proteinlere (VDBP) bağlanarak dolaşır. Aktif D vitamini formu olan 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hedef hücrelere girer, D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanır ve retinoik asit reseptörü (RXR) ile etkileşime yol açan konformasyonel bir modifikasyonu indükler. VDR, steroid-tiroid-retinoid asit reseptörü süper ailesinin hücre içi bir polipeptit parçasıdır. VDR / VDR homodimerleri veya VDR / RXR heterodimerleri olarak hedef hücre DNA'sına bağlanır ve özel protein sentezlerine yol açar (124). Her ne kadar D vitamininin en iyi bilinen işlevi kalsiyum ve fosfat serum seviyeleri arasında dengenin korunmasında oynadığı rol olsa da 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'nin hücre içi VDR'ye bağlanması ile 900'den fazla geni düzenleyerek birçok fizyolojik sürece dahil olur. Bu nedenle, D vitamini son zamanlarda fizyolojik homeostazın sürdürülmesi için gerekli görülmeğe başlanmıştır. Eksikliği, kanser, hipertansiyon, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (125).

#### **4.13.1. D vitamini Kanser İlişkisi**

Günümüzde D vitamini ve kanser arasındaki ilişkiyi aydınlatmak üzere çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan araştırmalarda D vitamini eksikliğinin meme, ovaryum, böbrek, mide, kolon ve PK ile ilgili olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur (126,127,128).

Bu araştırmalarda bulunan sonuçlar 4 ana başlık altında toplanmıştır;

1-Düşük D vitamini düzeyleri kanser gelişim riskini artırmaktadır (129,130),

2-Yüksek dozda vitamin D alımı kanser riskini azaltmaktadır (131,132),

3-D vitamini üretiminin yüksek olduğu yaz aylarında kanser riski düşmektedir (133),

4-D vitamini üretimindeki sinyal yollarında olabilecek hatalar, kanser riskini arttırmaktadır (134).

Epidemiyolojik ve prelinik çalışmalarda D vitamininin aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini tedavisinin yararlı etkileri gözlemlendiğinden, antikanser etkilerini açıklayan çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Elde edilen veriler, D

vitamininin metastaz ve hücre-mikroçevre etkileşimlerine kadar tüm tümör oluşum mekanizmasını regüle edebileceğini düşündürmektedir. Bu mekanizmalar, proliferasyon, diferansiyasyon, apoptoz, otofaji, EMT gibi hücre davranışlarının düzenlenmesini ve anjiyogenez, oksidatif stres, enflamasyon ve bağışıklık sistemi gibi hücre-mikroçevre etkileşimlerinin modülasyonunu içerir (135).

#### 4.13.2. D vitamini Prostat Kanseri İlişkisi

PK'inde D vitamininin rolünün incelenmesinin nedenlerinden biri, D vitamini ile PK riskini araştıran ve ilişki bulan çok sayıda epidemiyolojik çalışmaların olmasıdır. Diğer birçok tümörde olduğu gibi (Kolonorektal, meme, akciğer ve Hodgkin dışı lenfoma), çalışmalar kuzey enlemlerinde yaşayan D vitamini seviyeleri düşük erkeklerde PK riskinin çok yüksek olduğunu bildirmiştir. D vitamini ve PK arasındaki ilişki için en ikna edici vakalardan biri, Afro-Amerikalı erkeklerde yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Bu erkeklerde 25 (OH)D<sub>3</sub> seviyeleri genellikle düşüktür (esas olarak cilt pigmentasyonunun D vitamini intrakutan sentezini azaltan etkisinden dolayı) ve PK riski ve mortalitesi Kafkas ırkına göre açıkça yüksektir (136).

Hücrelerin D vitamini tedavisinin antikanser etkileri ile ilişkili biyokimyasal değişiklikler PK ve diğer kanser hücre hatlarında kapsamlı bir şekilde incelenirken, kanser hücrelerinin hayatta kalmasının ve proliferasyonunun inhibisyonunun altında yatan detaylı mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. İn vitro ve in vivo olarak en sık incelenen 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, aşağıdaki biyokimyasal etkilerle ilişkili olarak tümör büyümesini inhibe eder:

- 1- G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub>'de artan hücre sayısı ve p21 ve p27 gibi sikline bağlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin modülasyonu ile hücre döngüsünün durması,
- 2- Poli (ADP - riboz) polimeraz (PARP) bölünmesi, anneksin bağlanması ve artan Bax / BCL-2 oranı ile apoptoz indüksiyonu,
- 3- Fosforile mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (P-MAPK) hücre dışı sinyal ayarlı kinaz [ERK] 1/2, fosforile-AKT (P-AKT), AKT ve MAPK/ ERK kinaz (MEKK) -1 gibi "proproliferatif" sinyalleme moleküllerinin baskılanması,
- 4- Kaspaza bağlı MAPK / ERK kinaz klevajının indüksiyonu,

- 5- p53'ün indüksiyonu,
- 6- Anjiyogenezin inhibisyonu,
- 7- Motilite ve invazyon inhibisyonu,
- 8- Diferensiyasyonun indüksiyonu,
- 9- Tümör ile ilişkili büyüme faktörlerinin ekspresyonunun modülasyonu.

Bu tümör inhibisyon mekanizmalarının her birinin, in vitro ve in vivo PK ve diğer kanser modellerinde meydana geldiği açıklanmıştır. Ek olarak, önemli kanıtlar D vitamininin bağışıklık fonksiyonu ve inflamasyondaki rolünün de kanser oluşum riskini azalttığını göstermiştir (137).

#### **4.13.3. D vitamini EMT ilişkisi**

D vitamini EMT'nin negatif modülatörüdür. VDR reseptörü invazyon baskılayıcı E-kaderin ve tümör baskılayıcı sistatin D gibi çeşitli genlerin indüksiyonunu kontrol eden ve Wnt/ $\beta$ -katenin yolunu antagonize ederek EMT'ye karşı çıkar. Yapılan çalışmalarda  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün TGF $\beta$  tarafından indüklenen EMT'nin aksine etki gösterdiği ve bunu da EMT belirteçlerinin ekspresyonunu inhibe ederek yaptığı anlaşılmaktadır (138).

Meme ve kolon kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda, VDR,  $\beta$ -katenin ve Snail'in birbiriyle ilişkili olduğu bulunmuştur. VDR aktive edildiğinde, transkripsiyon faktörü 4 ile birleşmek için  $\beta$ -katenin ile rekabet eder, böylece kolon kanserinde  $\beta$ -katenin aktivitesini inhibe eder. Ligand bağlanması üzerine E-kaderin ekspresyonunu aktive eden VDR, Snail tarafından baskılanır, ancak ZEB1 tarafından indüklenir. Ligand ile aktive edilen VDR, epitelyal farklılaşmayı ve E-kaderin ve diğer hücreler arası adezyon genlerinin ekspresyonunu indüklediğinden Snail ve Slug tarafından VDR baskısı,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  varlığında bile EMT indüksiyonunu garanti eder. ZEB1, ZEB2, E47 ve Twist1 gibi diğer EMT indükleyicileri insan VDR gen promotörünü inhibe etmediğinden, bu etki Snail transkripsiyon faktörleri ailesine özgü gibi görünmektedir. Bazı çalışmalar, Snail ve Slug transkripsiyon faktörlerinin VDR'nin baskılayıcıları ve dolayısıyla kolon kanseri hücrelerinde  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  etkisinin olduğunu göstermektedir. Kolon kanseri biyopsilerinden elde edilen veriler,

Snail1 ve Slug'ın kolon kanseri ilerlemesi sırasında VDR down regülasyonundan sorumlu olabileceğini göstermektedir. Yüksek Snail1 ve Slug seviyeleri olan kanser hastaları daha düşük VDR ekspresyonuna sahiptir ve bu nedenle D vitamini bileşikleri ile tedaviye dirençlidirler (139).

#### 4.13.4. D vitamini Apoptoz İlişkisi

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'nin sağlıklı ve tümör dokularında VDR'ler aracılığı ile apoptoza neden olduğu bilinmektedir.

Ekstrinsik ve İntrinsik yollar üzerinden indüklenen apoptoz, kontrollü hücre ölümünü sağlamaktadır. Apoptoz mekanizmasında etkili olduğu düşünülen faktörlerden birisi de hücrel kalsiyumdur. Kalsiyum apoptoz için önemli bir düzenleyicidir ve apoptozun başlatılması ve apoptoz sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum artışı apoptoz üzerinden hücre ölümünü tetiklemektedir. Ancak kalsiyumun etki ettiği apoptoz sinyal yolağı ve hedefleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Olası hedefler olarak kaspazlar ve kalsiyum bağımlı nötral proteaz olan kalpainler düşünülmektedir (140).

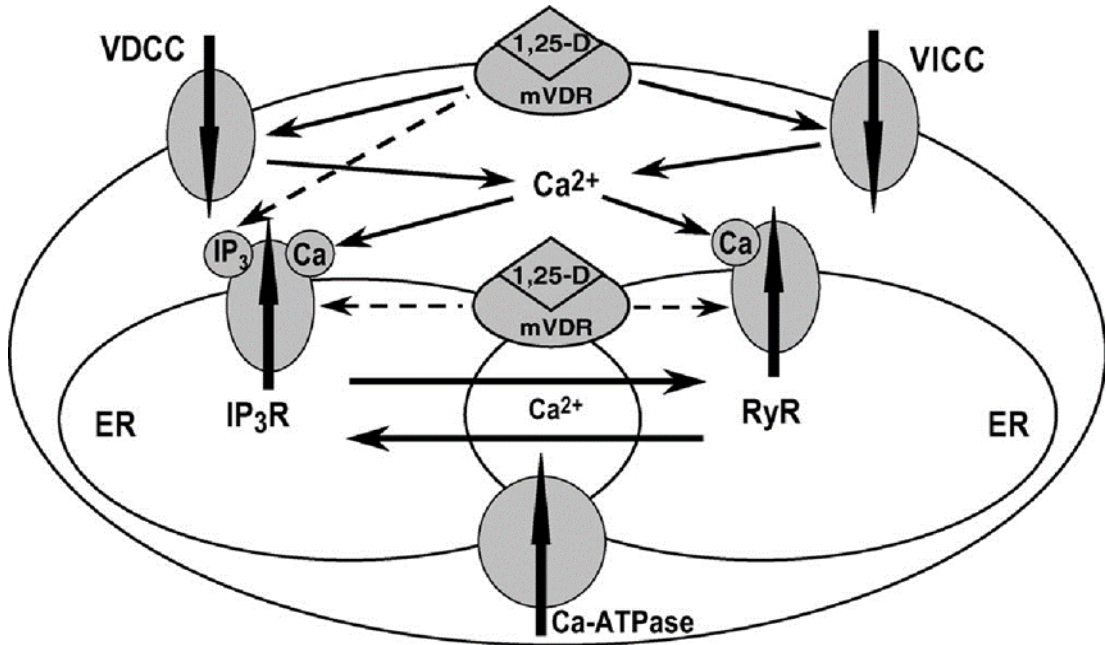
Kalsiyum iyonlarının apoptoza olan etkisinde ilk yol olarak, sitokrom c IP<sub>3</sub>R'e bağlanmakta ve büyük bir sitokrom c salınımı ile apoptoza yol açan bir amplifikasyon prosesi ortaya çıkmaktadır. İkinci yol olarak, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2/Bax aile üyeleri arasındaki denge endoplazmik retikulum (ER)'un kalsiyum içeriğini regüle ederek ve ER'den mitokondriye kalsiyum aktarımı hücre ölümünü tetiklemektedir. Ayrıca antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 direkt olarak IP<sub>3</sub>R ile etkileşime girebilir ve kalsiyum salınımını ve apoptozu inhibe edebilir (141).

Kalsiyum homeostatik mekanizması; voltaja bağımsız ve voltaja bağımlı kalsiyum kanalları üzerinden ekstrasellüler alandan kalsiyum girişini, ER depolarından kalsiyum salınımı ve kalsiyum sinyallerini yok eden sitozolik kalsiyum tamponlama sistemlerini içermektedir (142).

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> değişik hücre tiplerinde kalsiyum girişini, transferini ve kalsiyum tamponlamasını uyarmaktadır. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> voltaja bağımlı ve voltaja bağımsız kalsiyum girişini aktive eder ve ryanodin reseptörleri (RyR) ve IP<sub>3</sub>R

sayesinde ER'den kalsiyum salınımını tetikler. Ayrıca nükleer ve membran VDR'lerine bağlanan  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kalsiyum sinyallerini tetikler (143).

Kanser hücrelerinde ve gelişmiş adipositlerde  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  yüksek geçirgenlikte olan voltaja bağımlı kalsiyum kanalı üzerinden kalsiyum akışını indüklemekte ve ER'de bulunan  $\text{IP}_3$  reseptör/kalsiyum salınım kanalı üzerinden kalsiyum salınımı gerçekleştirmektedir. Bu sayede intrasellüler kalsiyum artışı olmaktadır. Bu da kalpain/kaspaz 12'ye bağımlı apoptotik yolağı aktive ederek apoptozu sağlamaktadır. Normal epitel hücrelerinde ise  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  etkisi ile kalsiyum hücre içine düşük geçirgenlikte olan voltaja bağımlı kalsiyum kanalı ve voltaja duyarlı kalsiyum kanalı üzerinden ve ER'de bulunan RyR reseptörleri tarafından hücre içine kalsiyum girişi sağlanmaktadır. Ancak voltaja duyarlı kalsiyum kanalının aktivasyonu ile intrasellüler kalsiyumun artışının durdurulması için vitamin D'ye bağımlı kalbindin D28k eksprese edilmektedir ve hücrenin apoptoza gitmesi durdurulmaktadır. Kalbindin D28k sadece normal epitel hücrelerinde sentezlenmektedir. Ayrıca, intrasellüler kalsiyum miktarının düşürülmesi için  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kalsiyum ATPaz miktarını artırarak hücre dışına kalsiyum pompalaması yapmaktadır (Şekil 4.13.4.1) (141,142,143).



Şekil 4.13.4.1.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün apoptoza etkisi (144)



## 5. YÖNTEM VE GEREÇLER

### 5.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- Faster Air Hücre Kültür Kabini (İtalya)
- İnkübatör, ESCO Cell Culture CO<sub>2</sub> Incubator (A.B.D.)
- Inverted Mikroskop (Zeiss, Almanya)
- Neubauer Hücre Sayım Lamı (Almanya)
- Eppendorf pipet seti (Almanya)
- BioTek Synergy HTX multimode plaka okuyucu (A.B.D.)
- Esco -80°C derin dondurucu (A.B.D.)
- Miele +4°C ve -20°C buz dolabı (Almanya)
- BioRad SDS-PAGE (A.B.D.)
- BioRad Trans-Blot sistemi (A.B.D.)
- BioRad Jel görüntüleme sistemi (A.B.D.)
- Thermo ABI 700 real time PCR (A.B.D.)
- Thermo soğutuculu santrifüj (A.B.D.)
- Azot tankı, Thermo (A.B.D.)
- ATCC Tramp-C2 prostat kanser hücre hattı (A.B.D.)
- Sodyum Okzamat (LDH-A İnhibitörü), Sigma (Almanya)
- Doseksel, Alfa Aesar (A.B.D.)
- 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini Calcijex (Kanada)
- DMEM yüksek glikozlu Gibco (A.B.D.)
- Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma, (Almanya)
- FBS Gibco (A.B.D.)
- Bovine İnsülin, Sigma (Almanya)
- Dehidroizoandrosteron, Sigma (Almanya)
- Penisilin- Streptomisin, Thermo (A.B.D.)
- Fare CK18-M30 eliza kiti, BT lab (Çin)
- Fare Laktat eliza kiti, MyBiosource (ABD)
- Roche TUNEL kiti, Sigma (Almanya)
- N-kaderin, Slug primer antikor, Elabscience (A.B.D.)
- E-kaderin, Snail, Twist, HIF-1 $\alpha$  primer antikor, BT lab (Çin)

- Sekonder antibody, BT Lab (Çin)
- qPCR probları (E-kaderin, N-kaderin, Snail, Slug, Twist, HIF-1 $\alpha$ ), Thermo (A.B.D.)
- qPCR kontrol probu C18S, Thermo (A.B.D.)
- Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kiti, Mini boy PVDF, BioRad (A.B.D.)
- 10x Tris Buffered Saline (TBS), BioRad (A.B.D.)
- Tween 20, BioRad (A.B.D.)
- EveryBlot Blocking Buffer, BioRad (A.B.D.)
- Clarity Western ECl Substrat, BioRad (A.B.D.)
- Precision Plus Protein WesternC Standart, BioRad (A.B.D.)
- RNA izolasyon kiti, Hybrid-R mini, Geneall (Kore)
- 2X qPCR probe master mix (UDG), A.B.T. (Türkiye)
- cDNA sentez kiti, A.B.T. (Türkiye)

## 5.2. Hücre Kültür Deneyleri

Bu çalışmada fare Tramp-C2 metastatik PK hücre hatları (ATCC® CRL-2731™) kullanılmıştır ve bu hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiştir (**Tablo 5.2.1**).

**Tablo 5.2.1.** Tramp-C2 prostat kanser hücre hattı özellikleri

Hücre Hattı	Elde edilen yer/doku	Hücre Türü	Hastalık	Eksprese edebildiği gen ve reseptörler
Tramp-C2	32 haftalık erkek C57BL/6 türü fareden izole edilmiş PK hücre hattı	Epitelyal	Adenokarsinoma	Androjen reseptörü, E-kaderin, sitokeratin

Tramp-C2 PK hücre hatları %5 fetal sıgır serumu (FBS), %5 Nu-serum IV, 10nM dehidroizoandrosteron, 0,005 mg/ml bovine insülin ve %1 penisilinstreptomisin eklenen yüksek glikoz içeren Dulbecco's modiefied Eagle's medium (DMEM) hücre kültür ortamı kullanılarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde çoğaltıldı. (145). Hücrelerin takipleri Zeiss marka inverted mikroskop altında yapıldı. Hücreler gerekli yoğunluğa ulaştığında pasajlandı ve ilk pasajlamadan elde edilen hücreler dondurularak -196°C'de saklandı. PK hücrelerinin hayvanlara enjeksiyonu ise 6. pasajdaki hücreler kullanılarak yapıldı.

## 5.3. Elde Edilen Hücre Hatlarının C57BL/6 Türü Farelere Enjeksiyonu

Kültür sonucu oluşturulan TRAMP-C2 hücreleri PBS içinde her bir fareye 2x10<sup>6</sup> sayısında olacak şekilde C57BL/6 türü farelerin sırtına subkutan olarak 27 gauge enjektör ile inoküle edildi. Enjeksiyon gününden sonra her iki günde bir tümör

enjeksiyonu yapılan bölge palpe edilerek tümörün oluşumu izlendi. Üç hafta sonunda yaklaşık 2 mm boyutlarında tümöral nodül oluşumundan sonra oluşturulan tümörlerin boyutları 3 günde bir olmak üzere elektronik kumpas yardımı ile ölçüldü ve hacimleri hesaplandı (**Şekil 5.3.1**). Hesaplanan hacimler kayıt altına alındı.

Tümör Hacmi= (Uzunluk X Genişlik<sup>2</sup>)/2 (146)



**Şekil 5.3.1.** Farenin sırtında oluşan tümörün yeri ve görünümü

#### **5.4. Hayvan Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulanan İlaç Dozları**

Çalışmamız İstanbul Medipol Üniversitesinde yer alan Medipol Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM)'dan temin edilen 70 adet 10 – 12 haftalık sağlıklı C57BL/6 türü erkek fareler kullanılarak yapıldı. Fareler 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda,  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  oda ısısında tutuldu. Beslenmeleri konusunda hiçbir kısıtlama yapılmadı. Fareler her bir grupta 10 adet olmak üzere 7 gruba ayrıldı (**Tablo 5.4.1**).

**Tablo 5.4.1.** Deney grupları

<b>Grup Numarası</b>	<b>Grup Adı (n=10)</b>
Grup 1	Kontrol Grubu
Grup 2	PK Kontrol Grubu
Grup 3	PK- <b>Dosetaksel</b>
Grup 4	PK – <b>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini</b>
Grup 5	PK- <b>LDH inhibitörü (Sodyum Okzamat)</b>
Grup 6	PK- <b>LDH inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini</b>
Grup 7	PK- <b>LDH inhibitörü + Dosetaksel</b>

PK oluşturulan C57BL/6 türü erkek farelere enjeksiyonlar aşağıdaki dozlarda uygulandı.

Grup 1: Fosfat Tamponu (PBS)

Grup 2: PBS

Grup 3: 5 mg/kg Dosetaksel (5)

Grup 4: 5µg/kg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (147)

Grup 5: 300 mg/kg LDH-A inhibitörü (Sodyum Okzamat) (4)

Grup 6: 300 mg/kg LDH-A inhibitörü (Sodyum Okzamat) ve 5µg/kg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini kombine tedavisi.

Grup 7: 300 mg/kg LDH-A inhibitörü (Sodyum Okzamat) ve 5 mg/kg Dosetaksel kombine tedavisi.

LDH-A inhibitör enjeksiyonu 14 gün boyunca her gün, PBS, Dosetaksel ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini enjeksiyonları 14 gün boyunca haftada 3 kere (Pazartesi,

Çarşamba, Cuma günleri) olmak üzere intraperitonel olarak uygulandı (148,149,150,151,152).

### 5.5. Kan Örneklerinin Alınması

C57BL/6 türü PK oluşturulan erkek fareler 14 gün ilaç uygulamasından sonra ketamin/ksilazin (200/10 mg/kg) yardımı ile anestezi altına alındı. Farelerin kanları kardiyak ponksiyon yöntemi kullanılarak kırmızı kapaklı jelli kan tüplerine alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve serum örnekleri ayrıldı. Ayrılan serum örnekleri çalışma yapılana kadar -80°C'de saklandı.

### 5.6. Doku Örneklerinin Alınması

Kanları alınan farelerin karaciğer, böbrek ve tümör dokuları alındı (**Şekil 5.6.1**). Dokuların bir kısmı biyokimyasal analizler için -80°C'de saklanırken, diğer kısımları histolojik incelemeler için nötral tampon solüsyonu içine alındı ve doku takipleri yapılarak parafin blok içine gömüldü.



**Şekil 5.6.1.** Farelerden çıkarılan tümör dokuları

## 5.7. Serum Örneklerinde Bakılan Parametreler

Serum örneklerinde apoptozu değerlendirmek için fare CK18-M30 Elisa testi ve LDH-A inhibitörünün etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile fare Laktat Elisa testi yapıldı. Uygulanan ilaç ve kimyasalların yaptıkları toksik etkiyi değerlendirmek için total antioksidan kapasite (TAK), total oksidan statüsü (TOS) kolorimetrik yöntemle ölçüldü ve oksidatif stres indeksi (OSİ) hesaplandı. Ölçümler İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında bulunan BioTek Synergy HTX multimode reader cihazı kullanılarak yapıldı (Şekil 5.7.1).



Şekil 5.7.1. Synergy HTX multimode reader cihazı

### 5.7.1. CK18-M30 Elisa Testi

Fare CK18-M30 Elisa testi Bioassay Technology Laboratory marka (Katalog No: E1994Mo) kit kullanılarak yapıldı.

#### Testin Prensibi

Testin prensibi sandviç Elisa yöntemine dayanmaktadır. 96 well plate daha önceden fare CK18-M30 antikoru ile kaplanmıştır. CK18-M30 içeren örnekler plate kuyucularına eklendiğinde antikorlara bağlanır. Daha sonra biyotinlenmiş antikor örnekteki CK18-M30 antikoruna bağlanır. Bunların üzerine Streptavidin-HRP eklenir ve o da biyotinlenmiş CK18-M30 antikoruna bağlanır ve plate inkübasyona

bırakılır. İnkübasyondan sonra bağlanmayan Streptavidin-HRP konjugatının uzaklaştırılması için yıkanır. Sonra Substrat solüsyonu eklenir ve kuyucuklarda renk oluşumu örnekte bulunan CK18-M30 miktarına bağlı olarak oluşur. En son durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulur ve plate mikroplate okuyucuda 450 nm’de okunur.

#### Testin Yapılışı

- 1- Gerekli bütün reaktifler deneye başlanmadan önce oda sıcaklığına getirildi.
- 2- Standart eğri grafiğinin çizimi için orjinal standart (1280 µIU/ml) dilüe edilerek azalan konsantrasyonlara sahip standartlar elde edildi (**Tablo 5.7.1.1**).

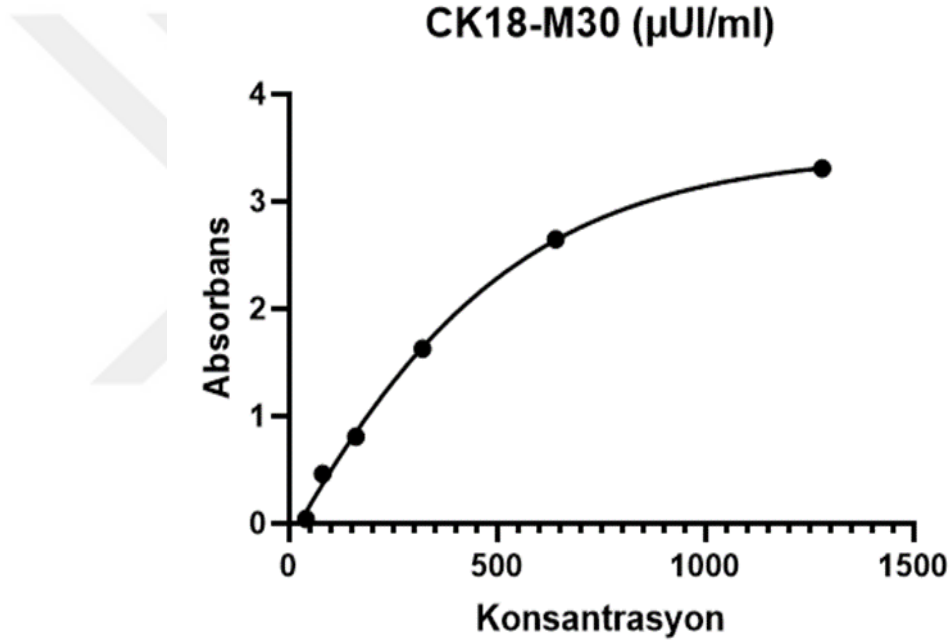
**Tablo 5.7.1.1.** Standartların Hazırlanması

640 µIU/ml	Standart No.5	120µl Orjinal Standart + 120µl Standart Dilüent
320 µIU/ml	Standart No.4	120µl Standart No.5 + 120µl Standart Dilüent
160 µIU/ml	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart Dilüent
80 µIU/ml	Standart No.2	120µl Standart No.3 + 120µl Standart Dilüent
40 µIU/ml	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart Dilüent

- 3- Hazırlanan standart çözeltiler plate üzerindeki kuyucuklara 50 µl olarak pipetlendi.
- 4- Geri kalan kuyucuklara 40 µl serum örneği ve üzerine 10 µl antikor eklendi. Standart çözeltileri antikor içerdiğinden üzerlerine ayrıca antikor eklenmedi. Bütün kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve plate’in üzeri kapatıcı ile kapatılıp 37°C’de 60 dakika inkübe edildi.
- 5- İnkübasyon sonunda plate 5 defa 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı.



- 6- 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B reaktifi bütün kuyucuklara sırasıyla eklendi ve karanlıkta 10-15 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- 7- İnkübasyon sonunda 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve reaksiyon durduruldu.
- 8- Plate 450 nm'de okutuldu ve örneklerin CK18-M30 serum absorbanları Biotek Synergy HTX multi-mode okuyucu ile okundu.
- 9- Standart eğri grafiğinden elde edilen denklem yolu ile örneklerin serum CK18-M30 konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 5.7.1.1. CK18-M30 standart eğrisi

### 5.7.2 Laktat Elisa Testi

Fare Laktat Elisa testi MyBioSource marka (Katalog No: MBS756195) kit kullanılarak yapıldı.

Testin Prensibi:

Laktat Elisa testi yarışmalı enzim prensibine dayanmaktadır. Çalışma örnekleri ve tampon çözeltiler, laktat-HRP konjugatı ile antikor kaplı plate içinde 1 saat inkübe edilirler. İnkübasyon periyodundan sonra, plate hücreleri 5 defa yıkama

solüsyonu ile yıkanır. Hücrelere HRP enzimi için olan substrat ile inkübe edilir ve enzim-substrat reaksiyonu sonucu mavi renk oluşur. Reaksiyonu durdurmak amacıyla durdurma solüsyonu ilave edilir ve mavi renk sarı renge döner ve reaksiyon durur. Rengin şiddeti mikro plate okuyucuda 450 nm’de okunur.

#### Testin Yapılışı

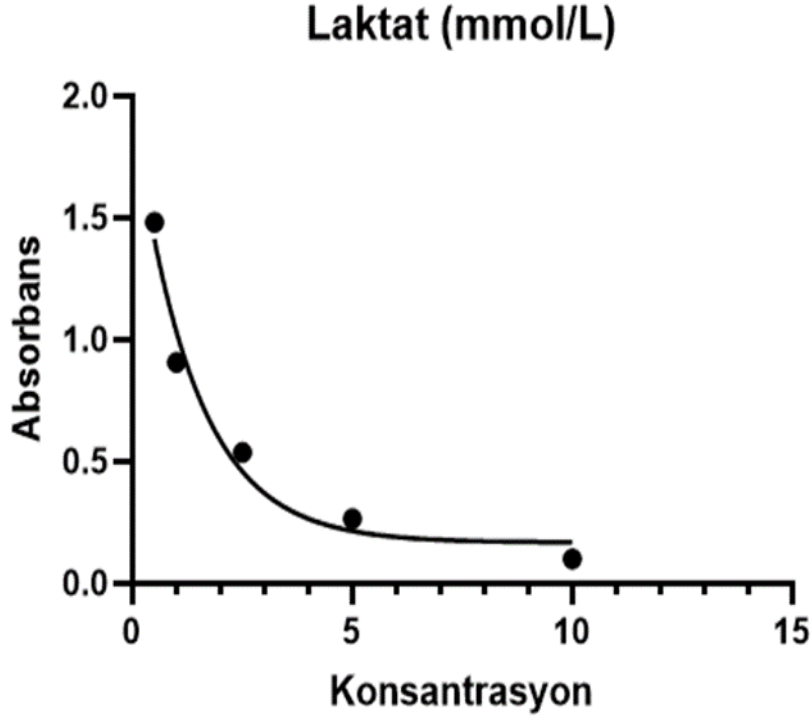
- 1- Hazır olarak gelen 0-10 mmol/l aralığındaki 6 tane standarttan (**Tablo 5.7.2.1**) ve çalışma serum örneklerinden 100 µl plate üzerinde belirlenmiş kuyucuklara eklendi.

**Tablo 5.7.2.1.** Standart Konsantrasyonları

Standartlar	Standart Konsantrasyonları
Standart A	0 mmol/l
Standart B	0,5 mmol/l
Standart C	1 mmol/l
Standart D	2,5 mmol/l
Standart E	5 mmol/l
Standart F	10 mmol/l

- 2- 50 µl konjugat bütün kuyucuklara eklendi ve plate 1 saat 37°C’de inkübe edildi.
- 3- İnkübasyon sonunda plate 5 defa 350 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 4- 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B reaktifi bütün kuyucuklara sırasıyla eklendi ve karanlıkta 15-20 dakika 37°C’de inkübe edildi.
- 5- İnkübasyon sonunda 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
- 6- Plate 450 nm’de okutuldu ve örneklerin Laktat serum absorbansları Biotek Synergy HTX multi-mode okuyucu ile okundu.

- 7- Standart eğri grafiğinden elde edilen denklem yolu ile örneklerin serum laktat konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 5.7.2.1. Laktat standart eğrisi

### 5.7.3. Total Antioksidan Kapasite

Testin Prensipleri:

ABTS reaktifi, tampon çözelti varlığında ortamın pH'sı sabit tutularak, hidrojen peroksit ile radikal hale getirilir. Oluşan çözelti koyu yeşil-lacivert arası bir renge sahiptir. Serum ilave edildiğinde serumun içerisindeki antioksidanlar mevcut ABTS radikallerini nötralize eder. Nötralizasyon gerçekleştiği ölçüde çözeltinin rengi açılır. Dolayısıyla serumda bulunan total antioksidan miktarı ile çözeltinin renk şiddeti orantılıdır (153).

Kullanılan Reaktifler:

**R1:** 0.4 Molar Asetat tamponu (pH:5.8)

**R2:** 30 mM Asetat Tamponu (pH:3.6) + 10 mM ABTS reaktifi + 1000 ml için 278 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + %10 Etilen glikol

**Standart:** 0.1 Molar (pH:8) Tris tamponu içinde 1 mM Potasyum hekzasiyanoferrat ( $C_6FeK_3N_6$ ).

Deneyin Yapılışı:

**Tablo 5.7.3.1.** TAK Ölçümü İçin Deney Planı

	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Standart</b>	<b>Serum</b>
<b>Numune</b>	100 ul	15 ul		6 ul
<b>Standart</b>	100 ul	15 ul	6 ul	
<b>Kör</b>	100 ul	15 ul		

**Tablo 5.7.3.1**'de belirtilen şekilde hazırlanan numuneler, standart ve kör çözeltilerinin absorbanları 658 nm'de okundu. Aşağıdaki bulunan formül kullanılarak TAK (mmol Trolox Equiv.) konsantrasyonları hesaplandı.

TAK= (Çözeltinin Absorbansı X Standardın Absorbansı) X Standardın Konsantrasyonu

#### **5.7.4. Total Oksidan Seviye (TOS)**

Testin prensibi

$Fe^{2+}SO_4$  suda çözünür ve  $Fe^{2+}$  açığa çıkar. Serum da bulunan oksidanlar  $Fe^{2+}$  nin  $Fe^{3+}$  ya yükseltgenmesini sağlar. Kullanılan X-orange reaktifi  $Fe^{3+}$  ile renkli bir kompleks verir. Oluşan rengin şiddeti; TOS ile orantılıdır (154).

Kullanılan Reaktifler:

**R1:** Fox solüsyonu: 140 mM NaCl + 25mM Sülfürik asit

Fox solüsyonu içine 150mM D-Sorbitol + 250 $\mu$ M X-orange

**R2:** Fox solüsyonu içine 10mM 4-Hidroksibenzoik asit + 5mM Amonyum  $Fe^{2+}SO_4$

**Standart:**20 $\mu$ M  $H_2O_2$

Deneyin Yapılışı:

**Tablo 5.7.4.1.** TOS Ölçümü İçin Deney Planı

	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Standart</b>	<b>Serum</b>
<b>Numune</b>	112,5ul	5 ul		17,5 ul
<b>Standart</b>	112,5ul	5 ul	17,5 ul	
<b>Kör</b>	112,5ul	5 ul		

**Tablo 5.7.4.1**'de belirtilen şekilde hazırlanan numuneler, standart ve kör çözeltilerinin absorbanları 658 nm'de okundu. Aşağıdaki bulunan formül kullanılarak TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv.) konsantrasyonları hesaplandı.

$\text{TOS} = (\text{Çözeltinin Absorbansı} \times \text{Standartın Absorbansı}) \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$

OSİ değeri ise  $\text{TOS}/(\text{TAK} \times 10)$  formülü kullanılarak hesaplandı.

## **5.8. Doku Örneklerinde Bakılan Parametreler**

PK oluşturulan C57BL/6 türü farelerin tümör dokularında apoptozu değerlendirmek için TUNEL boyaması ve EMT'yi değerlendirmek için western blot ve qPCR testleri yapıldı. Uygulanan ilaç ve kimyasalların toksik etkisinin anlaşılması için karaciğer dokusu Hematoksilen-Eozin (HE) ve böbrek dokusu ise periyodik asit schiff baz (PAS) boyası ile boyandı.

### **5.8.1. Doku Takibi**

%10 nötral formalin içinde duran tümör, karaciğer ve böbrek dokuları önce akan musluk suyunda 1 saat bekletildi. Dokular sırasıyla alkolde (%70, %90, %96) 60°C'lik etüv içerisinde 1 saat bekletildi. Sonrasında %100'lük alkolde 30 dakika etüv içerisinde bekletildi. Tekrar alkol değişimi yapılarak %100'lük alkolde etüv içerisinde bekletildi. Daha sonra tolüene alınan dokular yaklaşık 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sıvı parafine alınan dokular etüv içerisinde bir gece

bekletildi. Ertesi gün kalıplara alınarak dokular gömüldü ve çalışma yapılana kadar oda sıcaklığında saklandı.

### **5.8.2. Karaciğerde HE Boyama**

Hazırlanan preparatlar deparafinizasyon işleminin yapılması için 1 saat 60°C'ye ayarlanmış etüvde bekletildi. Sonra preparatlar 30 dakika boyunca Ksilen/Toluen içerisinde bekletildi. %100, %96, %70'lik alkol serilerinde geçirilerek preparatlar dehidrate edildi. Alkol serilerinden sonra 1 kez distile sudan geçirilen preparatlar hematoksilin içerisinde 15 dakika bekletildi. Sonrasında akan çeşme suyu altında mordanlama için 10 dakika bekletildi ve Eosin boyasında 1,5 dakika bekletildi. Preparatlar boyanın rengi şeffaf olana kadar distile su içerisinde yıkandı ve %70, %96, %100'lük alkol serilerinden geçirildi. Yine Ksilen/Toluen içinde 10 dakika preparatlar parlaklaştırıldı. En son bio mount solüsyonu damlatılarak lamel kapatıldı. Preparatlar Nikon Eclipse Ni araştırma mikroskobu ile görüntülendi ve karaciğer dokuları skorlandı.

Grade 0: Çok minimal ya da hasarlanma bulgusu yok

Grade 1: Hafif hasarlanma ile karakterize sitoplazmik vakuolizasyon ve fokal nükleer piknoz.

Grade 2: Orta derece hasarlanma hafif mononükleer hücre infiltrasyonu, sitoplazmik vakuolizasyona ilaveten, hepatositlerde şişme, nekroz yok, sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon, intersellüler sınırlarda bulanıklık.

Grade 3: Hafif şiddetli hasarlanmada koagülasyon nekrozu, şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonu, sitoplazmik hipereosinofili, geniş sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon.

Grade 4: Şiddetli hasarlanmada şiddetli koagülasyon nekrozu ve hepatik hücre kordonlarında disintegrasyon ve hemoraji, doku yapısında bozulma (155).

### **5.8.3. Böbrekte PAS Boyama**

Bazal membran boyamalarını göstermek amacı ile PAS boyaması yapıldı. Hazırlanan preparatlar tolüende 1 saat parafinin giderilmesi için bekletildi. %100, %96, %70'lik alkol serilerinden geçirildi ve distile suya alındı. 5 dakika periyodik

asitte (sigma) bekletildi. Sonrasında 10 dakika akar suda bekletildi ve distile su ile 3 kez çalkalandı. Schiff solüsyonu (sigma) içinde 10 dakika karanlıkta bekletildi ve 5 dakika boyunca 3 kez yıkama solüsyonunda bekletildi. Preparatlar çeşme suyunda 5 dakika bekletildi. Sonra 5 dakika Hematoksilen (çekirdek boyası) bekletildi. %70, %96, %100 alkol serilerinde geçirildi ve sonrasında preparatlar 3 kez toluenden geçirildi. Üzerleri bio mount solüsyonu damlatılarak kapatıldı ve Pas boyası yapılan böbrek dokusu kesitlerinde glomerül mezengial matriks oranı Nikon Eclipse Ni araştırma mikroskobu ile X40 büyütmede rastgele alanlardan seçilen 20 adet düzgün şekilli glomerül üzerinde çift kör çalışma ile yapıldı. Her glomerülde lezyonun oranı 0 ila +4 arasında derecelendirildi (156).

#### **5.8.4. TUNEL Yöntemi**

Parafine gömülmüş dokular deparafinize etmek amacıyla 60°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan dokular 45 dakika ksilende bekletildi ve daha sonra sırasıyla %100, %96, %70'lik alkolde 2 dakika ve distile suda 2 defa 5'er dakika bekletildi. Daha sonra örnekler 15 dakika boyunca buz üzerinde permalizasyon (%0,1 TritonX) solüsyonu ile inkübe edildi. 3 defa 5'er dakika olmak üzere PBS solüsyonu ile yıkaması yapıldı. Kesitler 0.1M Sitrat Tamponu (pH 6.0) içeren şaleyeye yerleştirilerek 800 W mikrodalga fırında 1 dakika antijen retrieval için kaynatıldı. Soğuması için 20 dk. oda sıcaklığında bekletildi. 2 defa 5'er dakika olmak üzere PBS solüsyonu ile yıkaması yapıldı.

Roche TUNEL ticari kitindeki enzim ve etiketleme solüsyonlarından 1/9 oranında karışım hazırlandı (5 µl enzim solüsyonu + 45 µl etiketleme solüsyonu). Preparatlar 37°C'lik etüvde 1 saat, üzeri ışık almayacak şekilde kapatıldı ve hazırlanan reaksiyon karışımı ile inkübasyonu yapıldı. Tekrar PBS solüsyonu ile 3 defa 5'er dakika yıkandı ve çekirdeklerin boyanması için DAPI çekirdek boyasında yaklaşık 5 dakika bekletildi. Preparatlar lamel ile kapatıldı. Konfokal immünfloresan mikroskopu eksitasyonu 450 – 550 nm ve deteksiyonu 515-565 nm olarak ayarlandı. Preparatlar mikroskop altında görüntülendi ve apoptoza giden hücreler belirlendi

### 5.8.5 Western Blot

Kullanılan Reaktifler:

**Lizis Tamponu:** Radyo İmmünopresipitasyon deney tamponu (RIPA) + Proteaz inhibitörü

**Yükleme Tamponu:** 2X laemmlı tamponu (Sigma Aldrich)

**Yürütme Tamponu:** 25 mM Tris + 190 mM Glisin + % 0,1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

**Transfer Tamponu:** 25 mM Tris Baz + 190 Mm Glisin + %20 Metanol (pH:8.3)

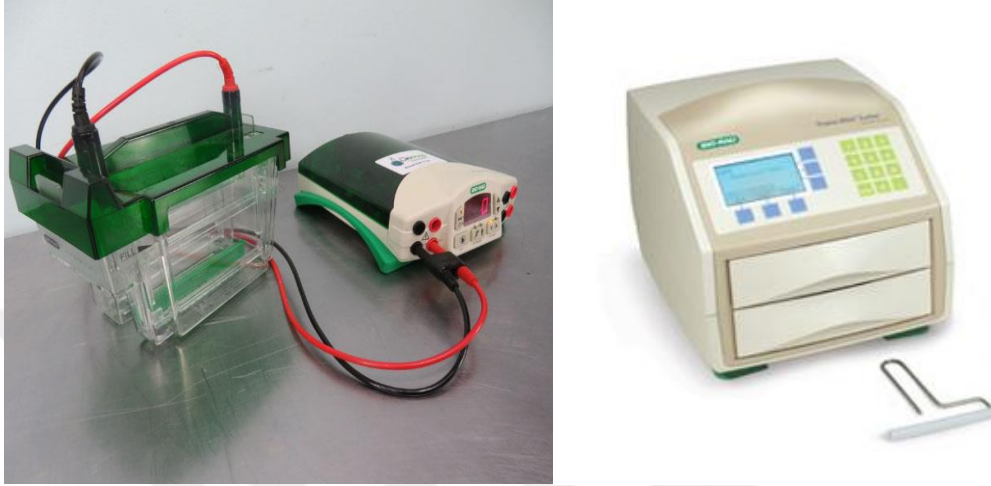
**Bloklama Tamponu:** EveryBlot Blocking Buffer (BioRad)

**Yıkama Tamponu:** 1X TBS + %0,1 Tween 20

Tümör doku örneği Shimadzu ATX 224 marka terazide tartılarak 5 mg'lık bir parça alındı. Alınan doku bistüri ucu ile çok ufak parçalara ayrıldı. Soğuk RIPA lizis tamponu içinde Qiagen homojenizatör yardımı ile bu dokular tamamen parçalandı. Daha sonra 2 saat +4°C'de orbital karıştırıcı üzerinde dokular bekletildi. 2 saat sonunda 12.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant eppendorf tüplere alındı. Elde edilen süpernatanın protein konsantrasyonu Thermo Fischer Nanodrop cihazı kullanılarak belirlendi ve 20-30 µg protein içeren örnekler yükleme tamponu ile hazır alınan BİORAD marka %4 – 20 yüzdesine sahip jelde 100- 150 V altında 1 saat boyunca sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütüldü. Jel üzerinde yürüyen proteinler elektroforetik olarak poliviniliden florid (PVDF) membran üzerine Bio-Rad Trans-Blot sistemi kullanılarak aktarıldı (Şekil 5.8.5.1). EveryBlot Blocking Buffer (BioRad) ile bloklanan membran gece boyunca +4°C'de E-kaderin, N-kaderin, HIF-1α, SNAIL, SLUG, TWIST primer antikorumları (dilüsyon oranları 1/1000) ile inkübe edildi. Kontrol olarak β-aktin primer antikoru (dilüsyon oranı 1/2000) kullanıldı (Tablo 5.8.5.1) (Tablo 5.8.5.2). Primer antikorumlarla muamele edilen membran tris tamponu-Tween 20 (TBST) çözeltisi ile 3 kere yıkandı. Yıkama işleminin sonlanmasının ardından membran bloklama solüsyonu içinde sekonder antikor olan anti rabbit horseradish peroksidaz konjugatı (dilüsyon oranı 1/3000) ile 1 saat oda



sıcaklığında inkübe edildi. Sonra tekrar 3 defa membran TBST ile yıkandı. Daha sonra belirtilen proteinler görüntü tarama yöntemleri ile tarandı ve kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -aktin'e göre değerlendirildi.



Şekil 5.8.5.1. SDS-PAGE elektroforez cihazı ve Trans-Blot sistemi

Tablo 5.8.5.1. Western blot için kullanılan primer ve sekonder antikorların özellikleri

Kullanılan Primer Antikor	Marka	kDa
E-kaderin	BT Lab	135 kDa
N-kaderin	Elabscience	140 kDa
HIF-1 $\alpha$	BT Lab	93 kDa
Snail	BT Lab	29 kDa
Slug	Elabscience	27 kDa
Twist	BT Lab	27 kDa
$\beta$ -aktin	BT Lab	42 kDa

**Tablo 5.8.5.2.** Primer ve sekonder antikor için kullanılan dilüsyon oranları

<b>Kullanılan Primer Antikor</b>	<b>Dilüsyon oranları</b>
E-kaderin	1:1000
N-kaderin	1:1000
HIF-1 $\alpha$	1:1000
Snail	1:1000
Slug	1:1000
Twist	1:1000
$\beta$ -aktin	1:3000

### **5.8.6. qPCR Analizi**

#### **5.8.6.1. Total RNA izolasyonu**

Çalışmamızda total RNA izolasyonu için GeneALL marka Hybrid-R RNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

- 1- 100 mg PK dokusu 1 ml RiboEx solüsyonu içinde homojenize edildi.
- 2- Homojenize edilmiş örnekler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 3- Tümör örnekleri yüksek oranda protein, yağ ve kas içerdiğinden örnekler 12.000 rpm 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve oluşan süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.
- 4- 200  $\mu$ L kloroform tüp üzerine eklendi. 15 saniye vorteks yapıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 5- Tüpler 12.000 rpm 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve oluşan sulu faz temiz bir tüpe aktarıldı.
- 6- Üzerine 1 hacim RBI solüsyonu eklendi ve karıştırıldı.
- 7- 700  $\mu$ L solüsyon filtreli tüplere aktarıldı.
- 8- Tüpler 10.000 rpm 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 9- 7. ve 8. adımlar tekrar geri kalan solüsyon için yapıldı.
- 10- 500  $\mu$ L SWI solüsyonu filtreli tüpe eklendi.

- 11- Tüpler 10.000 rpm 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 12- 500 µL RNW solüsyonu filtrelili tüpe eklendi.
- 13- Tüpler 10.000 rpm 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 14- 50 – 100 µL Nükleazdan arınmış su filtrelili tüpün merkezine eklendi ve 1 dakika beklendi.
- 15- Tüpler 10.000 rpm 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 16- Çalışma yapılanaya kadar RNA örnekleri -80°C’de saklandı.

#### 5.8.6.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi A.B.T cDNA sentez kiti kullanıldı.

1 örnek için mikro tüp içine aşağıda belirtilen hacimlerde kit bileşenlerinden ilave edildi (**Tablo 5.8.6.2.1**)

**Tablo 5.8.6.2.1.** Mikro tüp içine eklenen kit bileşen hacimleri

20 µl Reverse Transkripsiyon Reaksiyonu	Hacim
10X reaksiyon solüsyonu	2 µl
dNTP karşımı (2.5 mM)	1 µl
Random Hekzamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transkriptaz (200 U/ µl)	1 µl
RNase İnhibitörü	0,5 µl
RNasedan arınmış su	3.5 µl
RNA Şablonu	10 µl

**Tablo 5.8.6.2.2.** cDNA reaksiyon şartları

Adımlar	Sıcaklık (°C)	Zaman (Dakika)	Siklüs
Adım 1	25	10	1
Adım 2	37	120	1
Adım 3	85	5	1
Adım 4	4	-	1

PCR cihazında RNA örneklerinde yukarıda olan protokol uygulanarak cDNA sentezi yapıldı.

### 5.8.6.3. RT-qPCR

qPCR için A.B.T 2X qPCR master karışımı kullanıldı ve cihaz olarak ABI 700 cihazı kullanıldı.

1 örnek için mikro tüp içine aşağıda belirtilen hacimlerde kit bileşenlerinden ilave edildi (**Tablo 5.8.6.3.1**).

**Tablo 5.8.6.3.1.** Master karışımının hazırlanması

20 µl master karışımı	Hacim (µl)	Son Konsantrasyonu
A.B.T 2X qPCR master karışımı (UDG ile)	10	1X
Rox boyası (50X)	0.4	1X
Primer (10 µM)	1	1 µM
Floresan Probe	1	1 µM
Şablon	1	-
RNasedan arınmış su	6.6	-

Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi qPCR mikroplakaları hazırlandı ve cihaz aşağıdaki döngüler uygulanarak örnekler okunmaya başlandı (**Tablo 5.8.6.3.2**).

**Tablo 5.8.6.3.2.** qPCR döngüsü

Adımlar	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)	Siklüs
UDG uygulaması	50	120	1
Denatürasyon	95	600	1
Denatüre	95	30	40
Anneal	60	60	

Cihazdan alınan veriler ile  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodu kullanılarak E-kaderin, N-kaderin, HIF-1 $\alpha$ , Snail, Slug, Twist mRNA seviyeleri hesaplandı.

## 6. BULGULAR

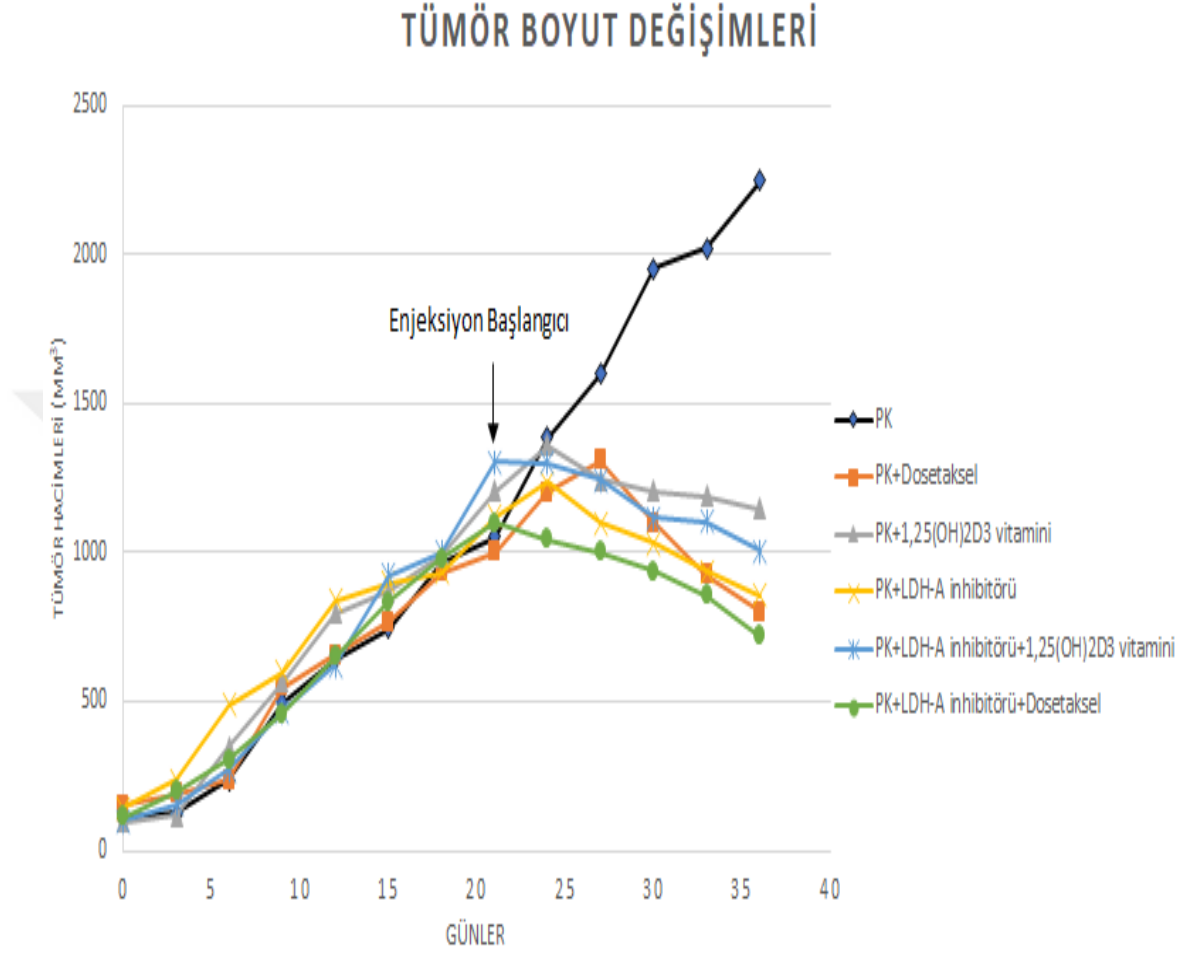
Çalışmamız 70 adet C57BL/6 türü fare kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada fare serumlarından CK18-M30, laktat, TAK, TOS ve OSİ ölçümleri yapıldı. Tümör dokularından EMT'yi değerlendirmek için western blot ve qPCR yöntemleri kullanıldı. Tümör dokularında TUNEL yöntemi ile apoptoz değerlendirildi. Karaciğer ve böbrek dokularında ise histopatolojik durumlar HE ve PAS boyamaları ile değerlendirildi.

70 hayvan ile başlayan çalışma deney sırasında 25 hayvanın ölmesi ile toplam 45 hayvanla ile sonlandırıldı (**Tablo 6.1**). Çalışmaya başlamadan önce yapılan güç analizinde her grupta 6 hayvan olması istatistiksel olarak %84 güç ile anlamlılık vereceği için yeterli olarak görüldü.

**Tablo 6.1.** Çalışmayı tamamlayan hayvan sayıları

Grup Numarası	Grup Adı	Ölen hayvan sayısı	Çalışmayı tamamlayan hayvan sayısı
Grup 1	Kontrol Grubu	0	10
Grup 2	PK Kontrol Grubu	5	5
Grup 3	PK- Doksetsel	4	6
Grup 4	PK – 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> vitamini	4	6
Grup 5	PK- LDH inhibitörü (Sodyum Okzamat)	4	6
Grup 6	PK- LDH inhibitörü + 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> vitamini	4	6
Grup 7	PK- LDH inhibitörü + Doksetsel	4	6

## 6.1. Tümör Boyutu Değişimleri



**Şekil 6.1.1.** Tümör boyutlarının değişimi

Farelere enjekte edilen TRAMP-C2 PK hücre hatları 21.günde istenilen boyutlara ulaştığı görüldü. 21. günden itibaren farelere enjeksiyonlara başlandı. Enjeksiyonlar 15 gün sürdü ve 36. günde hayvanların sakrifikasyon işlemleri gerçekleştirildi. PK grubunda tümör boyutlarının sürekli artmaya devam ettiği gözlenirken, diğer gruplarda ise tümör boyutlarında azalma gözlemlendi (**Şekil 6.1.1**) (**Tablo 6.1.1**).

**Tablo 6.1.1.** Tümör boyut değişimleri

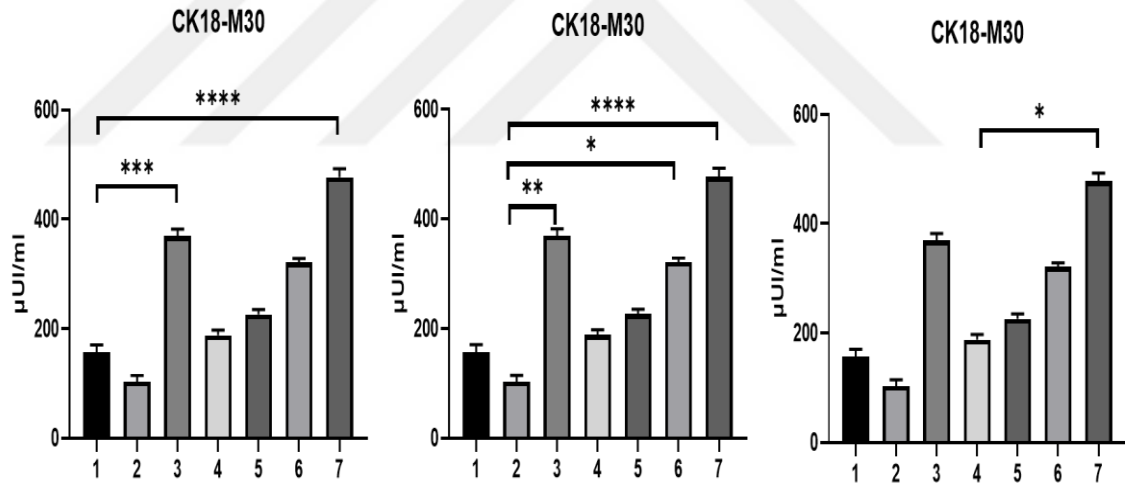
<b>Grup Numarası</b>	<b>Grup Adı</b>	<b>Tedavi başlangıcı tümör boyutu (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Tedavi sonunda tümör boyutu (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Değişim (mm<sup>3</sup>)</b>
Grup 2	PK Kontrol Grubu	1050	2245	+1195
Grup 3	PK- Doksetaksel	1002	800	-202
Grup 4	PK – 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> vitamini	1205	1145	-60
Grup 5	PK- LDH inhibitörü (Sodyum Okzamat)	1119	857	-262
Grup 6	PK- LDH inhibitörü + 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> vitamini	1302	1004	-298
Grup 7	PK- LDH inhibitörü + Doksetaksel	1100	721	-379



## 6.2. CK18-M30 ELİSA Testi ve TUNEL Yöntemi ile Apoptozun Değerlendirilmesi

**Tablo 6.2.1.** CK18-M30 ELİZA testi sonuçları

	Kontrol (1)	PK (2)	PK- Dosetaksel (3)	PK- 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (4)	PK-LDH-A İnhibitörü (5)	PK-LDH-A İnhibitörü+ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (6)	PK-LDH-A İnhibitörü + Dosetaksel (7)	P*	Gruplar Arası Anlamlılık
CK18- M30 ( $\mu$ U/ml)	157,10 $\pm$ 13,58	103,25 $\pm$ 11,35	369,67 $\pm$ 12,72	188 $\pm$ 9,19	226,17 $\pm$ 9,11	321,17 $\pm$ 7,76	477 $\pm$ 15,63	p<0,05	1-3, 1-7, 2-3, 2-6, 2-7, 4-7

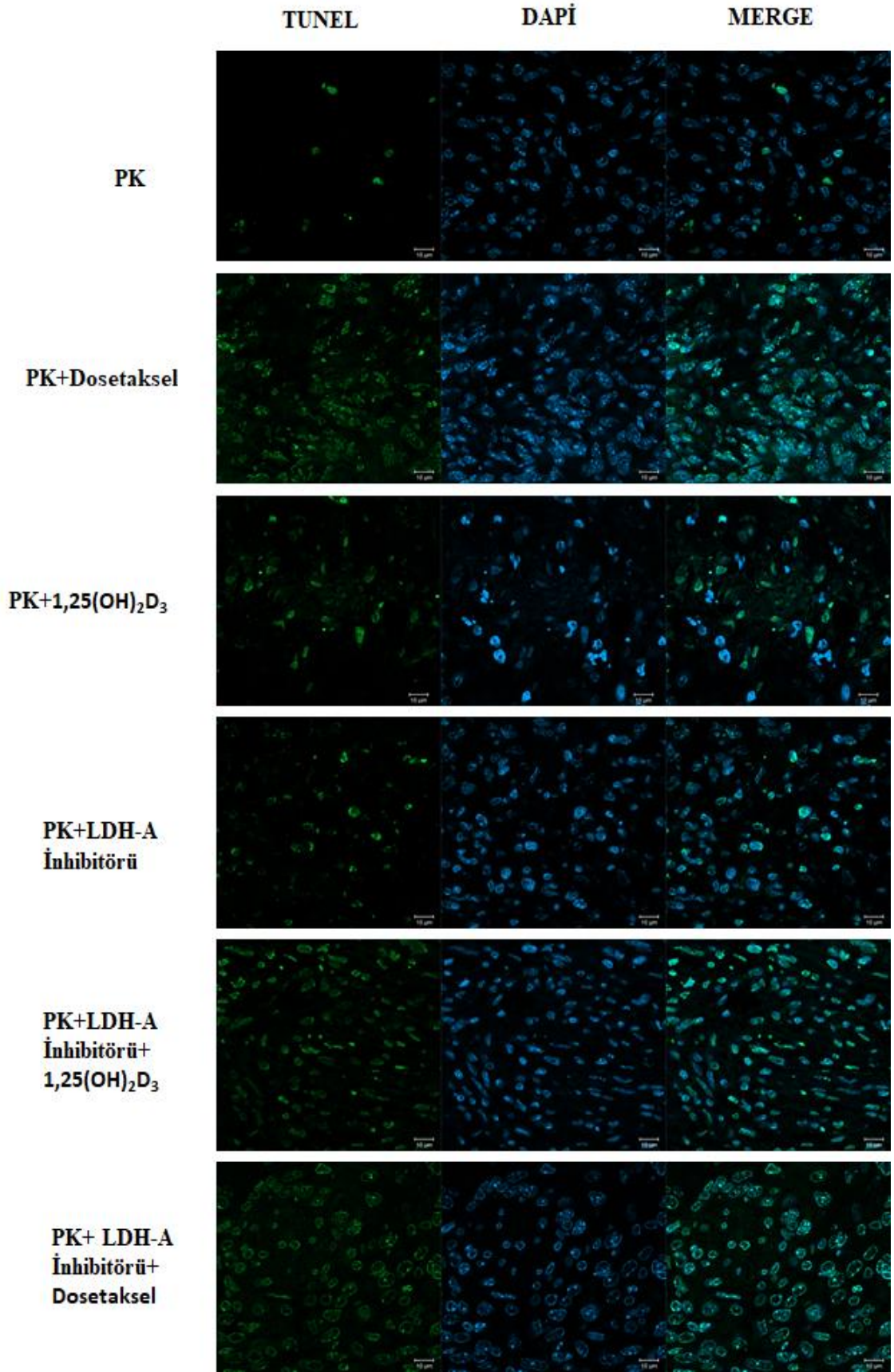


**Şekil 6.2.1.** CK18-M30 değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi. **1:** Kontrol; **2:** PK; **3:** PK – Dosetaksel; **4:** PK - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **5:** PK – LDH-A inhibiötörü; **6:** PK – LDH-A inhibiötörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **7:** PK - LDH-A inhibiötörü + Dosetaksel.

Kontrol grubunun CK18-M30 değerleri (157,10  $\pm$  13,58  $\mu$ U/ml) Dosetaksel (369,67  $\pm$  12,72  $\mu$ U/ml) ve LDH-A inhibiötörü + Dosetaksel (477  $\pm$  15,63  $\mu$ U/ml) uygulanan grubun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). PK grubunun CK-18/M30 değerleri (103,25  $\pm$  11,35  $\mu$ U/ml), Dosetaksel (369,67  $\pm$  12,72  $\mu$ U/ml), LDH-A inhibiötörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (321,17  $\pm$  7,76  $\mu$ U/ml)

ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $477 \pm 15,63 \mu\text{U/ml}$ ) grubunun CK18-M30 değerleri karşılaştırıldığında tedavi gruplarında değerlerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı bulundu ( $p < 0,05$ ).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini uygulanan grubun CK18-M30 değerleri ( $188 \pm 9,19 \mu\text{U/ml}$ ) PK grubuna göre anlamlılık göstermedi ( $p > 0,05$ ). En yüksek apoptoz değerleri LDH-A inhibitörü + Dosetaksel uygulanan grupta görüldü. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı ( $p > 0,05$ ) (**Şekil 6.2.1**) (**Tablo 6.2.1**).

Apoptozu değerlendirmek için serum CK18-M30'a ilave olarak tümör dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptoz değerlendirildi. TUNEL görüntülerinden görüldüğü üzere CK18-M30 değerleri ile TUNEL görüntülerinin gösterdiği apoptozu uğrama durumları paralel olarak bulundu (**Şekil 6.2.2**). Aşağıdaki şekilde 1. sütun TUNEL boyası ile boyanan hücreleri, 2. sütun çekirdek boyası olan DAPI ile boyanmış hücre çekirdeklerini, 3. sütun ise DAPI çekirdek boyası ve TUNEL boyasının üst üste getirilip hangi hücrelerin apoptozu gittiğini göstermektedir. TUNEL boyama sonuçlarına göre en az apoptozu uğrama oranı PK grubunda iken diğer gruplarda arttığı görülmüştür. Sırası ile  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , LDH-A inhibitörü, LDH-A inhibitörü +  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi gruplarında apoptozu uğrama oranı giderek artmaktadır. TUNEL sonuçlarına göre en fazla apoptozu uğrama oranı Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel gruplarında görülmüştür (**Şekil 6.2.2**).

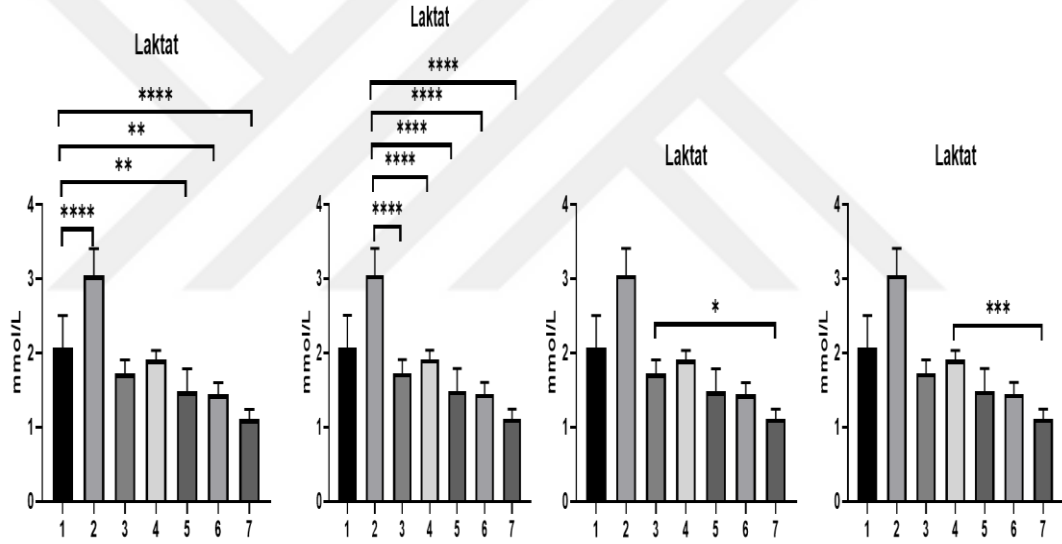


Şekil 6.2.2. Prostat kanser dokusunda TUNEL görüntüleri

### 6.3. Laktat ELİZA Analizinin Sonuçları

**Tablo 6.3.1.** Laktat ELİZA testi sonuçları

	Kontrol (1)	PK (2)	PK-Dosetaksel (3)	PK-1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (4)	PK-LDH-A İnhibitörü (5)	PK-LDH-A İnhibitörü+1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (6)	PK-LDH-A İnhibitörü + Dosetaksel (7)	P*	Gruplar Arası Anlamlılık
Laktat (mmol/L)	2,07±0,43	3,05±0,36	1,73±0,18	1,91±0,13	1,49±0,31	1,45±0,16	1,11±0,13	p<0,05	1-2, 1-5, 1-6, 1-7, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 3-7, 4-7



**Şekil 6.3.1.** Laktat değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi. **1:** Kontrol; **2:** PK; **3:** PK – Dosetaksel; **4:** PK - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **5:** PK – LDH-A inhibitörü; **6:** PK – LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **7:** PK - LDH-A inhibitörü + Dosetaksel.

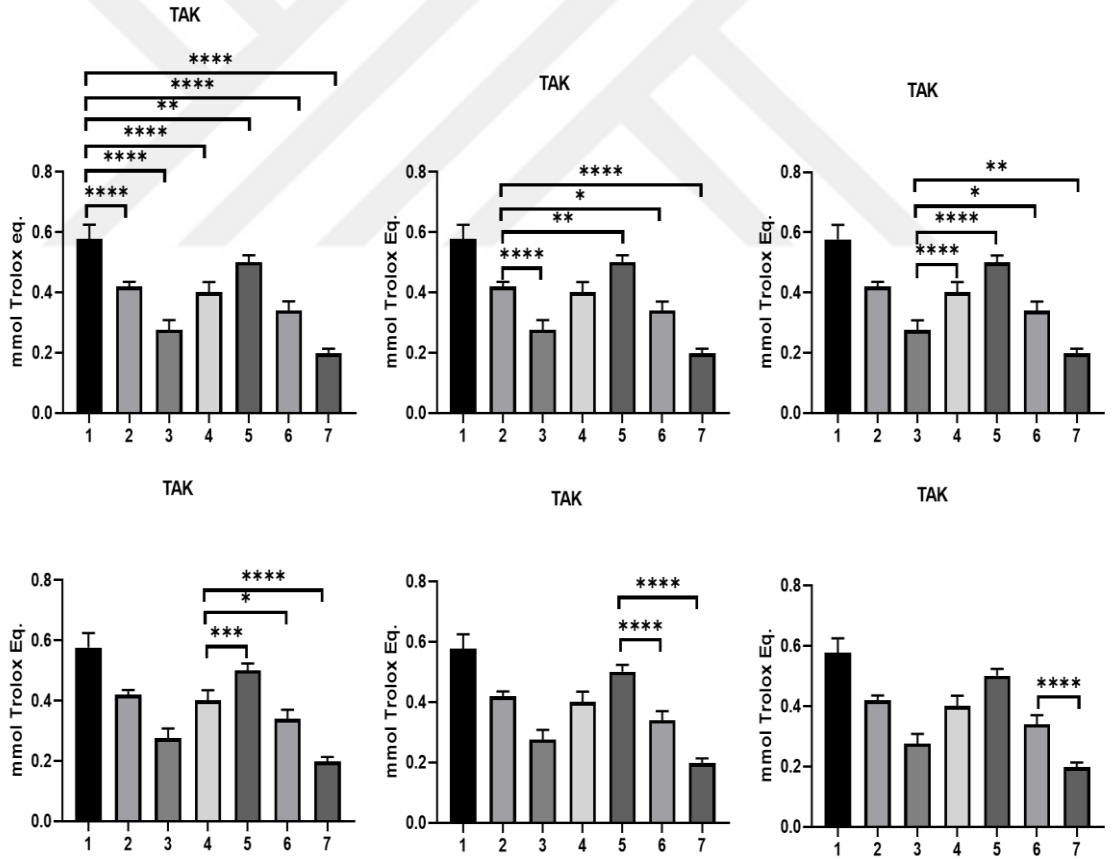
Kontrol grubunun laktat değerleri ( $2,07 \pm 0,43$  mmol/L) PK grubuna ( $3,05 \pm 0,36$  mmol/L) göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ). LDH-A inhibitörü ( $1,49 \pm 0,39$ ), LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  ( $1,45 \pm 0,16$  mmol/L) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksel tedavi grubunun ( $1,11 \pm 0,13$  mmol/L) değerlerine göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). PK grubunun laktat değerleri ( $3,05 \pm 0,36$  mmol/L) ise Dosetaksel ( $1,73 \pm 0,18$  mmol/L),  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini ( $1,91 \pm$

0,13 mmol/L), LDH-A inhibitörü ( $1,49 \pm 0,31$  mmol/L), LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $1,45 \pm 0,16$  mmol/L) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ( $1,11 \pm 0,13$  mmol/L) gruplarının laktat seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (**p<0,05**). PK grubuna göre tüm tedavi gruplarında laktat düzeyleri istatistiksel olarak düşük olmakla beraber en düşük değer LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunda gözlemlendi. Dosetaksel uygulanan grubun laktat seviyeleri ( $1,73 \pm 0,18$  mmol/L) LDH-A inhibitörü + Dosetaksel uygulanan grubun laktat seviyelerine ( $1,11 \pm 0,13$  mmol/L) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (**p<0,05**). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> grubunun laktat seviyeleri ( $1,91 \pm 0,13$  mmol/L) yine LDH-A inhibitörü + Dosetaksel uygulanan grubun laktat seviyelerine ( $1,11 \pm 0,13$  mmol/L) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (**p<0,05**). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı (**p>0,05**) (Şekil 6.3.1) (Tablo 6.3.1).

## 6.4 TAK Analizinin Sonuçları

**Tablo 6.4.1.** TAK sonuçları

	Kontrol (1)	PK (2)	PK- Dosetaksel (3)	PK- 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (4)	PK-LDH-A İnhibitörü (5)	PK-LDH-A İnhibitörü+ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (6)	PK-LDH-A İnhibitörü + Dosetaksel (7)	<i>P</i> *	Gruplar Arası Anlamlılık
TAK (mmol Trolox eq.)	0,58±0,05	0,42±0,02	0,28±0,03	0,40±0,03	0,50±0,02	0,34±0,03	0,20±0,02	<i>p</i> <0,05	1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-3, 2-5, 2-6, 2-7, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 4-5, 4-6, 4-7, 5-6, 5-7, 6-7



**Şekil 6.4.1.** TAK değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi. **1:** Kontrol; **2:** PK; **3:** PK – Dosetaksel; **4:** PK - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **5:** PK – LDH-A inhibiötörü; **6:** PK – LDH-A inhibiötörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **7:** PK - LDH-A inhibiötörü + Dosetaksel.

Kontrol grubunun TAK değerleri ( $0,58 \pm 0,05$  mmol Trolox Eq.), PK ( $0,42 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) ve tedavi grupları Dosetaksiel ( $0,28 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.),  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini ( $0,40 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.), LDH-A inhibitörü ( $0,50 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.), LDH-A inhibitörü+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $0,34 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksiel ( $0,20 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) gruplarının TAK değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( **$p < 0,05$** ). PK grubunun TAK değerleri ( $0,42 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.), Dosetaksiel ( $0,28 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.), LDH-A inhibitörü+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $0,34 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksiel ( $0,20 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) gruplarının TAK değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunurken, LDH-A inhibitörü grubunun TAK değerlerinden ( $0,50 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( **$p < 0,05$** ). Dosetaksiel grubunun TAK değerleri ( $0,28 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.),  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini ( $0,40 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.), LDH-A inhibitörü ( $0,50 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) ve LDH-A inhibitörü+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $0,34 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.) gruplarının TAK değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunurken, LDH-A inhibitörü+Dosetaksiel grubunun TAK değerlerinde ( $0,20 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( **$p < 0,05$** ).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamininin TAK değerleri ( $0,40 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.) LDH-A inhibitörünün ( $0,50 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) TAK değerlerinden anlamlı şekilde yüksek bulunurken, LDH-A inhibitörü+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $0,34 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksiel ( $0,20 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) gruplarının TAK değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( **$p < 0,05$** ). LDH-A inhibitörünün TAK değerleri ( $0,50 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.), LDH-A inhibitörü+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $0,34 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksiel ( $0,20 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) gruplarının TAK değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( **$p < 0,05$** ). LDH-A inhibitörü+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini grubunun TAK değerleri ( $0,34 \pm 0,03$  mmol Trolox Eq.), LDH-A inhibitörü+Dosetaksiel grubunun TAK değerlerinden ( $0,20 \pm 0,02$  mmol Trolox Eq.) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( **$p < 0,05$** ). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı ( **$p > 0,05$** ) (**Şekil 6.4.1**) (**Tablo 6.4.1**). LDH-A inhibitörü tek başına uygulandığında antioksidan,

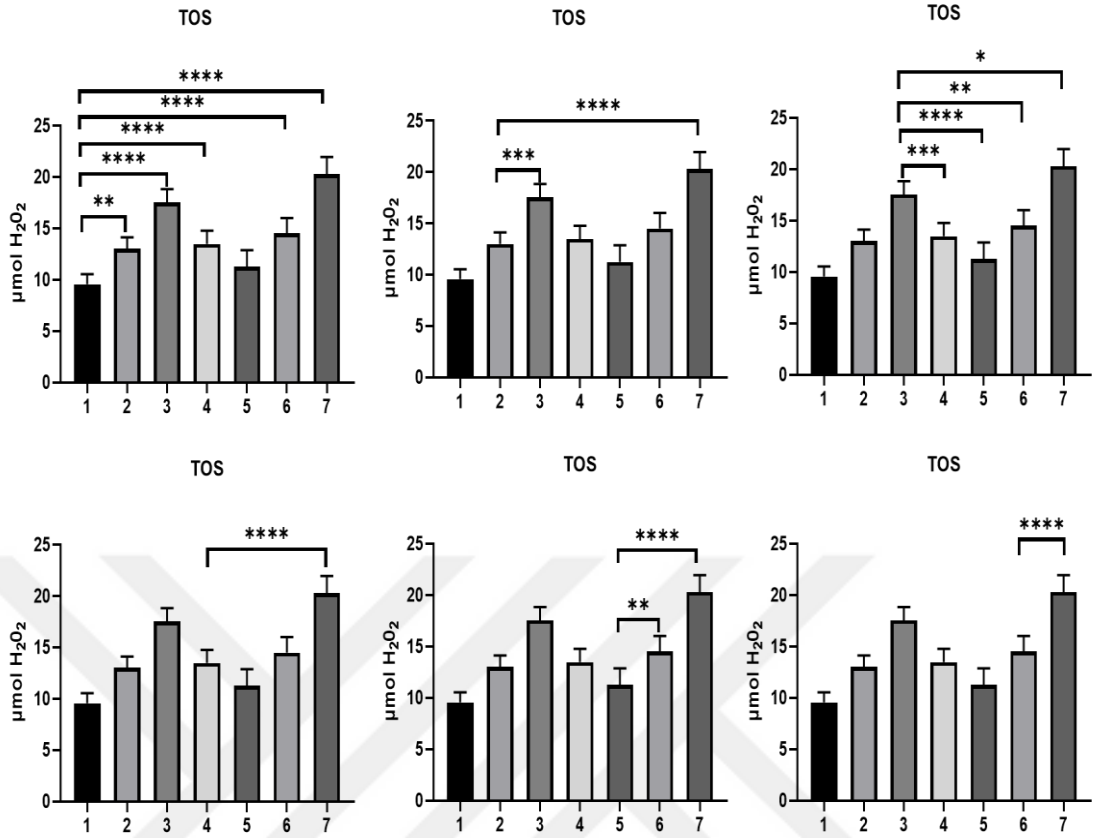
dosetaksel tek başına uygulandığında oksidan özellik göstermektedir. LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunda oksidan özelliğin Dosetaksel grubuna göre arttığı görüldü. Sonuç olarak, antioksidan olan LDH-A inhibitörü Dosetaksel'in oksidan özelliğini arttırdı.

## 6.5. TOS Analizinin Sonuçları

**Tablo 6.5.1.** TOS sonuçları

	Kontrol (1)	PK (2)	PK- Dosetaksel (3)	PK- 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (4)	PK-LDH-A İnhibitörü (5)	PK-LDH-A İnhibitörü+ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (6)	PK-LDH-A İnhibitörü + Dosetaksel (7)	<i>p</i> *	Gruplar Arası Anlamlılık
TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ )	9,57 $\pm$ 0,97	13,02 $\pm$ 1,12	17,56 $\pm$ 1,29	13,49 $\pm$ 1,29	11,26 $\pm$ 1,62	14,52 $\pm$ 1,51	20,29 $\pm$ 1,68	<i>p</i> <0,05	1-2, 1-3, 1-4, 1-6, 1-7, 2-3, 2-4, 2-7, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 4-7, 5-6, 5-7, 6-7





**Şekil 6.5.1.** TOS değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi. **1:** Kontrol; **2:** PK; **3:** PK – Dosetaksel; **4:** PK - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **5:** PK – LDH-A inhibötörü; **6:** PK – LDH-A inhibötörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **7:** PK - LDH-A inhibötörü + Dosetaksel.

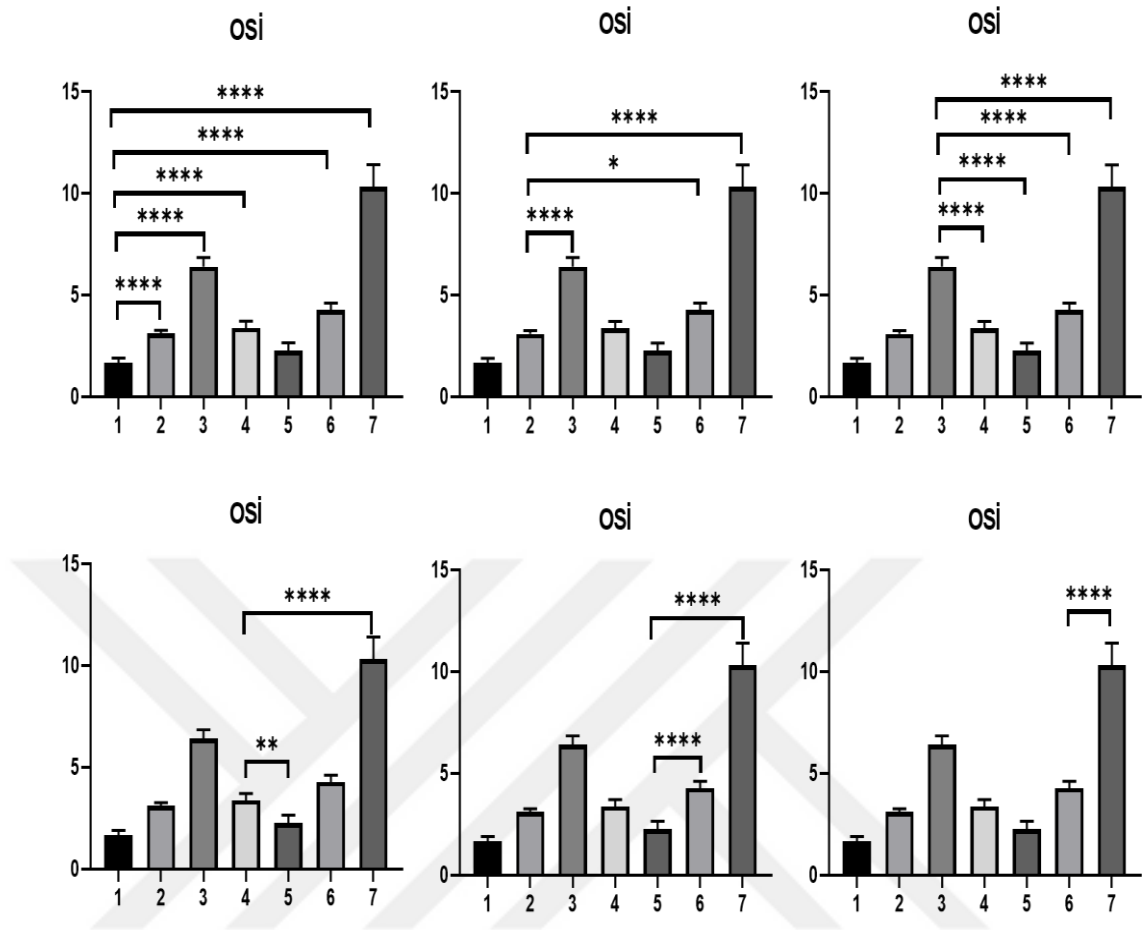
Kontrol grubunun TOS değerleri ( $9,57 \pm 0,9 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), PK ( $13,02 \pm 1,12 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), Dosetaksel ( $17,56 \pm 1,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ( $13,49 \pm 1,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), LDH-A inhibötörü ( $11,26 \pm 1,62 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), LDH-A inhibötörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $14,52 \pm 1,51 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) ve LDH-A inhibötörü+Dosetaksel ( $20,29 \pm 1,68 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) tedavi gruplarının TOS değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). PK grubunun TOS değerleri ( $13,02 \pm 1,12 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), Dosetaksel ( $17,56 \pm 1,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) ve LDH-A inhibötörü+Dosetaksel ( $20,29 \pm 1,68 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) tedavi grubunun TOS değerlerinden anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). Dosetaksel tedavisi uygulana grubun TOS değerleri ( $17,56 \pm 1,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ( $13,49 \pm 1,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), LDH-A inhibötörü ( $11,26 \pm 1,62 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) ve LDH-A inhibötörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $14,52 \pm 1,51 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) tedavi gruplarının TOS

değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunurken LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ( $20,29 \pm 1,68 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) tedavi grubunun TOS değerlerinden anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini tedavisi uygulanan grubun TOS değerleri ( $13,49 \pm 1,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ( $20,29 \pm 1,68 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) tedavi grubunun TOS değerlerinden anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). LDH-A inhibitörü tedavisi uygulanan grubun TOS değerleri ( $11,26 \pm 1,62 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $14,52 \pm 1,51 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ( $20,29 \pm 1,68 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) tedavi grubunun TOS değerlerine göre anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tedavi grubunun TOS değerleri ( $14,52 \pm 1,51 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ), LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ( $20,29 \pm 1,68 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ) tedavi grubunun TOS değerlerine göre anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**) (Şekil 6.5.1) (Tablo 6.5.1). Sonuç olarak, LDH-A inhibitörü PK kontrol grubuna göre anlamlı oksidan özellik göstermemesine rağmen Dosetaksel'in oksidan özelliğini arttırdı görüldü. Sadece Dosetaksel grubu ile kıyaslandığında LDH-A+ Dosetaksel grubunda anlamlı yüksek TOS değerleri gözlemlendi.

## 6.6. OSİ Analizinin Sonuçları

**Tablo 6.6.1.** OSİ sonuçları

	Kontrol (1)	PK (2)	PK- Dosetaksel (3)	PK- 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (4)	PK-LDH-A İnhibitörü (5)	PK-LDH-A İnhibitörü+ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (6)	PK-LDH-A İnhibitörü + Dosetaksel (7)	P*	Gruplar Arası Anlamlılık
OSİ	1,67±0,22	3,10±0,16	6,39±0,46	3,37±0,33	2,26±0,39	4,27±0,33	10,32±1,08	p<0,05	1-2, 1-3, 1-4, 1,6, 1-7, 2-3, 2-6, 2-7, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 4-5, 4-7, 5-6, 5-7, 6,7



**Şekil 6.6.1.** OSİ değerlerinin tedavi gruplarına göre değişimi. **1:** Kontrol; **2:** PK; **3:** PK – Dosetaksel; **4:** PK - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **5:** PK – LDH-A inhibitörü; **6:** PK – LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **7:** PK - LDH-A inhibitörü + Dosetaksel.

Kontrol grubunun OSİ değerleri ( $1,67 \pm 0,22$ ), PK ( $3,10 \pm 0,16$ ), Dosetaksel ( $6,39 \pm 0,46$ ), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ( $3,37 \pm 0,33$ ), LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ( $4,27 \pm 0,33$ ) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $10,32 \pm 1,08$ ) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). PK grubunun OSİ değerleri ( $3,10 \pm 0,16$ ), Dosetaksel ( $6,39 \pm 0,46$ ), LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ( $4,27 \pm 0,33$ ) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $10,32 \pm 1,08$ ) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). Dosetaksel tedavi grubunun OSİ değerleri ( $6,39 \pm 0,46$ ), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ( $3,37 \pm 0,33$ ), LDH-A inhibitörü ( $2,26 \pm 0,39$ ) ve LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ( $4,27 \pm 0,33$ ) tedavi gruplarının OSİ değerlerine göre yüksek bulunurken, LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $10,32 \pm 1,08$ )

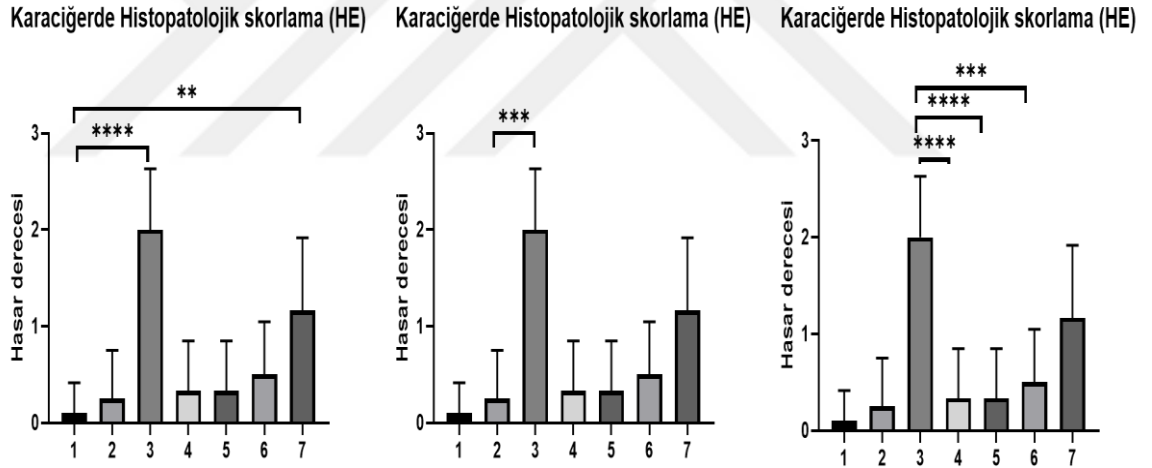
tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini grubunun OSİ değerleri (3,37 ± 0,33), LDH-A inhibitörü (2,26 ± 0,39) grubunun OSİ değerlerinden anlamlı şekilde yüksek bulunurken, LDH-A inhibitörü + Dosetaksel (10,32 ± 1,08) grubunun OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). LDH-A inhibitörü grubunun OSİ değerleri (2,26 ± 0,39), LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (4,27 ± 0,33) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel (10,32 ± 1,08) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini grubunun OSİ değerleri (4,27 ± 0,33), LDH-A inhibitörü + Dosetaksel (10,32 ± 1,08) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı (**p>0,05**) (**Şekil 6.6.1**) (**Tablo 6.6.1**). Sonuç olarak, Dosetaksel grubunda oksidatif stresin PK grubuna göre istatistiksel olarak artmış olduğu, ancak LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubundaki artışın çok daha fazla olduğu gözlemlendi. Dosetaksel grubuna göre LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunda güçlü istatistiksel artış gözlemlendi. LDH-A inhibitörü'nün Dosetaksel'in oksidatif özelliğini potansiyelize ettiği görüldü.

## 6.7. Karaciğerde HE İle Histopatolojik Olarak Doku Hasarının Skorlanması

HE boyaması ile gösterilen karaciğer dokusunda oluşan hasarın skorlanması aşağıda verilen **Tablo 6.7.1** ve **Şekil 6.7.1**'de gösterilmiştir.

**Tablo 6.7.1.** Karaciğer histopatolojik doku hasarı skorlaması

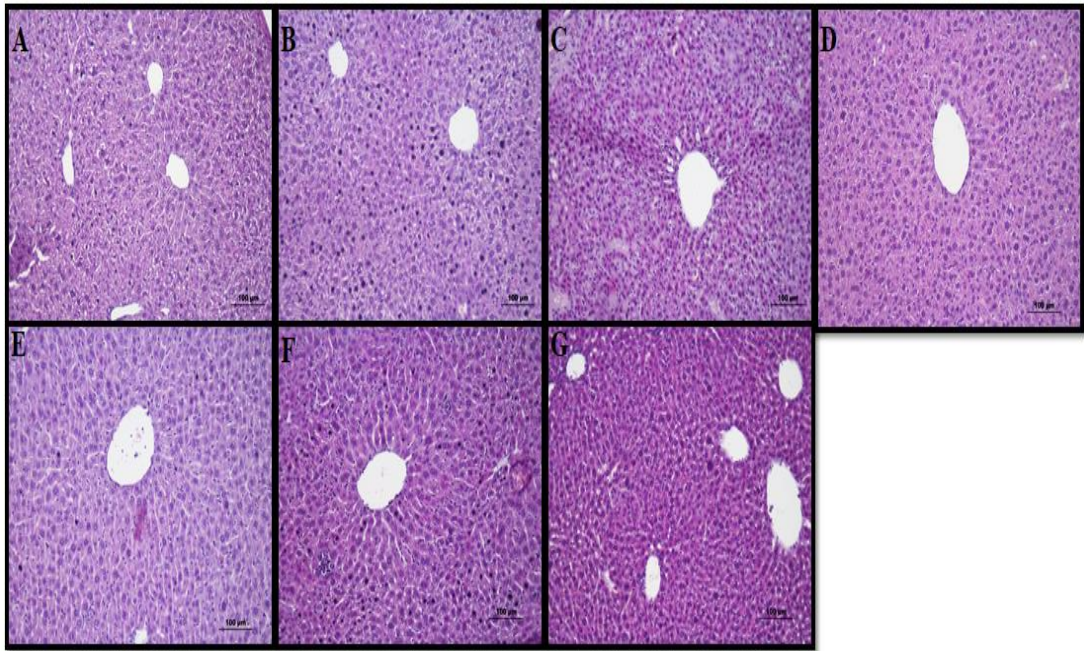
	Kontrol (1)	PK (2)	PK- Dosetaksel (3)	PK- 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (4)	PK-LDH-A İnhibitörü (5)	PK-LDH-A İnhibitörü+ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (6)	PK-LDH-A İnhibitörü + Dosetaksel (7)	P*	Gruplar Arası Anlamlılık
Karaciğerde Histopatolojik Skorlama	0,1±0,32	0,25±0,50	2±0,63	0,33±0,52	0,33±0,52	0,5±0,55	1,17±0,75	p<0,05	1-3, 1-7, 2-3, 3-4, 3-5, 3-6



**Şekil 6.7.1.** Karaciğerde yapılan histopatolojik skorlama yüzdesinin tedavi gruplarına göre değişimi. **1:** Kontrol; **2:** PK; **3:** PK – Dosetaksel; **4:** PK - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **5:** PK – LDH-A inhibiötörü; **6:** PK – LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **7:** PK - LDH-A inhibitörü + Dosetaksel.

Yapılan HE boyaması ile karaciğerde histopatolojik skorlamasında Dosetaksel ( $2 \pm 0,63$ ) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $1,17 \pm 0,75$ ) tedavi grubunda, kontrol grubunda oluşan karaciğer hasarına ( $0,1 \pm 0,32$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla hasar bulundu ( $p<0,05$ ). PK grubunda oluşan karaciğer hasarı ( $0,25 \pm 0,50$ ) Dosetaksel ( $2 \pm 0,63$ ) tedavi grubunda oluşan hasardan

istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Dosetaksel tedavi grubunda ( $2 \pm 0,63$ ) oluşan karaciğer hasarı  $1,25(OH)_2D_3$  ( $0,33 \pm 0,52$ ), LDH-A inhibitörü ( $0,33 \pm 0,52$ ) ve LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini ( $0,5 \pm 0,55$ ) tedavi grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Diğer gruplar arasında rakamsal farklılıklar olsada istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.7.1) (Tablo 6.7.1). Sonuç olarak, Dosetaksel grubunda PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı karaciğer hasarı gözlenmesine rağmen LDH-A inhibitörünün eklendiği durumda karaciğer hasarının azaldığı ve istatistiksel olarak yüksek olmadığı görüldü.



Şekil 6.7.2. Karaciğer HE boyama. A: Kontrol; B: PK; C: PK – Dosetaksel; D: PK -  $1,25(OH)_2D_3$ ; E: PK – LDH-A inhibitörü; F: PK – LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$ ; G: PK - LDH-A inhibitörü + Dosetaksel.

Kontrol, PK grubu,  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini, LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü+ $1,25(OH)_2D_3$  vitamini uygulanan tedavi gruplarına ait karaciğer kesitlerinde anormal bulgulara rastlanmadı. Bu grupta doğal görünümde karaciğer parankimi gözlendi, hepatositler santral ven etrafında ışınal hücre kordonları tarzında izlendi ve sinüzoidler normal yapıda idi (Şekil 6.7.2 A,B,D,E,F). Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavisi uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde, karaciğer parankiminde hafif bir dejenerasyon gözlendi, hepatosit

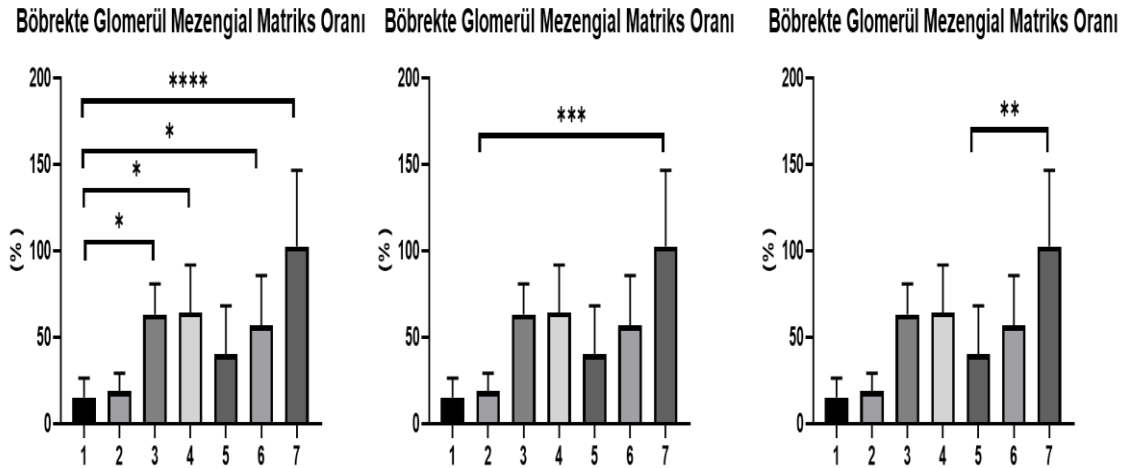
kordonlarının düzensizleştiği ve mononükleer hücre infiltrasyonunda hafif bir artış izlendi, sinüzoidlerde dilatasyon ve santral venin doğal yapısını kaybettiği gözlemlendi (Şekil 6.7.2 C,G).

### 6.8. Böbrekte PAS Boyaması ile Glomerül Mezengial Matriks Oranı

PAS boyaması ile gösterilen böbrek dokusunda glomerül mezengial matriks oranı aşağıda verilen **Tablo 6.8.1** ve **Şekil 6.8.1**'de gösterilmiştir.

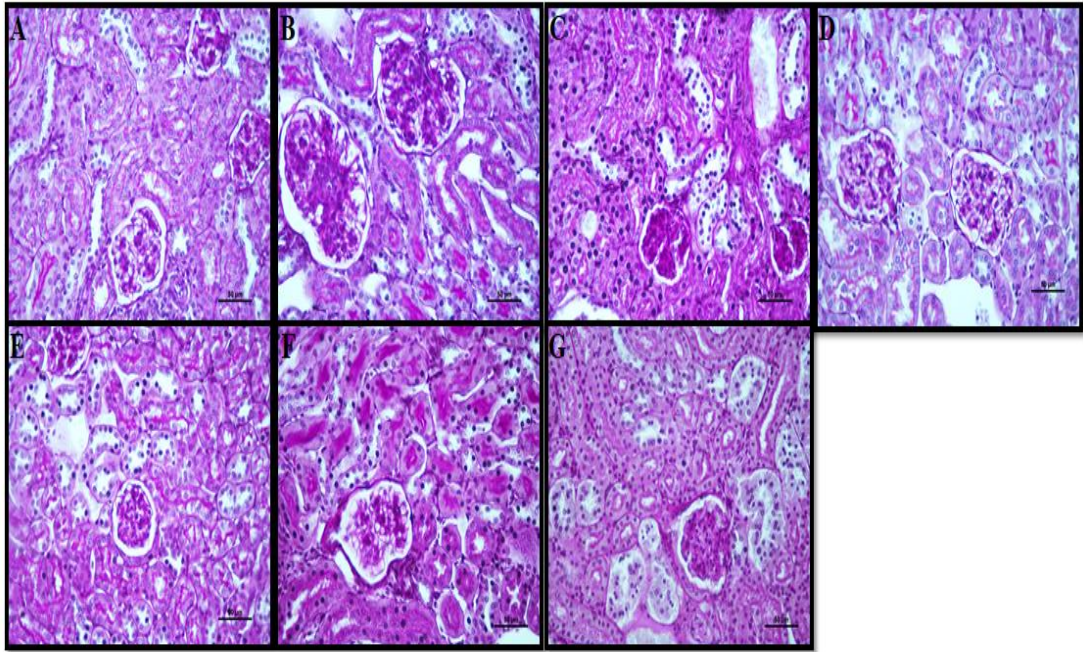
**Tablo 6.8.1.** Böbrek glomerül mezengial matriks oranı

	Kontrol (1)	PK (2)	PK- Doksetaksel (3)	PK- 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (4)	PK-LDH-A İnhibitörü (5)	PK-LDH-A İnhibitörü+ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (6)	PK-LDH-A İnhibitörü+ Doksetaksel (7)	P*	Gruplar Arası Anlamlılık
Böbrekte glomural mezengial matriks oranı (%)	15±11,30	18,75±10,31	63±17,78	64,17±27,64	40±28,11	56,67±28,93	102,5±44,13	<i>p</i> <0,05	1-3, 1-4, 1-6, 1-7, 2-7, 5-7



**Şekil 6.8.1.** Böbrekte glomural mezengial matriks oranı yüzdesinin tedavi gruplarına göre değişimi. **1:** Kontrol; **2:** PK; **3:** PK – Doksetaksel; **4:** PK - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **5:** PK – LDH-A inhibiötörü; **6:** PK – LDH-A inhibiötörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; **7:** PK - LDH-A inhibiötörü + Doksetaksel.

Yapılan PAS boyamasında, böbrekte glomural mezengial matriks oranı Dosetaksel ( $63 \pm 17,78$ ),  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini ( $64,17 \pm 27,64$ ), LDH-A inhibitörü +  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini ( $56,67 \pm 28,93$ ) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ( $102,5 \pm 44,13$ ) tedavi gruplarında kontrol grubuna ( $15 \pm 11,30$ ) istatistiksel anlamda yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Ayrıca LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ( $102,5 \pm 44,13$ ) grubunun böbrek hasarı PK grubuna ( $18,75 \pm 10,31$ ) ve LDH-A inhibitörü grubuna ( $40 \pm 28,11$ ) göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Diğer gruplar arasında rakamsal farklılıklar olsada istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.8.1) (Tablo 6.8.1).



**Şekil 6.8.2.** Böbrekte PAS boyaması. **A:** Kontrol; **B:** PK; **C:** PK – Dosetaksel; **D:** PK -  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; **E:** PK – LDH-A inhibiötörü; **F:** PK – LDH-A inhibitörü +  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; **G:** PK - LDH-A inhibitörü + Dosetaksel.

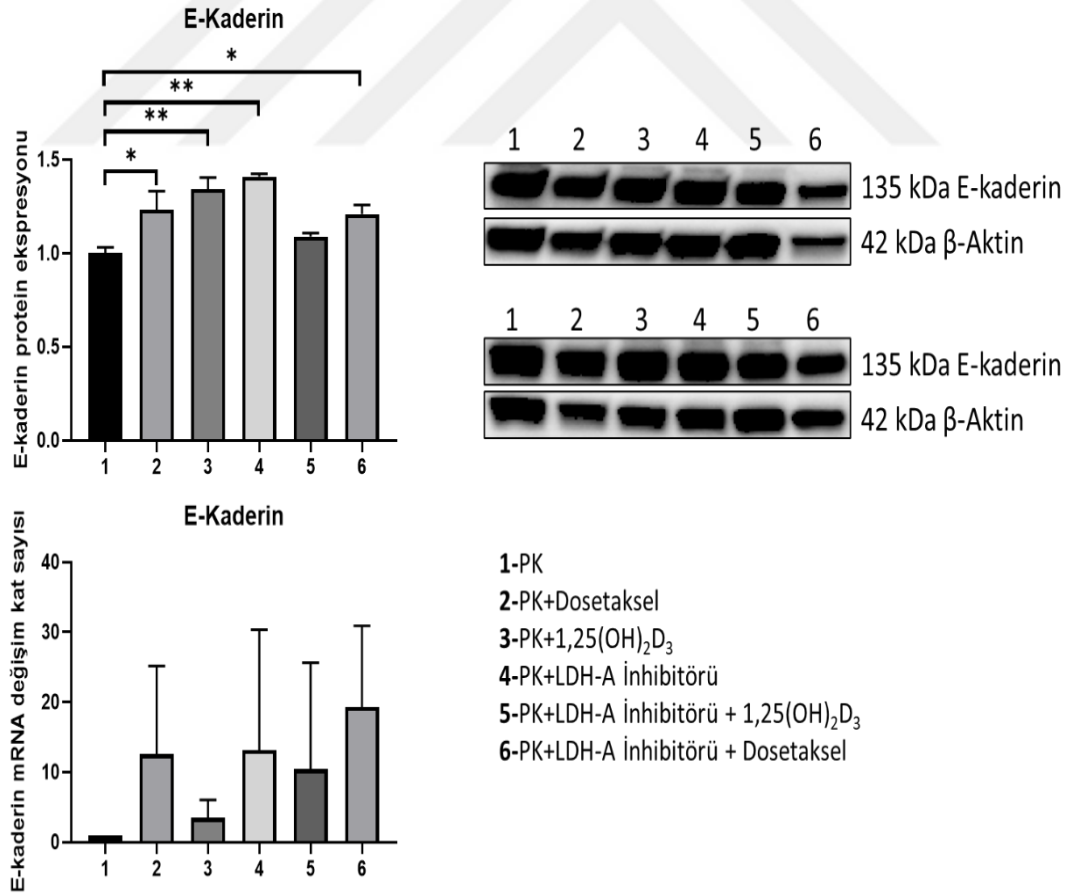
Kontrol ve PK grubunda ve LDH-A inhibitörü tedavisi uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde anormal bulgulara rastlanmadı. Bu grupta glomerüler bazal membran ve mezengial matriks oranları normaldi (Şekil 6.8.2 A,B,E). Dosetaksel,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini, LDH-A inhibitörü+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksel tedavisi uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde mezengial matrikste artış, bowman kapsülü pariyetal yaprak hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi, glomerüllerde hipertrofi gözlemlendi (Şekil 6.8.2 C,D,F,G).



## 6.9. Tümör Dokularında EMT Analizinin Sonuçları

E-kaderin proteini incelendiğinde, PK grubuna göre Dosetaksel, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini, LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi gruplarının protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde bir artma görülürken ( $p < 0,05$ ), LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tedavi grubunda sayısal bir artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamadı ( $p > 0,05$ ) (Şekil 6.9.1).

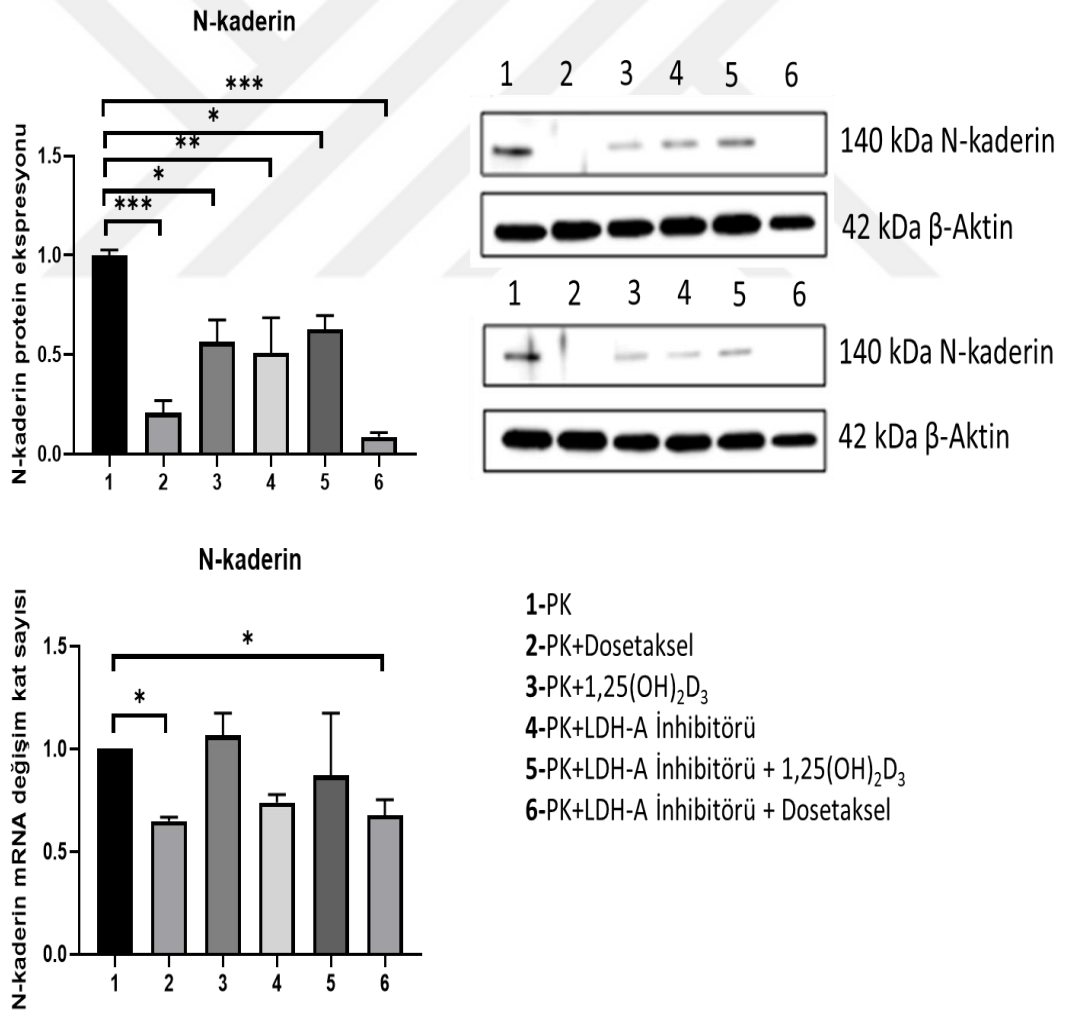
E-kaderin qPCR sonuçlarına bakıldığında ise, western blot sonuçlarını doğrular şekilde PK grubunun E-kaderin mRNA ekspresyon seviyesi tedavi gruplarından daha düşük seviyede bulunmuştur. Özellikle Dosetaksel, LDH-A inhibitörü, LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi gruplarının mRNA seviyeleri sayısal olarak çok yüksek bulunmuştur ( $p > 0,05$ ) (Şekil 6.9.1).



Şekil 6.9.1. E-kaderin proteininin Western Blot ve qPCR sonuçları

Tümör dokusunda N-kaderin protein ekspresyonu incelendiğinde, PK grubuna göre Dosetaksel, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini, LDH-A inhibitörü, LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksel tedavisi uygulanan grubun ekspresyonlarında istatistiksel olarak bir azalma gözlemlendi (**p<0,05**). Özellikle Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunun N-kaderin protein ekspresyonu çok düşük bulundu (**p<0,05**) (Şekil 6.9.2).

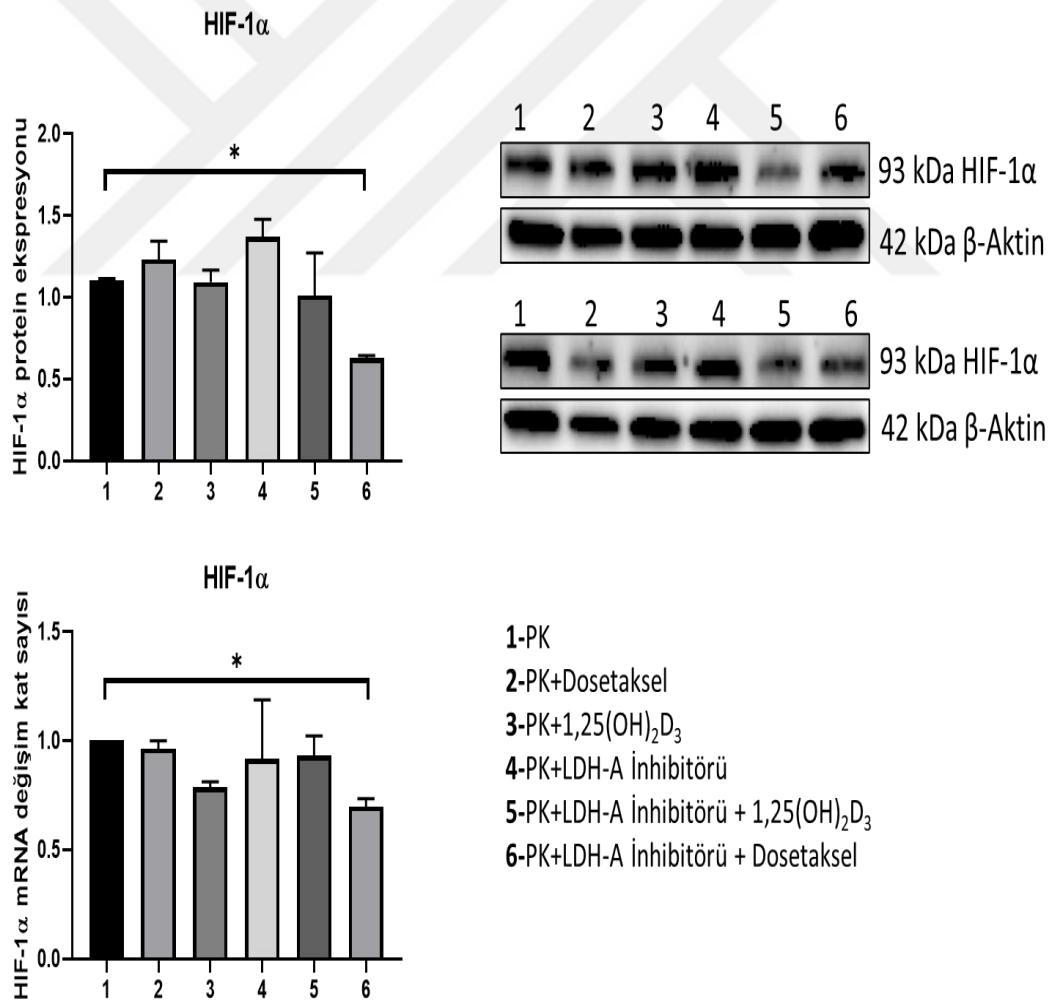
N-kaderin mRNA ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, PK grubuna göre Dosetaksel ve LDH-A + Dosetaksel grubunun mRNA seviyeleri istatistiksel anlamda düşük bulundu (**p<0,05**). LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini grubunda da bir düşme gözlemlense de istatistiksel olarak bir fark bulunamadı (**p>0,05**) (Şekil 6.9.2).



Şekil 6.9.2. N-kaderin proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları

Tümör dokusunda HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu incelendiğinde, PK grubuna göre LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi grubunun ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde bir azalma gözlemlendi (**p<0,05**). Diğer gruplarda ise Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü uygulanan tedavi grubunda artma, 1,25(OH) $_2$ D $_3$  vitamini ve LDH-A inhibitörü+1,25(OH) $_2$ D $_3$  uygulanan tedavi grubunda bir azalma gözlemlendi (**p>0,05**) (Şekil 6.9.3).

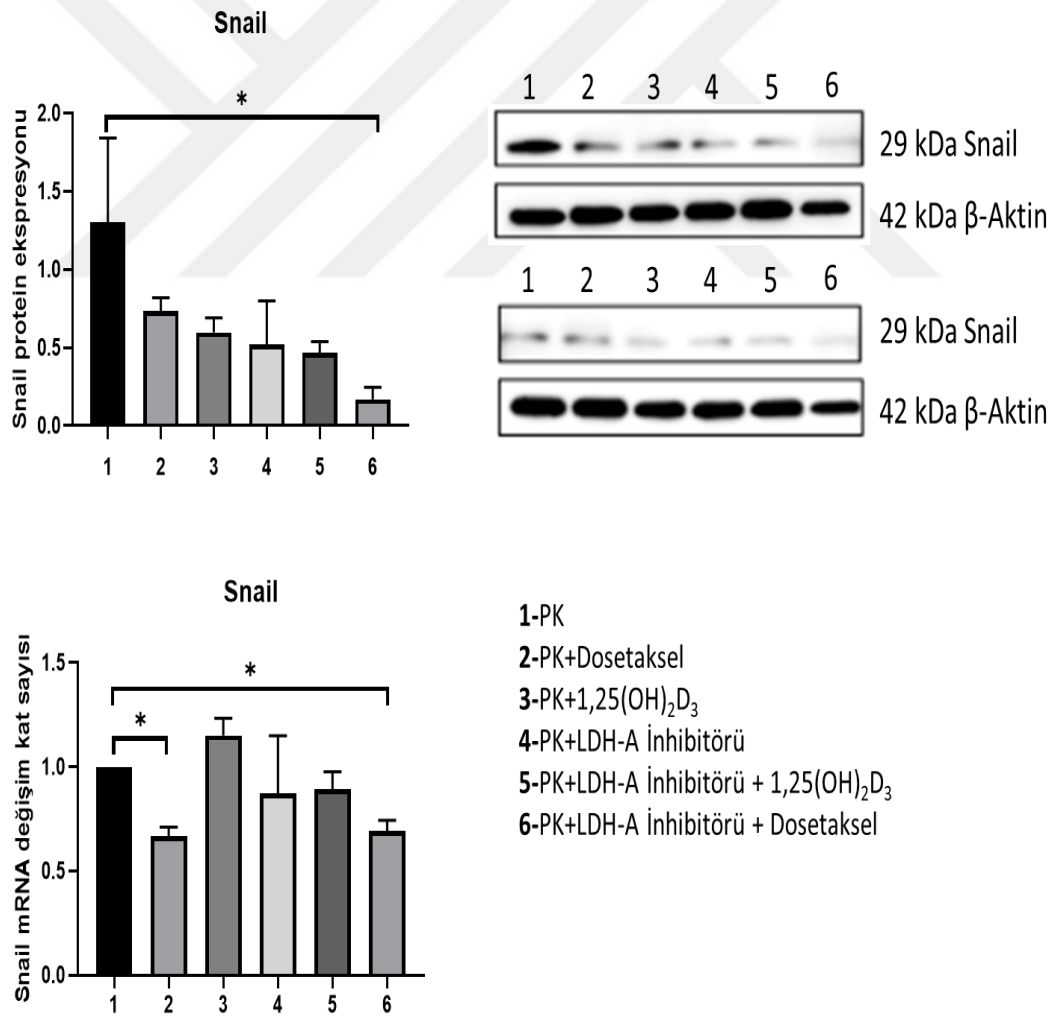
HIF-1 $\alpha$  mRNA seviyelerine bakıldığında ise LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi grubunun HIF-1 $\alpha$  mRNA seviyeleri PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (**p<0,05**). Diğer gruplarda ise PK grubuna göre düşük mRNA seviyelerine sahip olsa da istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı (**p>0,05**) (Şekil 6.9.3).



**Şekil 6.9.3.** HIF-1 $\alpha$  proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları

Tümör dokusunda Snail ekspresyonu incelendiğinde, PK grubuna göre, LDH-A inhibitörü + Dosetaksel uygulanan tedavi grubunun Snail ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu bulundu ( $p<0,05$ ). Yine PK grubuna göre Dosetaksel,  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini, LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini tedavi gruplarında sayısal olarak bir azalma görüldü de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.9.4).

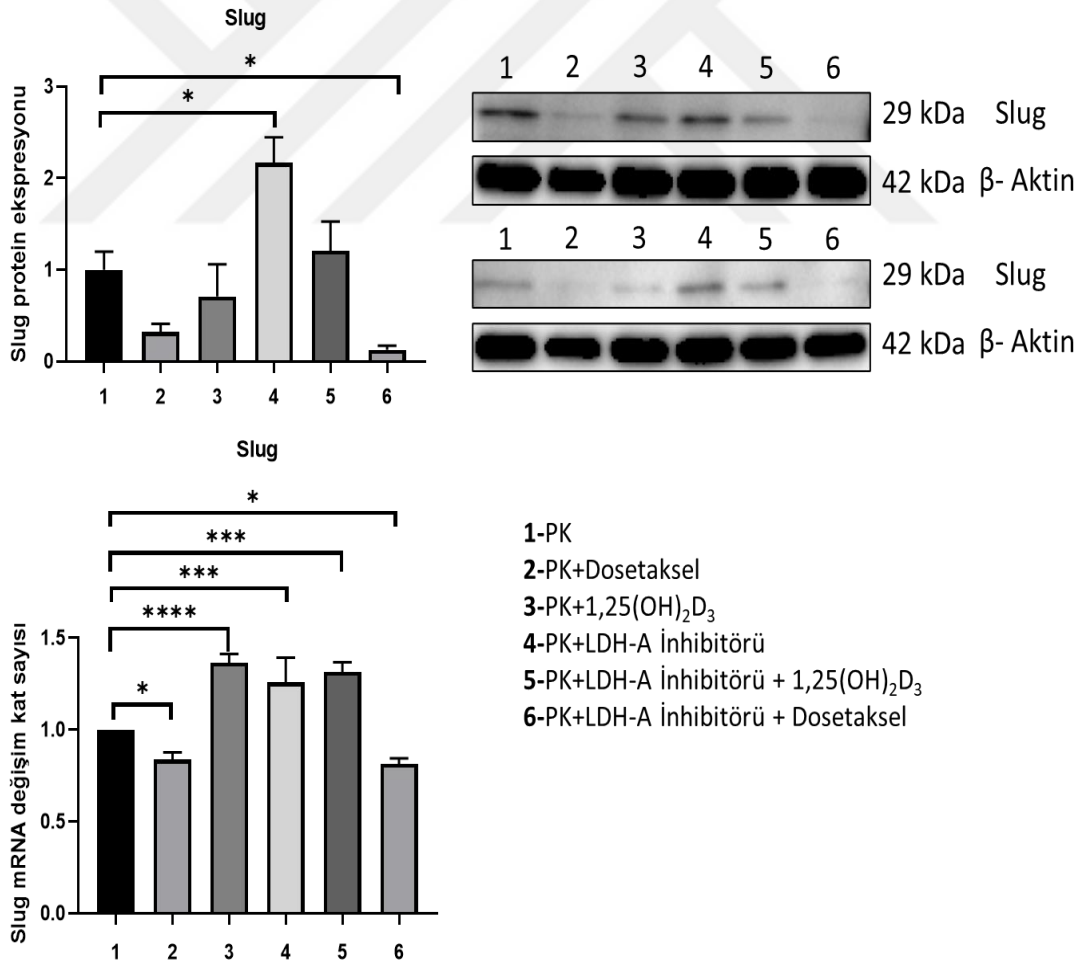
Snail mRNA seviyelerine bakıldığında ise, Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi gruplarının mRNA seviyeleri PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Ayrıca LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini gruplarının Snail mRNA seviyeleri PK grubuna göre sayısal olarak düşük bulundu ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.9.4).



Şekil 6.9.4. Snail proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları

Slug proteini western blot ekspresyonları incelendiğinde, LDH-A inhibitörü tedavi grubunun slug ekspresyonu PK grubunun Slug ekspresyonuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunun Slug ekspresyonu PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış bulundu ( $p<0,05$ ). Ayrıca Dosetaksel ve  $1,25(OH)_2D_3$  grubunun Slug seviyeleri PK grubuna göre sayısal olarak düşük, LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini grubunun Slug seviyeleri ise PK grubuna göre artmış bulundu ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.9.5).

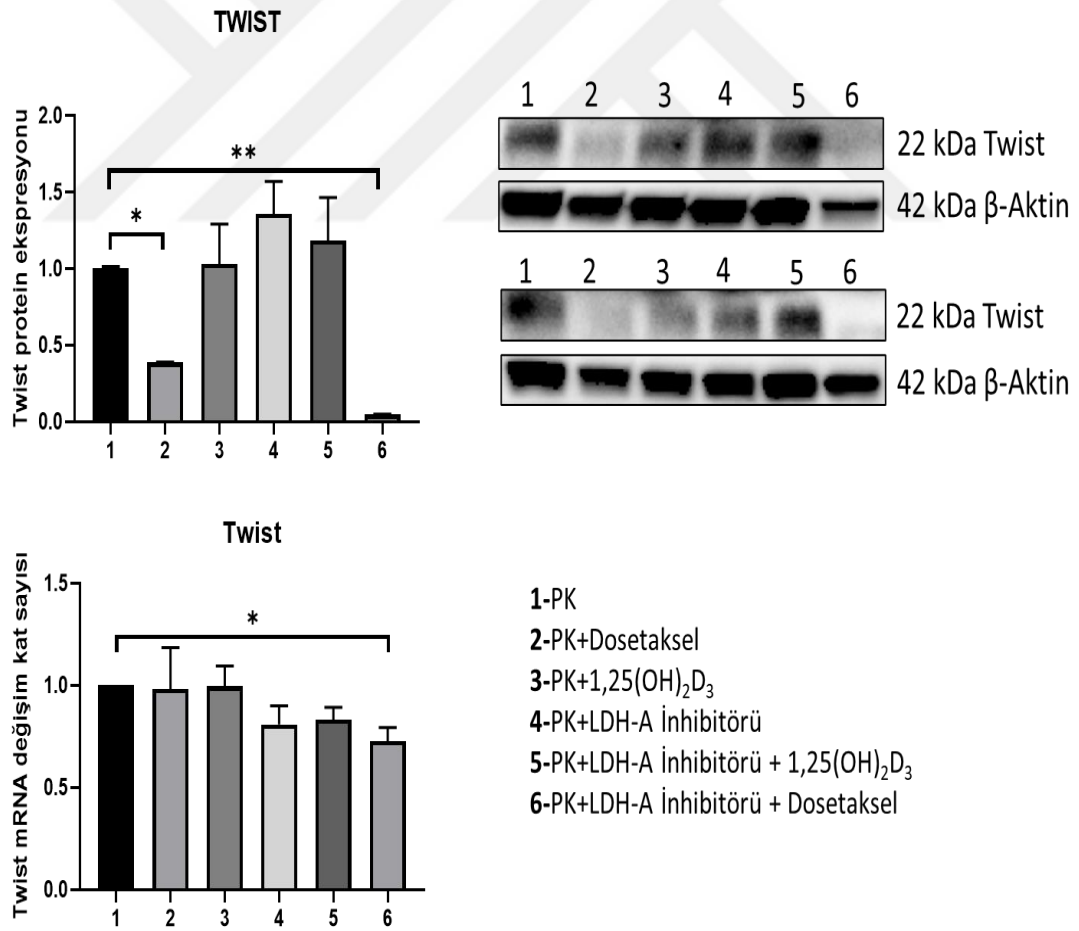
Slug mRNA seviyeleri incelendiğinde ise, Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi grubunun Slug mRNA seviyeleri PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük,  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini, LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini tedavi grubunun mRNA seviyeleri PK grubuna göre artmış bulundu ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.9.5).



Şekil 6.9.5. Slug proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları

Tümör dokusunda Twist protein ekspresyonu incelendiğinde, Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi grubunun Twist protein ekspresyonu PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini grubunun Twist ekspresyonu PK grubuna göre sayısal olarak yüksek bulundu ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.9.6).

Twist mRNA seviyesine bakıldığında ise LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunun Twist seviyesi PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu. Ayrıca Dosetaksel LDH-A inhibitörü ve LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini tedavi gruplarının Twist mRNA seviyeleri PK grubuna göre sayısal olarak düşük bulunmasına rağmen istatistiksel bir anlamlılık bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 6.9.6).



Şekil 6.9.6. Twist proteinin Western Blot ve qPCR sonuçları

## 7. TARTIŞMA

PK, dünyanın birçok yerinde erkeklerde önde gelen kanser türüdür. Ancak insidans ve ölüm oranları popülasyona göre önemli ölçüde farklılık gösterir. PK insidansı tarama ve erken teşhis dahil olmak üzere tıbbi bakıma erişimin kolay olduğu dünyanın daha gelişmiş bölgelerinde (örneğin, Kuzey Amerika, Batı ve Kuzey Avrupa ve Avustralya) en yüksek oranda görülmektedir. Buna karşılık, PK ölüm oranı Afrika kökenli erkeklerde en yüksek olarak görülmektedir (157). Artan ölüm oranları nedeni ile PK tedavisi önemli bir konu olmaya devam etmektedir.

PK için farklı tedavi türleri bulunmaktadır. Dosetaksel, mikrotübüllere bağlanarak ve androjen reseptörü nükleer translokasyonunu önleyerek ve B hücresi lenfoma (Bcl-2) fosforilasyonu yoluyla apoptoza neden olarak çalışan bir taksan türevidir (42). Dosetaksel PK tedavisinde ya tek ajan ya da anti-androjen tedavisi ile kombine şekilde uygulanmaktadır (158). Ancak uzun süreli Dosetaksel uygulamasının da PK'da kemoterapiye karşı direnç oluşturduğunu gösteren klinik ve deneysel araştırmalar vardır (159,160). Literatürde konvansiyonel terapi olarak kullanılan Dosetaksel'e ilave olarak D vitamini ve LDH-A inhibitörü ile yapılan in vitro çalışmalar vardır.

Anaerobik glikolizin son basamağında görevli enzim olan LDH-A düzeyinin hepatoselüler, meme, prostat gibi insan kanser türlerinde aşırı derecede arttığı bilinmektedir. LDH-A inhibisyonunun tümör oluşumunu geciktirdiği ve tümör progresyonunu yavaşlatmada rolü olduğu düşünülmektedir (3).

D vitamini'nin 1970'lerin başından beri kanserin nedeni ve tedavisinde potansiyel rolü olduğu düşünülmektedir. D vitamini ile kanser tedavisi üzerine yapılan çalışmalarda kanser gelişimini engellediği ve insan kanser hücrelerinde tespit edilen VDR'nin in vitro olarak kanserin büyümesini durdurduğu gösterilmiştir (137).

Prostat kanser hücrelerinde apoptoza uğrama oranı normal hücrelere göre gözle görülür şekilde azalmaktadır. Çünkü hasarlı olan kanser hücreleri programlı hücre ölümü olan apoptozdan kaçarak yaşamına devam etmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda da görülmüştür ki PK hücre hatlarında (PC3, LNCaP, DU-145, Tramp-C2) kontrol grubuna göre apoptoza uğrama oranları düşmüştür (161).

PK'nin tedavisinde kullanılan önemli bir kemoterapötik olan Doseksel yarı sentetik bir taksan analogudur. Yapılan farklı çalışmalarda Doseksel'in yüksek dozlarda apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (162, 163). Yang ve ark.'larının yaptığı çalışmada 3 farklı PK hücre hattı kullanılmıştır. PC-3 hücre hattı için 0-64 nM, DU-145 için 0-40 nM ve LNCaP için 0-8 nM konsantrasyon değer aralıklarına sahip Doseksel dozları uygulanmıştır. PC-3, DU-145, LNCaP için düşük Doseksel dozları sırasıyla 0,75 nM, 2 nM, 0,5 nM olarak belirlenmiştir. PC-3, DU-145, LNCaP için yüksek Doseksel dozları sırasıyla 3 nM, 4 nM, 1 nM olarak belirlenmiştir. Her bir hücre hattı için düşük doz Doseksel apoptoz açısından bir etki göstermez iken yüksek doz Doseksel istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptozu arttırmıştır (162). Diğer bir çalışmada LNCaP PK hücre hatlarına 0 nM, 5 nM, 7,5 nM, 10 nM Doseksel uygulanmıştır. 7,5 nM ve 10 nM olarak uygulanan Doseksel dozlarında 0 nM olarak uygulanan Doseksel grubuna göre apoptozun arttığı ve kaspaz-3 aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, mevcut çalışmalar, Dosekselin antikanser etkisinin, insan LNCaP PK hücrelerinde hücre büyümesini baskıladığını, sitotoksitesiyi artırdığını, yüksek dozlarda apoptozu indüklediğini ve kaspaz-3 aktivitesini aktive ettiğini ortaya koymuştur (163). Wenner ve ark.'larının yaptığı çalışmada farede TRAMP-C2 PK hücre hattı kullanılarak oluşturulan modelde haftada iki kere hayvanlara 10 mg/kg Doseksel verilmiştir. Apoptoz yoğunluğunu anlamak için yapılan TUNEL boyamasında Doseksel uygulanan grubun kontrol grubuna göre apoptoz yoğunluğunun anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir (164).

Apoptozu değerlendirmek için serum CK18-M30'a ilave olarak tümör dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptoz değerlendirildi. Kontrol grubunun CK18-M30 değerleri ( $157,10 \pm 13,58 \mu\text{U/ml}$ ) Doseksel ( $369,67 \pm 12,72 \mu\text{U/ml}$ ) bulundu. PK grubunun CK-18/M30 değerleri ( $103,25 \pm 11,35 \mu\text{U/ml}$ ), Doseksel ( $369,67 \pm 12,72 \mu\text{U/ml}$ ) bulundu. Doseksel grubunda hem kontrol grubuna göre hem de PK grubuna göre istatistiksel olarak artmış apoptoz değerleri gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). TUNEL görüntülerinden görüldüğü üzere CK18-M30 değerleri ile TUNEL görüntülerinin gösterdiği apoptozu ugrama durumları paralel olarak bulundu. TUNEL sonuçlarına göre tüm çalışma grupları ile kıyaslandığında en fazla apoptozu ugrama oranı Doseksel gruplarında görüldü.



Yapılan çeşitli tümör modeli çalışmalarında 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Guzey ve ark.'larının DU-145 ve LN-CaP PK hücrelerini kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada hücre hatlarına 1-100 nM arasında 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini uygulanmıştır. 1 nM dozda D vitaminin apoptozu indüklediğini gösterilmiştir (165).

Zheng ve ark.'larının yaptığı çalışmada meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ve prostat kanser hücre hattı PC3'e in vitro ve in vivo olarak 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini uygulanmış. Yapılan TUNEL boyamasında D vitamini uygulanan grubun apoptoza uğrama yüzdesi daha fazla bulunmuştur (166).

Daha önce sağlıklı farelerde yaptığımız çalışmada; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitaminin 1 µg/kg, 5 µg/kg ve 10 µg/kg'lık dozlarının apoptozu indüklediğini ortaya koymuştuk (147). Benzer şekilde mevcut çalışmamızda PK kanser modeli oluşturduğumuz farelere uyguladığımız 5 µg/kg'lık 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini dozunun apoptozu PK grubuna göre arttırdığı hem serumda CK18-M30 hem de dokuda TUNEL yöntemi ile gösterildi.

Hao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise FX-11 ve LDHA-siRNA inhibisyonu ile LDH-A'nın inhibisyonun apoptozu indüklediği gösterilmiştir (167). Bu durum Le ve ark.'larının lenfoma hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada LDH-A inhibisyonunun oksidatif stresi artırarak apoptoza neden olduğu şeklinde açıklanmıştır (168). Bizim sonuçlarımızda LDH-A inhibitörü TAK değerlerini PK grubuna göre arttırmış, TOS ve OSİ değerlerinde istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır. Dolayısıyla LDH-A inhibitörünün apoptozu arttırması oksidatif stresin dışında başka nedenlere bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Dosetaksel ve sodyum okzamat monoterapisi ile kombinasyon terapisi karşılaştırıldığında hücre apoptozunu kolaylaştırdığı ve LN-CSS hücrelerinde (hormona dirençli LNCaP hücreleri) hücre büyümesini etkin şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, LDH-A'nın Dosetaksel direnci ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu ve özellikle kastrata dirençli prostat kanserli (CRPC) hastalarda Dosetaksel direncinin üstesinden gelmek için yeni bir terapötik stratejiyle sonuçlanabileceğini gösterdi (169).

Dosetaksel ile LDH-A inhibitörünün kombine olarak kullanılması, kanser metabolizmasını hedefleyen bir yaklaşımla klasik kemoterapi ajanının sinerjik etkisinin gösterilmesi çalışmamızın bir diğer özgün değerini oluşturmaktadır.

Bizim çalışmamızda, kontrol grubunun CK18-M30 değerleri ( $157,10 \pm 13,58$   $\mu\text{UI/ml}$ ) LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $477 \pm 15,63$   $\mu\text{UI/ml}$ ) uygulanan grubun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). PK grubu ( $103,25 \pm 11,35$   $\mu\text{UI/ml}$ ) ve LDH-A inhibitörü +  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $321,17 \pm 7,76$   $\mu\text{UI/ml}$ ) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $477 \pm 15,63$   $\mu\text{UI/ml}$ ) grubunun CK18-M30 değerleri karşılaştırıldığında tedavi gruplarında değerlerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı bulundu ( $p < 0,05$ ).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini uygulanan grubun CK18-M30 değerleri ( $188 \pm 9,19$   $\mu\text{UI/ml}$ ) LDH-A inhibitörü + Dosetaksel uygulanan gruba ( $477 \pm 15,63$   $\mu\text{UI/ml}$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Tümör dokularında immünohistokimyasal bir yöntem olan TUNEL boyama ile mikroskop altında alınan görüntülerde de görüldüğü üzere CK18-M30 değerleri ile TUNEL görüntülerinin gösterdiği apoptoza uğrama durumları paralel olarak bulundu. Bu bize uyguladığımız tedavilerin özellikle Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi gruplarının apoptozu hem serum hem tümör dokusunda arttırdığını ve tümör boyutu ve büyümesini engellediğini gösterdi.

Kanser hücrelerinde, glikoz metabolizması, piruvata dönerek oksidatif fosforilasyon ile devam etmek yerine laktat metabolizmasına doğru kayar. LDH-A enzimi, Warburg metabolizmasına geçişte önemli bir rol oynar. Metabolizma yönündeki değişiklik ile trikarboksilik asit (TCA) döngüsü yoluyla ATP üretimindeki verimliliği artırmak yerine, kanser hücresinin büyüme potansiyelini arttıran yapı taşları olan amino asitleri üretmek üzere glikozu kullanır (170).

Piruvatı laktata dönüştüren LDH-A, neoplastik ve neoplastik olmayan hücrelerde, glikoliz, gen transkripsiyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve beyin gelişiminde rol oynar. LDH-A, birçok kanser türünün büyümesini ve metastazını destekleyen önemli bir glikolitik enzimdir. LDH-A, birçok kanser türünde anormal şekilde yükselir ve metabolik yeniden programlamayı ve kanser hücrelerinin kötü huylu proliferasyonunu destekler. Dolayısıyla kanser hücrelerinde anerobik

glikolizin kilit bir kontrol noktası olarak görev alır. LDH-A ekspresyonu, transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonel koaktivatörler ve protein kinazlar gibi birçok faktör tarafından düzenlenebilir (171).

PK'inde LDH-A inhibitörlerinin hücre kültür ortamlarında ve hayvan deneylerinde etkileri üzerine çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında; LDH-A inhibisyonunun hücre proliferasyonunu, migrasyonu ve invazyonunu baskıladığı ve hücre apoptozunu arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca bu sayede glukoz metabolizmasının kanser hücrelerinde yeniden programlandığı ve laktat seviyelerinin düştüğü, glukoz tüketiminin ise azaldığı gösterilmiştir (163,167).

Yamada ve ark.'larının yaptığı çalışmada PK'da yüksek serum LDH seviyelerinin hastalığın prognozunu kötü yönde etkilediği bildirilmiştir (172).

Nunes ve ark.'larının yaptığı çalışmada ilerlemiş PKnde glikolizin ve laktat üretiminin arttığı, bu nedenle PKnin daha agresif seyrettiği görülmüştür (173).

Hiew ve ark.'larının yaptığı çalışmada PK hücre hatlarına uygulanan Doseksel tedavisinin LDH-A ve laktat seviyelerini düşürdüğü görülmüştür (174).

Zeng ve ark.'larının insan endometrial Ishikawa hücrelerinde yaptıkları çalışmada 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitaminin laktat üretimini arttırdığı ve aynı şekilde, laktat taşınmasını sağlayan monokarboksilat taşıyıcı izoform 4 (MCT4)'ün transkripsiyon ve protein seviyelerinin aşağı regülasyonunu sağlar (175).

Ancak yapılan literatür çalışmalarında, kombine tedavi şeklinde uygulanan LDH-A inhibitörü+Doseksel ve LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini tedavilerinin etkilerini gösteren in vivo ve in vitro bir çalışma bulunamamıştır.

Bizim çalışmamızda, PK grubunun laktat değerleri (3,05 ± 0,36 mmol/L) kontrol grubunun laktat değerlerine (2,07 ± 0,43 mmol/L) göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0,05). LDH-A inhibitörü (1,49 ± 0,39 mmol/L), LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,45 ± 0,16 mmol/L) ve LDH-A inhibitörü+Doseksel tedavi grubunun laktat değerleri (1,11 ± 0,13 mmol/L) kontrol grubunun laktat değerlerine (2,07 ± 0,43 mmol/L) göre istatistiksel olarak düşük bulundu (p<0,05). PK grubunun laktat değerleri (3,05 ± 0,36 mmol/L) ise Doseksel (1,73 ± 0,18 mmol/L), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (1,91 ± 0,13 mmol/L), LDH-A inhibitörü (1,49 ±

0,31 mmol/L), LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,45 ± 0,16 mmol/L) ve LDH-A inhibitörü+Dosetaksel (1,11 ± 0,13 mmol/L) gruplarının laktat seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). Dosetaksel uygulanan grubun laktat seviyeleri (1,73 ± 0,18 mmol/L) LDH-A inhibitörü + Dosetaksel uygulanan grubun laktat seviyelerine (1,11 ± 0,13 mmol/L) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> grubunun laktat seviyeleri (1,91 ± 0,13 mmol/L) yine LDH-A inhibitörü + Dosetaksel uygulanan grubun laktat seviyelerine (1,11 ± 0,13 mmol/L) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). Yaptığımız çalışmada çıkan sonuca göre, LDH-A inhibisyonunu yaptığımızı kanıtlamış olduk. Bu da bize warburg etkisini tersine çevirebildiğimizi gösterdi. Ayrıca uyguladığımız tedavilerin tamamının laktat seviyelerini düşürdüğünü ancak en çok düşmenin kombine tedavimiz olan LDH-A inhibitörü ve Dosetaksel grubunda olduğu görüldü. Bunun tek tek bakıldığında ise Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü uygulanan gruplardan daha fazla laktat seviyesinde düşme ve warburg etkisini tersine çevirip hücrenin enerji metabolizmasını daha iyi düzenlenmesine neden olduğu düşünüldü.

LDH-A inhibisyonu laktat düzeyini azaltmanın yanında oksidatif stresi arttırarak etki etmektedir (160). Oksidatif stres PK'nin başlanması ve ilerlemesinde önemlidir. Androjenlerin modülasyonu, iltihaplanma, tümör baskılayıcı gen (p53), antioksidanlar ve yaşa bağlı oksidatif stres gibi birçok faktörün neden olduğu oksidatif serbest radikalleri PK'yı başlatabilir (176).

Yapılan çalışmalarda, PK'nin ilerlemesinde, düşük ROS konsantrasyonlarının, çeşitli yolların aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasını ve göçünü uyararak PK gelişimini teşvik ederken, yüksek ROS seviyelerinin apoptoza yol açtığını göstermiştir (177,178).

Dosetaksel, glioblastoma, meme ve prostat dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır, ancak beyin ve testis gibi normal dokularda birçok yan etkiye neden olmaktadır. Dosetaksel vücuttan böbrek yoluyla atılır. Bu nedenle Dosetaksel, insan böbrek hücrelerinde de yan etki olarak nefrotoksisite yol açar. Bununla birlikte, böbrekteki Dosetaksel'in toksisitesi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak bazı çalışmaların sonuçları,

Dosetaksel'in toksisitesinin aşırı mitokondriyal ROS üretimi tarafından indüklendiğini göstermiştir (179).

Yarım ve ark.'larının yaptığı çalışmada sağlıklı sıçanlara 30 mg/kg dozunda Dosetaksel uygulaması yapılmış. Uygulanan dozda Dosetaksel'in vücutta oksidatif stresi arttırdığı, beyin ve karaciğer dokularında da oksidatif strese bağlı toksisite oluşumu gözlemlemişlerdir (180).

Daha önce sağlıklı farelerde yaptığımız çalışmada 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitaminin 1,5 ve 10 mg/kg'lık dozlarının oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiş ayrıca doza bağlı olarak böbrek ve karaciğer üzerine olan toksik etkileri HE ve PAS boyamaları ile gösterilmiştir (147).

Ancak yapılan literatür aramalarında yine apoptozda olduğu gibi kombine tedavi şeklinde uygulanan LDH-A inhibitörü+Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini tedavilerinin oksidatif stress üzerine etkilerini gösteren bir çalışma bulunamamıştır. Bu da çalışmamızın diğer bir özgün değerini oluşturmaktadır.

Bizim çalışmamızda, PK (3,10 ± 0,16), Dosetaksel (6,39 ± 0,46), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (3,37 ± 0,33), LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (4,27 ± 0,33) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel (10,32 ± 1,08) tedavi gruplarının OSİ değerleri kontrol grubunun OSİ değerleri (1,67 ± 0,22) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). PK grubunun OSİ değerleri (3,10 ± 0,16), Dosetaksel (6,39 ± 0,46), LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (4,27 ± 0,33) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel (10,32 ± 1,08) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,05). Dosetaksel tedavi grubunun OSİ değerleri (6,39 ± 0,46), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (3,37 ± 0,33), LDH-A inhibitörü (2,26 ± 0,39) ve LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini (4,27 ± 0,33) tedavi gruplarının OSİ değerlerine göre yüksek bulunurken, LDH-A inhibitörü + Dosetaksel (10,32 ± 1,08) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,05). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini grubunun OSİ değerleri (3,37 ± 0,33), LDH-A inhibitörü (2,26 ± 0,39) grubunun OSİ değerlerinden anlamlı şekilde yüksek bulunurken, LDH-A inhibitörü + Dosetaksel (10,32 ± 1,08) grubunun OSİ değerlerinden istatistiksel

olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). LDH-A inhibitörü grubunun OSİ değerleri ( $2,26 \pm 0,39$ ), LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini ( $4,27 \pm 0,33$ ) ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $10,32 \pm 1,08$ ) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). LDH-A inhibitörü +  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini grubunun OSİ değerleri ( $4,27 \pm 0,33$ ), LDH-A inhibitörü + Dosetaksel ( $10,32 \pm 1,08$ ) tedavi gruplarının OSİ değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). Elde edilen verilere göre PK'inde çalışma gruplarının içinde Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunun oksidatif stresi en fazla arttırdığı görülmüştür. Oksidatif stres üzerinde gerçekleşen bu artış apoptozu tetikleyerek hücrenin daha fazla apoptoza gitmesini sağlamış ve ayrıca tümör boyutlarının azalmasına neden olmuştur. Dosetaksel nefrotoksik bir kemoterapötik ajan olması nedeniyle sadece Dosetaksel uygulanan grupta böbrekte histolojik olarak mezenkimal matrikste hasar görülürken, LDH-A inhibitörü + Dosetaksel kombine tedavi grubunda bu hasarın daha arttığı görüldü. Bu da LDH-A inhibitörünün Dosetaksel'in böbrek üzerine olan toksik etkisini artırıcı yönde etki ettiğini düşündürmektedir. Ancak LDH-A inhibitörünün Dosetaksel ile beraber kullanılması karaciğer hasarını azaltıcı yönde etki göstermemiştir. Bu bulgular daha sonra yapılacak çalışmalarda Dosetaksel + LDH-A inhibitörü'nün farklı doz aralıkları ile yapılacak çalışmalarda karaciğer ve böbrek hasarına en az neden olan dozun tespitinin faydalı olacağını düşündürmektedir.

EMT, epitel hücrelerinin hücre polaritesini hücre-hücre yapışmasını kaybettiği, migrasyon ve invazyon özelliklerini kazandığı bir süreçtir. Twist, Snail ve Slug gibi EMT ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin hepsi migrasyon için gereklidir. E-kaderin, yapışma birleşiminden sorumlu anahtar epitel belirteci olarak, hücrelerin epitel fenotiplerini korumasını sağlar. E-kaderin ekspresyonunun azalması, PKnin metastatik ilerlemesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, bu EMT belirteçleri, PKnin seyrini tahmin etmede önemli prognostik faktörler olma potansiyeline sahiptir (181).

Son yıllarda Dosetaksel PK vakalarında standart birinci basamak tedavi olarak kabul edilmiştir; bununla birlikte, tedavi sonucu gelişen Dosetaksel direnci sınırlı sağkalım avantajı sağlar (119). Yapılan çalışmalarda, PK, meme kanseri, akciğer ve over kanseri gibi kanser türlerinde uzun süre kullanılan Dosetakselin belli bir süre sonra ilaç direncine neden olduğu ve bunun EMT'ye bağlı geliştiğini

göstermişlerdir (182-185). Yapılan bu çalışmalarda, E-kaderin konsantrasyonunda artma olduğu, vimentin ve N-kaderin konsantrasyonlarında azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinden olan Snail, slug, twist ve Zeb'in konsantrasyonlarında artma görülmüştür (182-185).

Bizim çalışmamızda ise PK'inde Dosekselin kısa süreli uygulamasında E-kaderin protein konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenirken mRNA seviyelerinde sayısal bir artış gözlemlendi. N-kaderin'de ise hem protein konsantrasyonu hem de mRNA seviyelerinde anlamlı şekilde düşüş gözlemlendi. Transkripsiyon faktörleri incelendiğinde ise Snail'de hem protein konsantrasyonunda hem de mRNA seviyelerinde anlamlı bir düşme gözlemlendi. Slug proteini için protein konsantrasyonunda sayısal bir azalma var iken mRNA seviyelerinde anlamlı bir düşüş görüldü. Twist'te ise protein konsantrasyonunda anlamlı bir düşme, mRNA seviyelerinde ise sayısal bir düşüş görüldü. Bu da bize EMT mekanizmasının kısa süreli Doseksel kullanımında MET'e döndüğünün göstermiştir. Metastaz mekanizması durdurulmuştur.

LDH-A enerji yollarından biri olan glikoliz için anahtar enzimlerden bir tanesidir. Solid tümörlerde LDH-A'nın aşırı ekspresyonu gözlemlenmektedir ve bunun da tümör ilerlemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (186-188). Yapılan çalışmalarda, HIF-1 $\alpha$  konsantrasyonunun artması ile LDH-A'nın PK'inde arttığı görüldü (189,190). Ayrıca LDH-A ve HIF-1 $\alpha$ 'nın korele bir şekilde artışı ile myeloma kanser hücrelerinde ilaç rezistansına neden olduğu görüldü (191). Bu da LDH-A inhibisyonunun EMT üzerine etkisinin hipoksi yolağı üzerinden olduğunu düşündürmektedir.

Sheng ve ark.'larının PK'inde yaptığı çalışmada LDH-A'nın tamamen inhibisyonu veya prostat kanser hücrelerinin LDH-A konsantrasyonunun azaltılmasının hücre büyümesini ve metastazı yani EMT'yi inhibe etmek için yeterli olduğu gösterildi (192).

Hao ve ark.'larının yaptığı çalışmada, PK hücre hattı PC3 ve radyorezistans PK hücre hattı PC3-RR kullanılmıştır. siRNA ve FX11 ile yapılan LDH-A inhibisyonunun EMT'yi azalttığı gösterilmiştir. Çalışmanın Western blot sonuçlarında E-kaderin konsantrasyonunda artma ve N-kaderin konsantrasyonunda

azalma gösterilmiştir. Ayrıca LDH-A inhibisyonu ile HIF-1 $\alpha$  protein konsantrasyonu da azalmıştır. Bu da LDH-A inhibisyonunun EMT'yi hipoksi yolağı üzerinden etkilediğini göstermektedir. Ayrıca hipoksinin LDH-A inhibisyonu ile bastırılacağına böylece tümöre ait yaşam genlerinin inhibisyonuna ve radyasyon tedavisine ve kemoterapiye tekrar sensitivite kazanacağı bulunmuştur (167).

Hou ve ark.'larının akciğer kanseri hücre hatları kullanarak yaptığı çalışmada LDH-A inhibisyonunun EMT üzerindeki etkisini incelemek için western blot analizi yapılmış ve E-kaderin konsantrasyonunda artma, N-kaderin, vimentin, Snail ve Zeb-1 konsantrasyonlarında düşme olduğu gösterilmiştir. Bu da LDH-A konsantrasyonunda gerçekleşen azalmanın EMT'yi azalttığını göstermiştir (193).

Bizim çalışmamızda; PK'inde LDH-A inhibitörü kullanılan grupta, E-kaderin ekspresyonunu arttığı ve mRNA seviyelerinin yükseldiği görüldü. N-kaderin protein ekspresyonunun düştüğü ve mRNA seviyelerinde düştüğü görüldü. Bu da LDH-A inhibitörünün kaderin değişimini inhibe ettiğini ve mezenkimal yapının epitelyal yapıya geri dönmeye başladığını göstermektedir. Transkripsiyon faktörleri incelendiğinde ise, Snail protein ekspresyonu ve mRNA seviyelerinde düşmeye sebep olduğu Twist protein ekspresyonunda yükselme ve mRNA seviyelerinde düşme olduğu, Slug protein ekspresyonunda yükselme ve mRNA seviyelerinde yükselme olduğu görülmüştür. Slug ve Twist'ten elde edilen veri LDH-A inhibitörünün Slug ve Twist üzerinde etkisinin olmadığını, Snail transkripsiyon faktörü üzerinden PK'ne etki gösterdiğini net şekilde ortaya koymuştur.

LDH-A inhibitörü + Dosetaksel kombine tedavisi, E-kaderin ekspresyonu ve mRNA seviyelerinde diğer tedavi gruplarına göre yükselmeye neden olduğu ve N-kaderin protein ekspresyonu ve mRNA seviyelerinde düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Bu veriler kombine tedavinin EMT'yi MET'e çevirmede ve metastazı inhibe etmede daha etkin olduğunu göstermektedir. Ayrıca Snail, Slug ve Twist transkripsiyon faktörlerinin hem protein ekspresyonları hem de mRNA seviyelerinde diğer uygulanan tedavi yöntemlerine göre azalma görülmüştür. Bu da bize kombine tedavinin EMT yolaklarının bir veya daha fazlasını inhibe ettiğini düşündürmektedir. Ayrıca tek başına uygulanan Dosetakselin belli bir süre sonra ilaç rezistansına neden



olduğu bilinmektedir. LDH-A ve Dosetakselin beraber kullanılması Dosetaksele bağlı ilaç direncini önleyebileceği düşündürmektedir.

D vitamini EMT'nin negatif modülatörüdür. VDR reseptörü invazyon baskılayıcı E-kaderin ve tümör baskılayıcı sistatin D gibi çeşitli genlerin indüksiyonunu kontrol eden ve Wnt/ $\beta$ -katenin yolunu antagonize ederek EMT'ye karşı çıkar. Yapılan alışmalarda  $1,25(OH)_2D_3$ 'n TGF $\beta$  tarafından indüklenen EMT'nin aksine etki gösterdiği ve bunu da EMT belirteçlerinin ekspresyonunu inhibe ederek yaptığı anlaşılmaktadır (138).

Upadhyay ve ark.'larının kkk hücreli akciğer kanser hücre hatlarında yaptığı çalışmada,  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini uygulanması ile epitelyal markerlar E-kaderin ekspresyonunda artma ve mezenkimal markerlardan N-kaderin ve ZEB-1 ekspresyonunda azalma görmüşlerdir. Ancak bu azalmanın VDR'nin E-kaderin ve N-kaderin ilişkisi ile ilgili olup VDR artışının E-kaderini arttırdığını ve N-kaderini azalttığını bulmuşlardır (194).

Kolon kanseri ile yapılan başka bir çalışmada ise  $1,25(OH)_2D_3$  vitaminin EMT'ye ters etki ettiği ve Snail ekspresyonunu azalttığını gösterilmiştir (195).

Yine kolon kanser hücre hatları olan SW-480 ve HT-29 ile yapılan bir diğer çalışmada,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini uygulanmıştır. Çalışma sonucunda  $10^{-6}$ M  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini kaderin değişimini inhibe etmiş yani E-kaderinin protein konsantrasyonunu arttırırken, N-kaderin protein konsantrasyonunu azaltmıştır. Bunu yanında yine aynı dozda EMT transkripsiyon faktörlerinden olan Snail ve Slug'ı inhibe ettiği gözlemlenmiştir (196).

Ancak yapılan literatür aramasında PK'inde  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini ve EMT ilişkisini inceleyen bir çalışma bulunamamıştır.

Bizim alışmamızda, PK'inde  $1,25(OH)_2D_3$  vitamininin E-kaderin'in hem protein ekspresyonunu hem de mRNA seviyelerini arttırdığını, N-kaderin'in ise protein ekspresyonu seviyesini düşürür iken mRNA seviyelerini arttırdığı grlmştir. Bu da kaderin değişiminin sağlandığını göstermekte ve  $1,25(OH)_2D_3$  vitamininin etkisi ile hücrenin epitelyal dönüşümünün sağlandığını göstermektedir. Her ne kadar N-kaderin mRNA seviyesinde bir artış görülse de her mRNA protein

sentezi için kullanılmak zorunda değildir. Transkripsiyon faktörlerine bakıldığında ise, Snail, Slug ve Twist protein ekspresyonlarında sayısal olarak bir azalma gösterilse de mRNA seviyelerinde sayısal olarak bir artış görülmüştür. Yine LDH-A inhibitörü + 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini kombinasyon tedavisinde de aynı sonuçlara rastlanmıştır. Verilerden elde edilen bilgilerde PK oluşturulan farelere uygulanan 5 mg/kg'lık 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini dozunun EMT üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Farklı dozlar kullanılarak daha sonra yapılacak çalışmalarla EMT üzerine etkin doz tespit edilebilir.

Hipoksi, genellikle PK gelişiminin en erken evresinde ortaya çıkan, tümör oluşumuyla ilişkili bir mikroçevre değişikliğidir. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar hipoksi / HIF'ün EMT indüklenmesinde ve PK'da metastatik potansiyelin artışında rol oynadığı gösterilmiştir. Hipoksi; PK, over kanseri, akciğer kanseri ve hepatosellüler karsinom gibi çeşitli epitel kanserlerinde EMT sürecinin indükleyicisi olduğu, dolayısıyla tümör hücresinin hayatta kalmasını ve kemo veya radyo terapilere karşı direnç geliştirmesini sağlar (197,198). Hipoksiye bağlı EMT, E-kaderin ve β-katenin gibi epitelyal gen ekspresyonlarında bir azalma ve N-kadherin ve vimentin gibi mezenkimal ilişkili gen ekspresyonunda bir artış ile karakterizedir. Hipoksi ayrıca Smads, SNAIL, SLUG ve TWIST gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edebilir ve E-kaderin ekspresyonunu inhibe edebilir (199).

Tang ve ark.'larının yaptığı çalışmada PC3 ve DU145 PK hücre hatları kullanılmış ve hipoksinin PK'da EMT'yi indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada western blot analizinde hipoksi zamanına bağlı olarak E-kaderin ekspresyonunun azaldığı, vimentin ekspresyonunun arttığı ve HIF-1α konsantrasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (199).

Luo ve ark.'larının yaptığı diğer bir çalışmada ise LNCaP ve PC3 hücre hatlarında HIF-1α'nın aşırı ekspresyonunun in-vivo ve in-vitro ortamda EMT'yi indüklediği gösterilmiştir (200). Ancak hala PK'da hipoksinin neden olduğu EMT ile ilgili mekanizmaların detayı belirsizliğini korumaktadır.

Bizim çalışmamızda, PK'inde tümör dokusunda HIF-1α ekspresyonu incelendiğinde, PK grubuna göre LDH-A inhibitörü + Doseksel tedavi grubunun ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde bir azalma gözlemlendi (p<0,05).

Diğer gruplarda ise Dosetaksel ve LDH-A inhibitörü uygulanan tedavi grubunda artma, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini ve LDH-A inhibitörü+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> uygulanan tedavi grubunda bir azalma gözlemlendi ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.9.3). HIF-1 $\alpha$  mRNA seviyelerine bakıldığında ise LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi grubunun HIF-1 $\alpha$  mRNA seviyeleri PK grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Diğer gruplarda ise PK grubuna göre düşük mRNA seviyelerine sahip olsa da istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.9.3). Bu da çalışmada uygulanan kombine tedavinin hipoksik ortamın normoksik ortama çevirilmesinde etkili olacağı ve EMT'yi MET'e en iyi şekilde değiştirebilecek tedavi olduğunu düşündürmüştür. Çünkü metastazın engellenebilmesi için hipoksik ortamın ve anjiyogenezin engellenmesi gerekmektedir. Kombine tedavi HIF-1 $\alpha$ 'yı hem protein ekspresyonu hem de mRNA düzeyinde azalttığından PK tedavisinde etkili olduğunu düşünülmektedir.

## 8. SONUÇ

Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan PK modelinde değişik tedavilerin apoptoz ve EMT üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde hem Dosetaksel hem de LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavi gruplarında; apoptozun ve oksidatif stresin arttığı, laktat seviyelerinin azaldığı, EMT biyobelirteci olan E-kaderin'in hem protein hem de mRNA seviyelerinde arttığı, N kaderin'in hem protein hem de mRNA seviyelerinde azaldığı ortaya kondu. EMT transkripsiyon faktörleri incelendiğinde ise Snail, Slug, Twist'i hem protein hem de mRNA düzeyinde azalttı. Ayrıca kanserde önemli bir protein olan HIF-1 $\alpha$ 'yı diğer gruplara göre anlamlı şekilde azalttığı görüldü. Dosetaksel grubunda PK grubu ile kıyaslandığında HIF-1 $\alpha$ 'da anlamlı bir fark gözlenmez iken LDH-A inhibitörü + Dosetaksel grubunda hem protein hem de mRNA düzeyinde gözlendi. Dosetaksel'e LDH-A inhibitörünün eklenmesinin apoptoz ile oksidatif stres artışını ve laktat ile HIF-1 $\alpha$  düzeyindeki azalmayı potansiyelize ettiği görüldü. Bu da kombine tedavinin metastazı inhibe etmede daha etkili olduğu ve EMT'nin MET'e dönüşümünü daha etkin şekilde sağladığı görüldü. Bu da LDH-A inhibitörünün Warburg etkisini tersine çevirerek Dosetaksel'in tümör üzerindeki etkinliğini arttırdığını ve kemorezistans oluşumunu engelleyebileceğini düşündürdü. Ayrıca, oksidatif stresin artması ile nefrotoksik olan Dosetaksel'in böbrek üzerindeki hasarı arttırdığı ancak LDH-A inhibitörü + Dosetaksel tedavisinin oksidatif stresi daha fazla arttırması ile böbrek hasarının daha fazla olduğu gözlendi. Ancak Dosetaksel'e göre karaciğer harabiyetini arttırdı.

Sonuç olarak, *in vivo* olarak oluşturulan PK modelinde, literatürde ilk defa LDH-A inhibitörü + Dosetaksel kombine tedavisi uygulandı. LDH-A inhibitörünün Dosetaksel'in kanseri önleyici etkilerini potansiyelize ettiği ortaya kondu. LDH-A inhibitörünün PK kanserini tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceği düşünüldü.

## 9. KAYNAKLAR

1. Khanmi K, Ignacimuthu S, and Paulraj MG. MicroRNA in prostate cancer. *Clinica Chimica Acta*. 451:154-160, 2015.
2. Pavlova NN. and Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab*. 23(1):27-47, 2016.
3. Xian ZY, Liu JM, Chen QK, Chen HZ, Ye CJ, Xue J. et al. Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumor Biol*. 36(10):8093-8100, 2015.
4. El Sisi AE, Sokar SS, Abu-Risha SE. and El-Mohrou, SR. Oxamate potentiates taxol chemotherapeutic efficacy in experimentally-induced solid ehrlich carcinoma (SEC) in mice. *Biomed Pharmacother*. 95:1565-76, 2017.
5. Mabuchi M, Ueda M, Yoshida Y, Horiik, K, Yamaoka K, Nakao S. et al. Systematic trial for evaluating docetaxel in a human prostate cancer cell DU145 xenograft model. *Anticancer Research*. 37:1665-76, 2017.
6. Fidan F, Alkan BM, ve Tosun A. Çağın pandemisi: D vitamini eksikliği ve yetersizliği. *Turk J Osteoporos*. 20:71-74, 2014.
7. Yagüe MLP, Cenzual MAC, Cabanas MJC, Cabria MH, and Yurrita LC. Vitamin D: And its role in breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci*. 34(8):423-27, 2018.
8. Zhang Y and Weinberg R. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med*. 12(4):361-373, 2018.
9. Wilmanski T, Barnard A, Parikh MR, Kirshner J, Burgess J. and Teegarden D.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D inhibits the metaastatic capability of MCF10CA1a and MDA-MB-231 cells in an in vitro model of breast to bone metastasis. *Nutr Cancer*. 68(7):1202-9, 2016.
10. Larriba MJ, Herreros AG. and Munoz A. Vitamin D and the epithelial to mesenchymal transition. *Stem Cell International* 11 pages, 2016.

11. Hotz B, Arnd, M, Bhargava S, Buhr HJ. and Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 13(15):4769-76, 2007.
12. Kalluri R. and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6):1420-8, 2009.
13. Celesti G, Di Caro G, Bianchi P, Grizzi F, Basso G. and Marchesi F. Presence of twist-1 positive neoplastic cells in the stroma of chromosome-unstable colorectal tumors. *Gastroenterology.* 145(3):647-57, 2013.
14. Zhang Q, Liu S, Parajuli KR, Zhang W, Zhang K, Mo Z. et al. Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene.* 36(5):687-699, 2017.
15. Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Sommariva M, Limonta P. and Gagliano N. Epithelial-to-mesenchymal transition markers and CD44 isoforms are differently expressed in 2D and 3D cell cultures of prostate cancer cells. *Cells.* 8(2): pii:E143, 2019.
16. Gonzalez DM. and Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 7(344):re8, 2014.
17. Ciu X G, Han ZT, He SH, Wu XD, Chen TR, Shao CH. et al. HIF1/2 $\alpha$  mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells. *Oncotarget.* 8(15):24840-52, 2017.
18. Qian J, Shen S, Chen W, and Chen N. Propofol Reversed Hypoxia-Induced Docetaxel Resistance in Prostate Cancer Cells by Preventing Epithelial-Mesenchymal Transition by Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor 1  $\alpha$ . *Biomed Res Int.* 2018:4174232, 2018.
19. Wang J, Xia, Q, Chen X, Tong S, Sun J, Lv R, et al. LanCL1 protects prostate cancer cells from oxidative stress via suppression of JNK pathway. *Cell Death Dis.* 9(2):197, 2018.

20. Liu KH, Tsai YT, Chin SY, Lee WR. and Shen SC. Hypoxia stimulates the epithelial-to-mesenchymal in lung cancer cells through accumulation of nuclear  $\beta$ -catenin. *Anticancer Res.* 38(11):6299-6308, 2018.
21. He G, Jiang Y, Zhan, B. and Wu G. The effect of HIF-1 alpha on glucose metabolism, growth and apoptosis of pancreatic cancerous cells. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 23(1):174-180, 2014.
22. Reece KM, Richardson ED, Cook KM, Campbell TJ, Pisle ST, Holly AJ. et al. Epidithiodiketopiperazines (ETPs) exhibit in vitro antiangiogenic and in vivo antitumor activity disrupting the HIF-1 $\alpha$ /p300 complex in a preclinical model of prostate cancer. *Mol Cancer.* 13:91, 2014.
23. Ai Z, Lu Y, Qiu S. and Fan Z. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1 regulated cancer metabolism. *Cancer Lett.* 373(1):36-44, 2016.
24. Majmundar AJ, Wong WJ. and Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 40(2):294-309, 2010.
25. Serganova I, Cohen IJ, Vemuri K, Shindo M, Maeda M, Mane M. et al. LDH-A regulates the tumor microenvironment via HIF-1 signaling and modulates the immune response. *Plos One.* 13(9):e0203965, 2018.
26. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Tieulent JL, and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65(2):87-108, 2015.
27. Torre LA, Siegel RL, Ward E, and Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 25(1):16-27, 2016.
28. Hart NH, Galvoa DA. and Newton RU. Exercise medicine for advanced prostate cancer. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care.* 11(3):247-57, 2017.
29. Song Z, Yao Q, Zhou Z, Ma Z. and Chen G. Circulating vitamin D level and mortality in prostate cancer patients: a dose-response meta analysis. *Endocr Connect.* 7(12):294-303, 2018.

30. Gupta D, Lamersfeld CA, Trukova K. and Lis CG. Vitamin D and prostate cancer risk: a review of the epidemiological literature. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 12:215-226, 2009.
31. Linton KD. and Catto JWF. Prostate cancer. *Renal and Urological Surgery* II. 31(10):516-522, 2013.
32. Winterich JA, Grzywacz JG, Quandt SA, Clark PE, Miller DP, Acuna J et al. Men's knowledge and beliefs about prostate cancer: education, race, and screening status. *Ethn Dis*. 19(2):199-203, 2009.
33. Daniyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S. and Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 15(22):9575-9578, 2014.
34. Sobin LH. The international histological classification of tumours. *Bull World Health Organ*. 59(6):813-819, 1981.
35. Evans AJ. Treatment effects in prostate cancer. *Mod Pathol*, 31(S1):110-121, 2018.
36. Baykara O. Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. 5(3):154-165, 2016.
37. Liu JM, Yu CP, Chuang HC, Wu CT. and Hsu RJ. Androgen deprivation therapy for prostate cancer and the risk of autoimmune diseases. *Prostate Cancer and Prostatic Disease*. 22:475-482, 2019.
38. Maru S, Uchino H, Osawa T, Chiba S, Mouri G, and Sazawa A. Long-term treatment outcomes of intermittent androgen deprivation therapy for relapsed prostate cancer after radical prostatectomy. *Plos One*. 13(5):e0197552, 2018.
39. Winoker JS, Anastos H, and Rastinehad AR. Targeted Ablative Therapies for Prostate Cancer. *Cancer Treat Res*. 175:15-53, 2018.
40. Adjei DA, Mikkilineni N, Sebesta E, and Hyams E. Misinformation on the Internet regarding Ablative Therapies for Prostate Cancer., *Urology*. 133:182-186, 2019.



41. Podder TK, Fredman ET, and Ellis RJ. Advances in Radiotherapy for Prostate Cancer Treatment. *Adv Exp Med Biol.* 1096:31-47, 2018.
42. Nader R, Amm JE, and Ching JBA. Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J Androl.* 20(3):221-229, 2018.
43. Xue YN, Yu BB, Liu YN, Guo R, Li, JL, Zhang LC., et al. Zinc promotes prostate cancer cell chemosensitivity to paclitaxel by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis. *Prostate.* 79(6):647-656, 2019.
44. De Velasco MA, and Uemura H. Prostate cancer immunotherapy: where are we and where are we going?. *Curr Opin Urol.* 28(1):15-24, 2018.
45. Young HH. The early diagnosis and radical cure of carcinoma of the prostate. Being a study of 40 cases and presentation of a radical operation which was carried out in four cases. *J Urol.* 167(2 Pt 2):939-946, 2002.
46. Walsh PC, and Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol.* 197(2S):165-170, 2017.
47. Sebesta EM, and Anderson CB. The Surgical Management of Prostate Cancer. *Semin Oncol.* 44(5):347-357, 2017.
48. Yu T, Wang Y, Fan Y, Fang N, Wang T, Xu ., et al. CircRNAs in cancer metabolism: a review. *Hematol Oncol.* 12(1):90, 2019.
49. Martinez-Outschoorn UE, Pages MP, Pestell RG, Sotgia F, and Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* 14(1):11-31, 2017.
50. Otto AM. Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab.* 4:5, 2016.
51. Luengo A, Gui DY, and Heide, MG. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol.* 24(9):1161-1180, 2017.
52. Zhang W, Zhang SL, Hu X, and Tam KY. Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *Int J Biol Sci.* 11(12):1390-1400, 2015.

53. Almuhaideb A, Papathanasiou N, and Bomanji J. 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. *Ann Saudi Med.* 31(1):3-13, 2011.
54. Patan S, Tanda S, Roberge S, Jones RC, Jain RK, and Munn LL. Vascular Morphogenesis and Remodeling in a Human Tumor Xenograft. *Circ Res.* 89(8):732-739, 2009.
55. Gilles RJ, and Gatenby RA. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 26(2), 311-317, 2007.
56. Andany MA, Ojen ML, Calderon RF, Rodriguez EA, Garcia CD, Altesor MV, et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion.* 17:76-100, 2014.
57. Hirschhaeuser F, Sattler UGA, and Klieser WM. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* 71(22):6921-6925, 2011.
58. Brizel DM, Scroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW., et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int Radiat Oncol Biol Phys.* 51(2):349-353, 2001.
59. Hanahan D, and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70, 2001.
60. Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-674, 2011.
61. Millan IS and Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis.* 38(2):119-133, 2017.
62. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, and Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life.* 65(11):904-910, 2013.
63. Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, and Pilkington GJ. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathol.* 26(1):3-17, 2016.

64. Zdravlevic M, Marchiq I, Padua MMC, Parks SK, and Pouyssegur J. Metabolic Plasticity in Cancers-Distinct Role of Glycolytic Enzymes GPI, LDHs or Membrane Transporters MCTs. *Front Oncol.* 7:313, 2017.
65. Dzoyem JP, Kuete V, and Eloff JN. Biochemical Parameters in Toxicological Studies in Africa: Significance, Principle of Methods, Data Interpretation, and Use in Plant Screenings. *Toxicology Survey of African Medicinal Plants.* 2014:659-715, 2014.
66. Doherty JR, and Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest.* 123(9):3685-3692, 2013.
67. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life.* 64(1):1-9, 2012.
68. Shankaran V, Obel J, and Benson AB. Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions. *Oncologist.* 15(2):157-67, 2010.
69. Pandurangan AK. Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(4):2201-2205, 2013.
70. Gallo M, Sapio L, Spina A, Naviglio D, Calogero A, and Naviglio S. Lactic dehydrogenase and cancer: an overview. *Front Biosci.* 20:1234-1249, 2015.
71. Fantin VR, Pierre JS, and Ledo, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenanc. *Cancer Cell.* 9(6):425-434, 2006.
72. Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, and Han Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med.* 7(12):6124-6136, 2018.
73. Arora R, Schmitt D, Karanam B, Tan M, Yates C, and Colom, WD. Inhibition of the Warburg effect with a natural compound reveals a novel measurement for determining the metastatic potential of breast cancers. *Oncotarget.* 6(2):666-678, 2015.

74. Fiume L, Manerba M, Vetterin, M, and Di Stefano G. Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future Med Chem.* 6(4):429-445, 2014.
75. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 43(6):582-592, 2019.
76. Mizushima N, Levine B, Cuervo A, and Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451(7128):1069-1075 2009.
77. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516, 2007.
78. Elliot MR, and Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol.* 189(7):1059-1070, 2010.
79. Ghali M A, and Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci.* 22(6):760-772, 2015.
80. Qiao L, and Wong BCY. Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 12(3):55-64, 2009.
81. Cory S, and Adam, JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2(9):647-656, 2002.
82. Kiraz Y, Adan A, Yandım MK, and Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol.* 37(7):8471-8486, 2016.
83. Mitsiogianni M, Koutsidis G, Mavroudis N, Trafalis DT, Botaitis S, Franco, R, et al. The Role of Isothiocyanates as Cancer Chemo-Preventive, Chemo-Therapeutic and Anti-Melanoma Agents. *Antioxidants (Basel).* 8(4):106, 2019.
84. Altunkaynak BZ ve Özgen E. Programlanmış hücre ölümü: apopitoz nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 6(2):93-104, 2008.
85. Tsuji T, Ibaragi S, and Hu G. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res.* 69(18):7135-7139, 2009.

86. Yang L, Wu L, Zhang X, Hu Y, Fan Y. and Ma J.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$  attenuates high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in human peritoneal mesothelial cells via the  $\text{TGF}\beta/\text{Smad3}$  pathway. *Mol Med Rep.* 15(4):2273-79, 2017.
87. Bahrami A, Majeed M, and Sahebkar A. Curcumin: a potent agent to reverse epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Oncol (Dordr).* 42(4):405-421, 2019.
88. Micalizzi DS, Farahbaugh SM, and Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 15(2):1178-134, 2010.
89. Wilmanski T, Barnard A, Parikh MR, Kirshner J, Burgess J. and Teegarden D.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D inhibits the metaastatic capability of MCF10CA1a and MDA-MB-231 cells in an in vitro model of breast to bone metastasis. *Nutr Cancer.* 68(7):1202-9, 2016.
90. Dongre A, and Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(2):69-84, 2019.
91. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, and Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 172(7):973-98, 2006.
92. Roy FV. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer.* 14(2):121-134, 2014.
93. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, and Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC.* 18(1):939, 2018.
94. Gheldof A, and Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 116:317-336, 2013.
95. Loh C Y, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells.* 8(10):1118, 2019.

96. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, and Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 392(6672):190-193, 1998.
97. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, and Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*. 1014:155-163, 2004.
98. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, and Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res*. 358(1):78-85, 2017.
99. Craene BD, and Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. 13(2):97-110, 2013.
100. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem*. 164(4):257-264, 2018.
101. Diaz VM, and Herreros AG. F-box proteins: Keeping the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in check. *Semin Cancer Biol*. 36:71-79, 2016.
102. Garg M. Epithelial-mesenchymal transition activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*. 5(4):188-195, 2013.
103. Tania M, Khan A, and Fu J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumour Biol*. 35(8):7335-7342, 2014.
104. Gimeno AB, and Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 132(14):3151-3161, 2005.
105. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, and Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 13(9):963-972, 2013.
106. Gheldof A, Hulpiau P, Roy FV, Craene BD, and Brex G. Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cell Mol Life Sci*. 69(15):2527-2541, 2012.
107. GeneTex, Epithelial–mesenchymal transition (EMT) Pathway. 10 Nisan 2021 tarihinde erişildi.  
[https://www.genetex.com/MarketingMaterial/Index/EMT\\_pathway](https://www.genetex.com/MarketingMaterial/Index/EMT_pathway)

108. Marah VO, Hawsawi O, Henderson V, and Sweeney J. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 1095:101-110, 2018.
109. Liu YN, Liu Y, Lee H J, Hsu YH, and Chen JH. Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. *Mol Cell Biol.* 28(23):7096-7108, 2008.
110. Smith BN, and Marah VO. The role of Snail in prostate cancer. *Cell Adh Migr.* 6(5):433-441, 2012.
111. Nakazawa M, and Kyprianou N. Epithelial-mesenchymal-transition regulators in prostate cancer: Androgens and beyond. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 166:84-90, 2017.
112. Wikström P, Stattin P, Lissbrant IF, Damber JE, and Bergh A. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate.* 37(1):19-29, 1998.
113. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19(1):128-139, 2009.
114. Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell.* 17(4):319-332, 2010.
115. Cho HJ, Baek KE, Saika S, Jeong MJ, and Yoo J. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 353(2):337-43, 2007.
116. Heebol S, Borre M, Ottosen PD, Dyrskjot L, Orntoft TF, and Torring N. Snail1 is over-expressed in prostate cancer. *APMIS.* 117(3):196-204, 2009.
117. Graham TR, Zhou HE, Marah VO, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, et al. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 68(7):2479-2488, 2008.

118. Ciu XG, Han ZT, He SH, Wu XD, Chen TR, Shao CH. et al. HIF1/2 $\alpha$  mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells. *Oncotarget*. 8(15):24840-52, 2017.
119. Qian J, Shen S, Chen W. and Chen N. Propofol reversed hypoxia induced docetaxel resistance in prostate cancer cells by preventing epithelial-mesenchymal transition by inhibiting hypoxia inducible factor 1  $\alpha$ . *Bio Med Research Inter*. 2018:9 pages, 2018.
120. Liu KH, Tsai YT, Chin SY, Lee WR. and Shen SC. Hypoxia stimulates the epithelial-to-mesenchymal in lung cancer cells through accumulation of nuclear  $\beta$ -catenin. *Anticancer Res*. 38(11):6299-6308, 2018.
121. Ai Z, Lu Y, Qiu S. and Fan Z. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1 regulated cancer metabolism. *Cancer Lett*. 373(1):36-44, 2016.
122. Majmundar AJ, Wong WJ. and Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 40(2):294-309, 2010.
123. Chiang C M, Ismaeel A, Griffis RB, and Weems S. Effects of Vitamin D Supplementation on Muscle Strength in Athletes: A Systematic Review. *J Strength Cond Res*. 31(2):566-574, 2017.
124. Jones G. Extrarenal vitamin D activation and interactions between vitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub>, and vitamin D analogs. *Annu Rev Nutr*. 33:23-44, 2013.
125. Bizzora G, Antico A, Fortunato A, and Bizzaro N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit?. *Isr Med Assoc J*. 19(7):438-443, 2017.
126. Grant WB, Garland CF. The association of solar ultraviolet B with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res*. 26:2687-2699, 2006.
127. Hutchinson MS, Grimnes G, Joakimsen RM, Fingenschau Y, Jorde, R. Low serum 25 hydroxyvitamin D levels are associated with increased all cause



- mortality risk in a general population: the Tromso study. *Eur.J.Endocrinol.* 162:935-942, 2010.
128. Weinstien SJ, Mondul AM, Kopp W, Rager H, Virtamo J. Circulating 25-hydroxyvitamin D, vitamin D-binding protein and risk of prostate cancer. *Albanes D. Int. J. Cancer.* 132:2940-2947, 2013.
129. Corder EH, Guess HA, Hulka BS, Friedman GD, Sadler M, Vollmer RT, Labough B, Drezner MK, Vogelman JH, Orentlich N. Vitamin D and prostate cancer: a prediagnostic study with stored sera. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2(5):467-472, 1993.
130. Ahohen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Touhimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25 hydroxyvitamin D levels(Finland). *Cancer Causes Control.* 11(9):847-852, 2000.
131. Li H, Stampfer MJ, Hollis JB, Mucci LA, Gaziano JM, Hunter D, Giovannucci EL, Ma J. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer. *PLoS Med.* 4(3):e103, 2007.
132. Gann PH, Ma J, Hennekens CH, Hollis BH, Haddah JD, Stampfer MJ. Circulating vitamin D metabolites in relation to subsequent development of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5(2):121-126, 1996.
133. Donkena KV, Young CYF. Vitamin D, sunlight and prostate cancer risk. *SAGE-Hindawi Access to Research Advances in Preventive Medicine.* 2011:281863, 2011.
134. Vuolo L, Somma CD, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Frontiers in Endocrinology.* 3:58, 2012.
135. Jeon SM, and Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med.* 50(4):20, 2018.
136. Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med.* 369(21):1991-2000, 2013.

137. Trump DL, and Ching JBA. Vitamin D in prostate cancer. *Asian J Androl.* 20(3):244-252, 2018.
138. Ricca C, Aillon A, Viano M, Bergandi L, Aldieri E, and Silvagno F. Vitamin D inhibits the epithelial-mesenchymal transition by a negative feedback regulation of TGF- $\beta$  activity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 187:97-105, 2019.
139. Li Z, Guo J, Xie K, Zheng S. Vitamin D receptor signaling and pancreatic cancer cell EMT. *Curr Pharm Des.* 21(10):1262-1267, 2015.
140. Sergeev IN. Calcium as a mediator of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90(1-5):419-425, 2004.
141. Tordjmann T. Calcium signaling. *Signaling Pathways in Liver Diseases.* Springer Berlin Heidelberg. 2010:455-464, 2010.
142. Sergeev IN. Calcium signaling in cancer and vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97(1-2):145-151, 2005.
143. Sergeev IN. Vitamin D mediated apoptosis in cancer and obesity. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 20(2):43-49, 2014.
144. Sergeev IN. Regulation of apoptosis in adipocytes and breast cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: a link between obesity and breast cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 14(3):99-106, 2013.
145. Foster BA, Gingrich JR, Know ED, Madias C, Green NM. Characterization of prostatic epithelial cell lines derived from transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.* 57(16):3325-30, 1997.
146. Dogan A, Demirci S, Turkmen NB, Caglayan AB, Aydin S, Telci D et al. Schiff Base-Poloxamer P85 Combination Prevents Prostate Cancer Progression in C57/B16 Mice. *Prostate.* 76(15):1454-63, 2016.
147. Cakici C, Yigitbasi T, Ayla S, Karimkhani H, Bayramoglu F, Yigit P. et al. Dose dependent effect of vitamin 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on oxidative stress and apoptosis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 29(3):271-279, 2018.

148. Ye W, Zheng Y, Zhang S, Yan L, Cheng H. and Wu M. Oxamate improves glycemic control and insulin sensitivity via inhibition of tissue lactate production in db/db mice. *Plos One*. 11(3):e0150303, 2016.
149. Yaromina A, Meyer S, Fabian C, Zaleska K, Satter UG, Kunz-Schughart LA. et al. Effects of three modifiers of glycolysis on ATP, lactate, hypoxia, and growth in human tumor cancer cell lines in vivo. *Strehlenthler Onkol*. 188(5):431-7, 2012.
150. Tao H, Tang X, Jin L, Zhao Y, Luo Y, Zhang Z. et al. Synergistic effect of docetaxel combined with cisplatin on inhibiting human osteosarcoma in nude mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 505(2):372-7, 2018.
151. Souli E, Machluf M, Morgenstern A, Sabo E. and Yannai S. Indole-3-carbinol exhibits inhibitory and preventive effects on prostate tumors in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 46:863-70, 2008.
152. Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Horst R, Arbertelli MA. and Feldman D. Dietary vitamin D<sub>3</sub> and 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (calcitriol) Exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer. *Endocrinology*. 153(6):2576-87, 2012.
153. Erel Ö. A novel automated direct measurement method for total antioksidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 37:277-285, 2004.
154. Erel Ö. A novel automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 38:1103-1111, 2005.
155. Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Tapuria N, Seifaliam AM et al. Effect of remote ischemic preconditioning on liver ischemia/reperfusion injury using a new mouse model. *Liver Transpl*. 17(1):70-82, 2011.
156. Raj L, Azar S, Keane W. Mesangial immun injury hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int*. 26(2):134-47, 1984.
157. Rebbeck TR. Prostate cancer genetics: variation by race, ethnicity, and geography. *Semin Radiat Oncol*. 27(1):3-10, 2017.

158. Assi T, Rassy E, Farhat F, Kattan C and Kattan J. Docetaxel rechallenge in patients with metastatic prostate cancer: a comprehensive review. *Oncol Res Treat.* 43(6):299-306, 2020.
159. Shi Q, Zhu Y, Ma J, Chang K, Ding D, Bai Y et al. Prostate cancer-associated spop mutations enhance cancer cell survival and docetaxel resistance by upregulating caprin1-dependent stress granule assembly. *Mol Cancer.* 18(1):170, 2019.
160. Shen Z, Zhou L, Zhang C and Xu J. Reduction of circular RNA Foxo3 promotes prostate cancer progression and chemoresistance to docetaxel. *Cancer Lett.* 468:88-101, 2020.
161. Xu F, Wang Z, and Cao X. Sinomenine inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis of prostate cancer cells by regulation of miR-23a. *Biomed Pharmacother.* 112:108592, 2019.
162. Yang C, Zhang W, Wang J, Chen P, and Jin J. Effect of docetaxel on the regulation of proliferation and apoptosis of human prostate cancer cells. *Moleculer Medicine Reports.* 19(5):3864-3870, 2019.
163. Xiao P, Ma T, Zhou C, Xu Y, Liu Y, Zhang H. Anticancer effect of docetaxel induces apoptosis of prostate cancer via the cofilin-1 and paxillin signaling pathway. *Mol Med Rep.* 13(5):4079-84, 2016.
164. Wenner CA, Martzen MR, Lu H, Wang H, and Slaton JW. Polysaccharide-K augments docetaxel-induced tumor suppression and antitumor immune response in an immunocompetent murine model of human prostate cancer. *Int J Oncol.* 40(4):905-913, 2012.
165. Guzey M, Kitada S, and Reed JC. Apoptosis induction by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 1(9):667-677, 2002.
166. Zheng Y, Trivedi T, Lin RC, Yee CF, Nolte R, Manibo J, et al. Loss of the vitamin D receptor in human breast and prostate cancers strongly induces cell apoptosis through downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Bone Res.* 5:17023, 2017.

167. Hao J, Graham P, Chang L, Ni J, Wasinger V, Beretov J., et al. Proteomic identification of the lactate dehydrogenase A in a radioresistant prostate cancer xenograft mouse model for improving radiotherapy. *Oncotarget*. 7(45):74269-74285, 2016.
168. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE., et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(5):2037-42, 2010.
169. Muramatsu H, Sumitomo M, Morinaga S, Kajikawa K, Kobayashi I, Nishikawa G, et al. Targeting lactate dehydrogenase-A promotes docetaxel-induced cytotoxicity predominantly in castration-resistant prostate cancer cells. *Oncol Rep*. 42(1):224-230, 2019.
170. Eichenlaub T, Villadsen R, Freitas FCP, Andrejeva D, Aldana BI, Nguyen HT, et al. Warburg Effect Metabolism Drives Neoplasia in a Drosophila Genetic Model of Epithelial Cancer. *Curr Biol*. 28(20):3220-3228, 2018.
171. Guo Y, Li X, Sun X, Wang J, Yang, Zhou X, et al. Combined Aberrant Expression of NDRG2 and LDHA Predicts Hepatocellular Carcinoma Prognosis and Mediates the Anti-tumor Effect of Gemcitabine. *Int J Biol Sci*. 15(9):1771-1786, 2019.
172. Yamada Y, Nakamura K, Aoki S, Tobiume M, Zennami K, Kato Y, et al. Lactate dehydrogenase, Gleason score and HER-2 overexpression are significant prognostic factors for M1b prostate cancer. *Oncol Rep*. 25(4):937-944, 2011.
173. Nunes AP, Sousa SS, Pinheiro C, Goncalves VM, Granja S, and Baltazar F. Targeting lactate production and efflux in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 1866(11):165894, 2020.
174. Hiew K, Hart CA, Ali A, Elliot T, Ramani V, Sangar V, et al. Primary Mutational Landscape Linked with Pre-Docetaxel Lactate Dehydrogenase Levels Predicts Docetaxel Response in Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol Focus*. 5(5):831-841, 2019.

175. Zheng N, Zhou Y, Zhang S, Singh Y, Shi B, Salker MS, et al.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Sensitive Cytosolic pH Regulation and Glycolytic Flux in Human Endometrial Ishikawa Cells. *Cell Physiol Biochem*. 41(2):678-688, 2017.
176. Amar SAA, Eryilmaz R, Demir H, Aykan S, and Demir C. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Aging Male*. 22(3):198-206, 2019.
177. Polytaichou C, Hatziapostolou M, and Papadimitriou E. Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affinity regulatory peptide gene. *J Biol Chem*. 280(49):40428-20235, 2005.
178. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, and Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*. 68(6):1777-17785, 2008.
179. Baş E, and Naziroğlu M. Selenium attenuates docetaxel-induced apoptosis and mitochondrial oxidative stress in kidney cells. *Anticancer Drugs*. 30(4):339-346, 2019.
180. Yardım A, Kucukler S, Özdemir S, Çomaklı S, Caglayan C, Kandemir FM, and Çelik H. Silymarin alleviates docetaxel-induced central and peripheral neurotoxicity by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Gene*. 769:145239, 2021.
181. Ekanem TI, Huang CC, Wu MH, Lin DY, Lai WF, and Lee KH. Glycidamide promotes the growth and migratory ability of prostate cancer cells by changing the protein expression of cell cycle regulators and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-associated proteins with prognostic relevance. *Int J Mol Sci*. 20(9):2199, 2019.
182. Shen W, Pang H, Liu J, Zhang F, Liu L, Ma N, et al. c. Epithelial-mesenchymal transition contributes to docetaxel resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncol Res*. 22(1):47-55, 2014.

183. Artibani M, Sims AH, Slight J, Atiken A, Thornburn A, Muir M, et al. WT1 expression in breast cancer disrupts the epithelial/mesenchymal balance of tumour cells and correlates with the metabolic response to docetaxel. *Sci Rep.* 7:45255, 2017.
184. Duran GE, Wang YC, Moisan F, Francisco EB, and Sikic BI. Decreased levels of baseline and drug-induced tubulin polymerisation are hallmarks of resistance to taxanes in ovarian cancer cells and are associated with epithelial-to-mesenchymal transition. *Br J Cancer.* 116(10):1318-1328, 2017.
185. Chen B, Zhang Y, Li C, Xu P, Gao Y, and Xu Y. CNTN-1 promotes docetaxel resistance and epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K/Akt signaling pathway in prostate cancer. *Arch Med Sci* 17(1):152-165, 2020.
186. Jiang F, Ma S, Xue Y, Hou J, and Zhang Y. LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 469(4):985-992, 2016.
187. Thonsri U, Seubwai W, Waraasawapati S, Sawanyawisuth K, Vaeteewoottacharn K, Boonmars T, et al. Overexpression of lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma is correlated with poor prognosis. *Histol Histopathol.* 32(5):503-510, 2017.
188. Huang X, Li X, Xie X, Ye F, Chen B, and Song C. High expressions of LDHA and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer. *Breast.* 30:39-46, 2016.
189. Chua YL, Dufour E, Dassa E, Rustin P, Jacobs HT, Taylor CT, et al. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 285(41):31277-31284, 2010.
190. Tsui KH, Chung LC, Wang SW, Feng TH, Chang PL, and Juang HH. Hypoxia upregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in prostate carcinoma cells. *J Mol Endocrinol.* 51(1):131-41, 2013.

191. Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J.* 405(1):1-9, 2007.
192. Sheng SL, Liu JJ, Dai YH, Sun XG, Xiong XP, and Huang G. Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* 279(20):3898-3910, 2012.
193. Hou XM, Yuan SQ, Zhao D, Liu XJ, and Wu XA. LDH-A promotes malignant behavior via activation of epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. *Biosci Rep.* 39(1):BSR20181476, 2019.
194. Upadhyay SK, Verone A, Shomaker S, Qin M, Liu S, Campbell M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) Signaling Capacity and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Implications for Use of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in NSCLC Treatment. *Cancers.* 5(4):1504-1521, 2013.
195. Pereira F, Barbachano A, Singh P, Campbell MJ, Munoz A, and Larriba, MJ. Vitamin D has wide regulatory effects on histone demethylase genes. *Cell Cycle.* 11(6):1081-1089, 2012.
196. Chen S, Zhu J, Zuo S, Ma J, Zhang J, Chen G, et al. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> attenuates TGF- $\beta$ 1/ $\beta$ 2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 468(1-2):130-135, 2015.
197. Khan MI, Hamid A, Adhami VM, Lall RK, and Mukhtar H. Role of epithelial mesenchymal transition in prostate tumorigenesis. *Curr Pharma Des.* 21(10):1240-1248, 2015.
198. Hay ED. Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation. *Cell Differ Dev.* 32(3):367-375, 1990.
199. Tang C, Liu T, Wang K, Wan, X, Xu S, He D, et al. Transcriptional regulation of FoxM1 by HIF-1 $\alpha$  mediates hypoxia-induced EMT in prostate cancer. *Oncol Rep.* 42(4):1307-1318, 2019.



200. Luo Y, He D, Ning L, Shen S, Li L, Li X. Over-expression of Hypoxia-inducible factor 1alpha increases invasive potency of LNCaP cells in vitro. *Zhonghua Yie Xue Za Zhi*. 86(32):2285-2288, 2006.



## 10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.1507  
Konu : Etik Kurulu Kararı

14/01/2019

**Sayın Çağrı ÇAKICI**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Deneysel Prostat Kanserinde Tümör Metabolizmasının Laktat Dehidrojenaz İlişkili Değişiminin Apoptoz ve Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT) Üzerindeki Rolü" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 14.01.2019 tarihinde e-imzalanmıştır.  
Evrakınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 49B54CAFXA koda ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacak Mah. Ekinçiler Cad. No.19 Kavacak Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hac)

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	P
11/01/2019	05		

"Deneysel Prostat Kanserinde Tümör Metabolizmasının Lak Değişiminin Apoptoz ve Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT) bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışma olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay**

GÖREVİ	ADI SOYADI
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR
Üye	Özge Şeyda DURGUT
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE