

PC-3 İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinde Fenforminin Hücre Canlılığı ve FGFR2 Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Effects of Fenformin On Cell Viability and FGFR2 Expression in PC-3 Human Prostate Cancer Cell Line

Dilan ÇETİNAVCI¹, Melike ÖZGÜL ÖNAL², Gürkan YİĞİTTÜRK², Volkan YAŞAR², Hülya ELBE², Feral ÖZTÜRK²

¹Muğla Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Histoloji ve Embriyoloji, Muğla
²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Muğla

Öz

Prostat kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık nedenidir. Kemoterapötiklere direnç gelişmesi nedeniyle prostat kanserini tedavi etmek için yeni ilaçlara ihtiyaç vardır. Fenformin biguanid grubu antidiyabetik bir ilaçtır ve antikanserijen etkileri de vardır. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2), hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyen bir membran reseptörüdür. Çalışmamızda; PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde fenforminin FGFR2 üzerinden etkilerinin araştırılması amaçlandı. Deney grupları; kontrol grubu, 1 mM, 2 mM, 5 mM ve 10 mM fenformin uygulanan gruplar idi. Fenformin uygulamalarından 24 saat sonra WST-1 hücre canlılığı analizi yapıldı, ayrıca FGFR2 için immunositokimyasal boyamadan sonra H-Skoru hesaplandı. İstatistiksel analizler için SPSS programı kullanıldı. WST-1 analizi sonuçlarına göre; kontrol grubu ile 5 mM fenformin grubu, kontrol grubu ile 10 mM fenformin grubu ve 1 mM fenformin grubu ile 10 mM fenformin grubu karşılaştırıldığında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edildi ($p < 0.05$, hepsi için). H-Skoru sonuçlarına göre; kontrol grubu ve 5 mM fenformin grubu, kontrol grubu ile 10 mM fenformin grubu, 1 mM fenformin grubu ile 5 mM fenformin grubu ve 1 mM fenformin grubu ile 10 mM fenformin grubu arasındaki FGFR2 ekspresyonunun azalması istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$, hepsi için). Çalışmamızda fenformin, doza bağlı olarak PC-3 insan prostat kanseri hücreleri üzerinde FGFR2 ekspresyonunu azaltıcı ve hücre proliferasyonunu inhibe edici etkiler göstermiştir. En etkili dozun 10 mM fenformin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenformin, FGFR2, PC-3, Prostat Kanseri

Abstract

Prostate cancer is the second most common cause of cancer-related death in men. New drugs are needed to treat prostate cancer due to the development of resistance to chemotherapeutics. Although phenformin is a biguanide antidiabetic drug, it also has anticarcinogenic effects. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is a membrane receptor that promotes cell proliferation and differentiation. Our study; was aimed to investigate the effects of phenformin on FGFR2 in PC-3 human prostate cancer cells. Experimental groups; control groups were administered 1 mM, 2 mM, 5 mM, and 10 mM phenformin. WST-1 cell viability analysis was performed 24 hours after phenformin administration, and H-Score was calculated after immunocytochemical staining for FGFR2. The SPSS program was used for statistical analysis. According to the WST-1 analysis; when the control group and the 5 mM phenformin group, the control group with the 10 mM phenformin group, and the 1 mM phenformin group with the 10 mM phenformin group were compared, a statistically significant decrease in cell viability was detected ($p < 0.05$, for all). According to the H-Score results; The decrease in FGFR2 expression between control group and 5 mM phenformin group, control group and 10 mM phenformin group, 1 mM phenformin group and 5 mM phenformin group, and 1 mM phenformin group and 10 mM phenformin group was statistically significant ($p < 0.05$, for all). Our study showed that phenformin has dose dependent effect in reducing FGFR2 expression from PC-3 human prostate cancer cells and inhibiting cell proliferation, and 10 mM phenformin was the most effective dose.

Keywords: Phenformin, FGFR2, PC-3, Prostate Cancer

Giriş

Prostat kanseri, erkeklerde en sık görülen ikinci kanser tipidir ve dünyada kanser nedeni ölümlerde beşinci sıradadır (1). Kanser tedavisinde kemoterapötik ajanlar kullanılmakla birlikte çoğu durumda hastalarda ilaca karşı direnç gelişir (2). Bu sebeple prostat kanseri tedavisi için kullanılabilecek yeni ilaçların bulunmasına ihtiyaç vardır. PC-3,

kemiğe metastaz yapan prostat adenokarsinomundan elde edilmiş ve diğer prostat kanseri hücre hatlarından farklı olarak yüksek agresif davranış gösteren prostat kanseri hücre hattıdır (3). *In vitro* ve *in vivo* prostat kanseri çalışmalarında bilimsel araştırmalara katkı sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Fenformin biguanid grubu antidiyabetik ve oral hipoglisemik bir ajandır. Biguanidlerden metformin ve fenformin, Orta çağ Avrupa'sında bitkisel bir ilaç olarak kullanılan *Galega officinalis* bitkisinden elde edilir (4). Fenformin 1957 yılında keşfedilmiş olup, 1958 yılında klinik çalışmalara başlanmıştır (5). Fenformin ve metformin gibi biguanidler yaygın olarak tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (6). Diyabet hastalarından metformin ile tedavi edilenlerde, kullanılan diğer ilaçlara oranla diyabet ile ilişkili kanser riskinin %31 oranında düştüğü gözlemlenmiştir (7). Biguanidlerin antikanserijen aktivite de olduğu, bazı hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmalarında bildirilmiştir (8). Literatürde fenformin ve kanser arasındaki ilişkisi

	ORCID No
Dilan ÇETİNAVCI	0000-0002-4148-7711
Melike ÖZGÜL ÖNAL	0000-0001-6710-5729
Gürkan YİĞİTTÜRK	0000-0002-5315-253X
Volkan YAŞAR	0000-0003-3497-1238
Hülya ELBE	0000-0002-1254-0683
Feral ÖZTÜRK	0000-0003-1207-5213

Başvuru Tarihi / Received: 17.11.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 27.02.2023

Adres / Correspondence : Dilan ÇETİNAVCI
Muğla Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Histoloji ve Embriyoloji,
Muğla
e-posta / e-mail : drdilancetinavci@hotmail.com

inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada; fenforminin kanser hücrelerine karşı metformine göre daha agresif davrandığı bildirilmiştir (9). Fenforminin AMP ile aktive protein kinaz (AMPK) yolu ve mTOR düzenleyici kompleksin blokörü olarak antikanserojen etkisi olduğu düşünülmektedir (10). Fenforminin rektum, over, meme, mesane ve tiroid gibi çeşitli kanser tiplerinde antikanserojen etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (11-15).

Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2), CD332 olarak da adlandırılan ve 10. kromozom üzerinde bulunan FGFR2 geni tarafından kodlanan bir proteindir (16). FGFR2 hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenleyen bir membran reseptörüdür (17). Preklinik veriler, tümör lenfanjiyogenezi ve metastatik yayılım için FGFR2 sinyalinin gerekli olduğunu göstermektedir (18). Epigenetik modifikasyonların birikmesi ve genetik değişiklikler nedeniyle FGFR2 sinyal yolunun düzensizliğinin meme, prostat, mide, deri gibi çeşitli kanserlerin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (19).

Çalışmamızda; PC-3 insan prostat kanseri hücreleri üzerine farklı dozlarda uygulanan fenforminin antiproliferatif etkilerini, FGFR2 ekspresyonu üzerinden araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, fenformin uygulamasının doza bağlı etkisini ölçmek için PC-3 insan prostat kanseri hücre hattı (ATCC® CRL-1435™) (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, ABD) kullanıldı. Çalışma Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi.

PC-3 prostat kanseri hücreleri %1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin ve %1 amfoterisin B içeren RPMI 1640 besiyeri içerisinde ve 37°C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan nemli inkübatörde çoğaltıldı. Hücrelerin besiyerleri iki günde bir değiştirildi. Çoğaltılan PC-3 prostat kanseri hücreleri 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra deney grupları oluşturuldu.

Fenformin (Sigma-Aldrich-P7045) çözeltisinin hazırlanması aşamasında çözücü olarak steril saf su kullanıldı ve deney sırasında istenilen dozlarda dilüe edildi. Kontrol grubuna herhangi bir madde uygulaması yapılmadı. Fenformin dozları 1 mM, 2 mM, 5 mM ve 10 mM olarak hazırlandı. Analizler fenformin uygulamalarının 24. saatinde gerçekleştirildi. Çalışma grupları; Grup 1: PC-3 insan prostat kanseri hücreleri (kontrol grubu), Grup 2: PC-3 insan prostat kanseri hücreleri + 1 mM fenformin uygulaması, Grup 3: PC-3 insan prostat kanseri hücreleri + 2 mM fenformin uygulaması, Grup 4: PC-3 insan prostat kanseri hücreleri + 5 mM

fenformin uygulaması ve Grup 5: PC-3 insan prostat kanseri hücreleri + 10 mM fenformin uygulaması yapılan grup olacak şekilde oluşturuldu.

WST-1 hücre canlılığı analizi

Kültür kaplarına ekilen ve artan dozlarda fenformin uygulanan PC-3 prostat kanseri hücrelerinin 24. saatte WST ölçümleri gerçekleştirilmesi için, süre sonunda her kuyucuğa WST (Water-soluble tetrazolium salt) solüsyonundan 10 µl koyarak inkübatörde (37°C, %5 CO₂) 2 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası mikropilaka okuyucuda 450 nm absorban ölçümü yapıldı. Deneyler en az üç tekrar olacak şekilde yapıldı. Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorban değerleri %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Kontrole göre uygulama gruplarına ait absorban değerleri yüzde (%) cinsinden oranlanarak proliferasyon belirlendi. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılık grafiği oluşturuldu (20).

İmmünohistokimyasal (ICC) boyama yöntemi

Yirmi dört kuyucuklu kültür kabına 12 mm çapında steril yuvarlak lameller yerleştirildi. Çoğaltılan PC-3 prostat kanseri hücreleri 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde yuvarlak lameller üzerine ekildi ve hücrelerin yapışması için bir gece hücreler inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa artan dozlarda fenformin içeren besiyerleri uygulandı. 24. saat sonunda kültür besiyeri uzaklaştırıldı ve steril PBS ile yıkanarak %4' lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 30 dakika fikse edildi. Fiksasyondan sonra 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) oda ısısında 5 dk uygulandıktan sonra, 3 defa PBS ile tekrar yıkama yapıldı. Permeabilizasyon için %0.1'lik Triton-X 100 ile +4°C' de 15 dakika inkübe edildikten sonra 3 defa PBS ile tekrar yıkama yapıldı. 1 saat blokama işleminden sonra yıkama yapmadan, firmanın önerdiği dilüsyonlarda anti-FGFR2 (Elabscience Biotechnology Inc, Catalog No: E-AB-30646, Lot: DK4930) primer antikorunu ile +4°C' de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikorlar biotin (30 dakika) ve ardından streptavidin (30 dakika) uygulandı. İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra 3 defa PBS ile yıkamalar yapıldı. Diaminobenzidine (DAB) kromojeni 3-6 dakika uygulanarak immünoaktivitelerin görünürlüğü sağlandı. Daha sonra hücreler distile su ile en az 3 kez yıkanan hücreler Mayer' in hematoksileni ile 1 dakika zıt boyama yapıldıktan sonra distile su ile tekrar 3 kez yıkandı. Yıkanan lameller kültür kabından alınıp aköz kapatma maddesi ile kapatıldı. İmmünoaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile kontrol boyamaları yapıldı. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar ve her grup 3 örnek olacak şekilde çalışıldı.

ICC boyamanın değerlendirilmesi: İmmün boyama uygulanmış lameller ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse 80i, Japonya) değerlendirildi.

Lamellerdeki antikor ile işaretlenmiş alanlar 20x'lik büyütmede kör olarak (gruplar bildirilmeden) incelendi. Hücrelerin boyanma yoğunluğu boyama yok (0) (-), hafif (1) (+), orta (2) (++) ve kuvvetli (3) (+++) olarak skorlanarak reaktif olan hücre sayıları belirlendi ve skorlamadan sonra görüntü analiz sistemi ile kesitlerden fotoğraflar çekildi. Her grup için rastgele seçilmiş 3 alanda her 100 hücre içinde pozitif boyanan hücreler sayıldıktan sonra H-Skoru değerleri hesaplandı (H-Skoru: $\sum P_i (i+1)$ (P_i : % pozitif boyanmış hücre sayısı; i : boyanma şiddeti) (21).

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı. Kontrol grubu ile fenformin uygulanan çalışma gruplarındaki hücresel değişiklikler karşılaştırmalı olarak incelendi. İmmünotokimya sonucu elde edilen H-Skoru değerleri non-parametric Kruskal-Wallis ile değerlendirildi. Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Bulgular

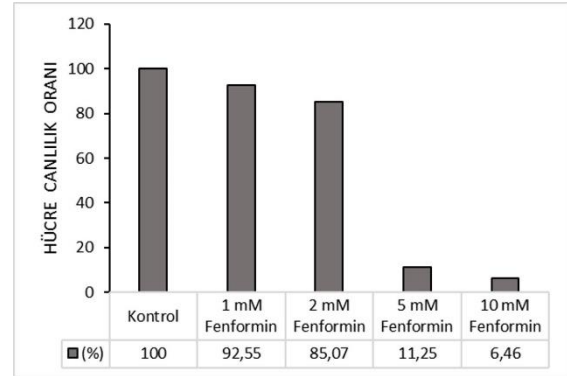
Fenforminin hücre canlılığı üzerindeki etkisi

Fenforminin PC-3 insan prostat kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini hücre canlılığı analizi ile değerlendirdik. Kontrol grubundaki PC-3 prostat kanseri hücreleri %100 olarak kabul edildi. Diğer grupların WST-1 analizinin sonuçları; %92.55 (1 mM fenformin), %8.07 (2 mM fenformin), %11.25 (5 mM fenformin), %6.46 (10 mM fenformin) idi. Artan fenformin dozlarının hücreler üzerine antiproliferatif etki gösterdiği tespit edildi. PC-3 prostat kanseri hücreleri 5 mM ve 10 mM fenformin dozlarına karşı çok daha duyarlıydı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 5 mM ve 10 mM fenformin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edildi ($p=0.019$, $p=0.002$ sırasıyla). 1 mM fenformin ile 10 mM fenformin grupları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edildi ($p=0.034$) (Şekil 1).

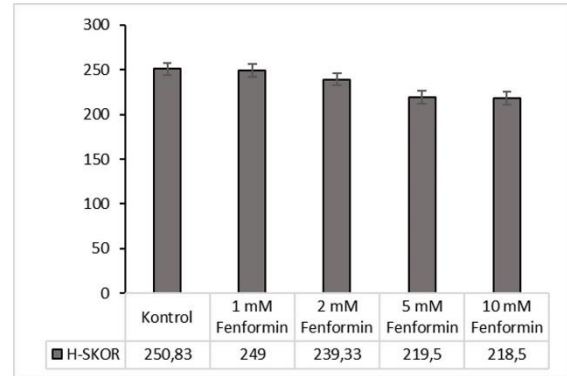
FGFR2 immunoreaktivitesi

FGFR2 immünotokimyasal boyaması sonrası hesaplanan H-Skoru; 250.83 \pm 9.06 (Kontrol), 249 \pm 15.01 (1 mM fenformin), 239.33 \pm 7.11 (2 mM fenformin), 219.5 \pm 8.78 (5 mM fenformin) ve 218.5 \pm 10.15 (10 mM fenformin) olarak tespit edildi. Sonuçların istatistiksel analizlerine göre; kontrol grubu ile 5 mM fenformin grubu, kontrol grubu ile 10 mM fenformin grubu, 1 mM fenformin grubu ile 5 mM fenformin grubu ve 1 mM fenformin grubu ile 10 mM fenformin grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edildi ($p=0.019$, $p=0.012$, $p=0.028$, $p=0.018$, sırasıyla) (Şekil 2). PC-3 prostat kanseri hücrelerine

fenformin uygulaması ile, kontrol grubu ve 1 mM fenformin grubunda orta/kuvvetli (++/+++), 2 mM fenformin grubunda orta (++) , 5 mM fenformin grubu ve 10 mM fenformin grubunda zayıf (+) şiddette FGFR2 immunoreaktivitesi gözlemlendi. Çalışmada ayrıca 5 ve 10 mM fenformin uygulanan prostat kanseri hücreleri incelendiğinde, hücrelerin epitelial karakterlerini kaybettiği, yüzey ile bağlantılarının zayıfladığı, şeklinin yuvarlaklaştığı gözlemlendi. Piknotik nükleuslu hücrelere rastlandı. (Şekil 3).



Şekil 1. WST-1 analizine göre; kontrol grubu ile 5 mM fenformin grubu arasındaki azalma ($p=0.019$), kontrol grubu ile 10 mM fenformin grubu arasındaki azalma ($p=0.002$) ve 1 mM fenformin grubu ile 10 mM fenformin grubu arasındaki azalma ($p=0.034$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 2. FGFR2 H-Skoruna göre; kontrol grubu ile 5 mM fenformin grubu arasındaki azalma ($p=0.019$), kontrol grubu ile 10 mM fenformin grubu arasındaki azalma ($p=0.012$), 1 mM fenformin grubu ile 5 mM fenformin grubu arasındaki azalma ($p=0.028$) ve 1 mM fenformin grubu ile 10 mM fenformin grubu arasındaki azalma ($p=0.018$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

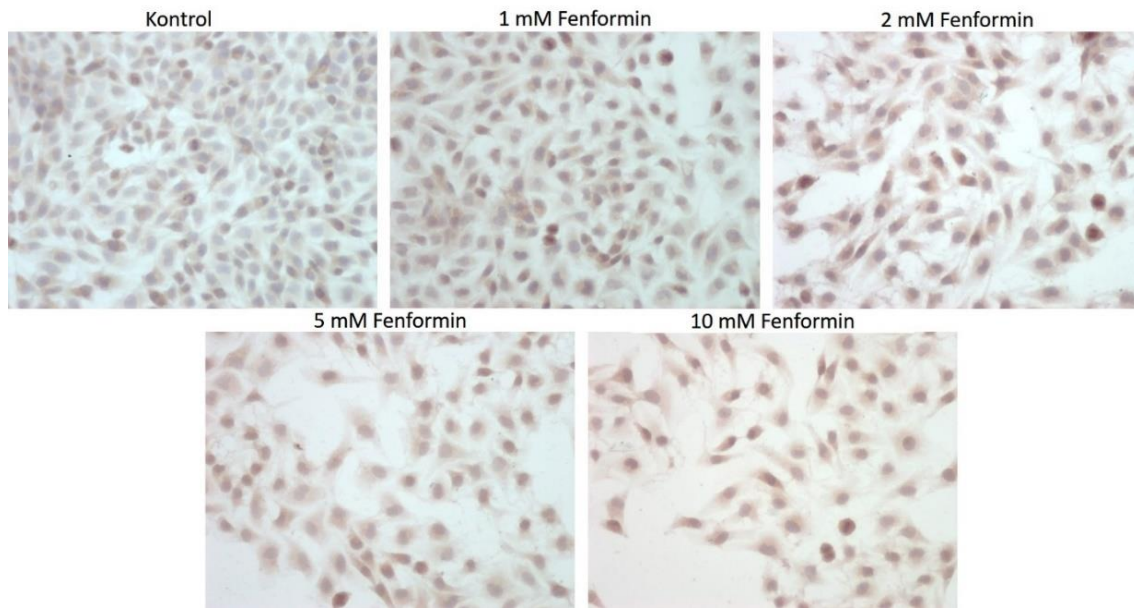
Tartışma

Günümüzde kemoterapi, modern kanser tedavisinin temel yöntemlerinden biridir. Fakat kısa ve uzun vadeli yan etkileri sebebiyle kemoterapötik ajanların çoğunun kullanımı sınırlıdır (22). Kemoterapötiklere karşı gelişen direnç farklı ilaç arayışlarına sebep olmuştur. Son zamanlarda yapılan

bazı araştırmalar, antidiyabetiklerin kanser tedavilerinde kullanımına odaklanmıştır (23). Obezite, insülin direnci ve hiperinsülinemi sonucunda ortaya çıkan inflamasyon artışı sebebiyle, tip 2 diyabet ile kanser arasında bir ilişki olduğunu düşünülmektedir (24). Biguanidlerle tedavi edilen diyabetik hastaların kansere yakalanma riskinin düşük olduğunun bulunmasıyla birlikte, bu ilaçların kanser tedavilerindeki kullanım potansiyelleri de araştırılmaya başlanmıştır (25). Fenforminin antikanserojen özelliğinin etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Fakat fenforminin AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) üzerinden kalori kısıtlaması sağladığı ve mTOR düzenleyici kompleksinin bir blokörü olarak antikanserojen etki gösterdiği bilinmektedir (10). Ayrıca biyoenerjistik stresi indükleyen bir mitokondriyal kompleks I inhibitörüdür (26).

Yapılan çalışmalar, fenforminin kanser hücre hatları ve deney hayvanlarındaki tümör modelleri üzerinde antiproliferatif bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (11, 12, 27-29). Di Magno ve ark. (2020), Hedgehog bağımlı tümörler üzerinde fenforminin antikanserojen aktivitesinin olduğunu bildirmiştir (28). Orecchioni ve ark. (2015), fenforminin (0.5 mM, 2 mM ve 5 mM) MDA-MB-436 üçlü negatif insan meme kanseri hücreleri üzerinde 24. saat, 48. saat ve 72. saatte antiproliferatif bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma, fenforminin doza ve zamana bağlı sitotoksik etkileri olduğunu göstermiştir (29). Benzer şekilde, Jackson ve ark. (2017) fenforminin 72. saatte SKOV-3, Hey ve IGROV-1 insan over kanseri hücrelerinin büyümesi üzerinde engelleyici bir etki gösterdiğini bildirmiştir. Her üç over kanseri hücre hattının bu inhibisyonu, doza bağlı bir şekildeydi. SKOV-3,

Hey ve IGROV-1 için ortalama IC₅₀ değeri sırasıyla 0.9, 1.75 ve 0.8 mM idi (12). Fenformin SW837 ve SW1463 insan kolorektal kanser hücre hatlarıyla yapılan çalışmada, proliferasyonu inhibe etmiş, klonojeniteyi baskılamış ve apoptotik hücre ölümünü artırmıştır (11). Coperchini ve ark. (2019) 'nın yaptığı bir çalışmada TPC-1 insan papiller tiroid karsinomu ve 8505C anaplastik tiroid karsinomu hücre hatlarına fenformin uygulanmıştır. Her iki hücre hattında 10 mM fenformin 7. ve 14. saatlerde; 0.1 mM, 1 mM, 10 mM fenformin 24. saatte hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır (15). Fenforminin (25-75 µM) ErbB2'yi aşırı ekspresyon eden SKBR3 ve 78617 insan meme kanseri hücrelerinde çoğalmayı azalttığı, hücre döngüsünün ilerlemesini bozduğu ve klonojeniteyi inhibe ettiği bildirilmiştir (30). Peng ve ark. (2019)' nın yaptığı çalışmada fenforminin MB49 ve UMUC3 mesane kanseri hücre hattında Akt ve Erk1/2 fosforilasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (31). Yapılan bir çalışmada fenforminin LN229 insan glioma hücrelerinde E-cadherin ve vimentinin ekspresyonunu etkileyerek LN229'un in vitro hücre göçünü önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın devamında erkek BALB/c farelerde LN229 enjeksiyonu ile oluşturulan tümör ksenograft modelinde fenforminin LN229 hücrelerinin büyümesini ve göçünü önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür (32). Çalışmamızda PC-3 prostat kanseri hücrelerine 5 mM ve 10 mM fenformin uygulandığında 24. saatte hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir (p<0.05). Böylece fenforminin PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği ortaya konulmuştur.



Şekil 3. FGFR2 immunoreaktivitesi ve hücre morfolojisi.

FGFR2 geni tarafından kodlanan FGFR2 reseptörü, embriyonik gelişimde endokondriyal ve membranöz kemik gelişimindeki aşamalarda, hücrel proliferasyonda, differansiyasyonda, homeostaz ve doku onarımında görevlidir (33-36). FGFR2'nin mide kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı ve proliferasyonu için gerekli olduğu Kunii ve ark. (2008) tarafından bildirilmiştir (37). Yapılan bir çalışmada SUM-52 meme kanseri hücre hattında FGFR2 gen ekspresyonunda önemli artış gözlenmiştir (38). Over kanserli hastalarda FGFR2 ekspresyonunun floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile analiz edildiği bir çalışmada kötü prognoza sahip hastaların yüksek FGFR2 gen ekspresyonuna sahip olduğu görülmüştür (39). Normalin üzerinde görülen FGFR2 sinyal aktivasyonu, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını indükler. Prostat kanserinin çoğalmasında ise, FGFR2b' den FGFR2c' ye sınıf geçişi rol oynar. Kronik inflamasyon, sigara içme, artan kalori alımı ve azalmış egzersiz sırasında epigenetik modifikasyonların ve genetik değişikliklerin birikmesine bağlı FGFR2 sinyal düzensizliği karsinogeneze yol açar (40). Çalışmamızda, FGFR2 immunositokimyasal boyama yoğunluğunun 5 mM ve 10 mM fenformin uygulanan gruplarda azaldığı görülmüştür.

Biguanidlerden, metformin ve fenformin 1957' de tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaya başlandı (41). Metformin ile karşılaştırıldığında fenforminin daha yüksek potensi ve doku biyoyararlanımı nedeniyle daha yüksek antikanserojen etkinliğe sahip olabileceği düşünülmektedir (42). Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada çeşitli kanser hücreleri üzerinde fenformin, metforminden daha yüksek sitotoksikite göstermiştir. Metforminin EC₅₀ değeri DU145 prostat kanseri hücrelerinde fenforminden 25 ila 15.200.000 kat daha yüksekti (43). Dişi nude farelere MCF7, dişi SCID (Şiddetli kombine immün yetmezliği olan) farelere MDA-MB231 enjekte edilerek oluşturulan in vivo bir deneysel meme kanseri modelinde, fenformin ve metforminin etkinliğini karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada fenforminin farelerde metforminden daha fazla etkinlikle MCF-7 ve MDA-MB-231 tümörlerinin büyümesini ve gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle fenforminin antineoplastik ajan olarak klinik potansiyeli olduğu görüşüne varılmıştır (8). Çalışmamızdaki fenforminin in vitro hücre canlılığını azaltması bu çalışmayı desteklemekle birlikte metforminle karşılaştırılmalı bir çalışma yapılması literatüre katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda fenforminin PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde FGFR2 ekspresyonu ve hücre canlılığını doza bağımlı olarak azalttığı ve en etkili dozun 10 mM fenformin olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmamızın gelecekte fenformin ile yapılacak yeni araştırmalar için yol gösterici olacağını ve literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Etik Kurul Onayı: Çalışmamızda ticari insan hücre hattı kullanılmıştır, etik kurul onayına gerek yoktur.

Kaynaklar

1. Rawla P. Epidemiology of prostate cancer. World J Oncol. 2019;10(2):63.
2. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, et al. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. Adv Pharm Bull. 2017;7(3):339.
3. Tai S, Sun Y, Squires JM, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. Prostate. 2011;71(15):1668-79.
4. Vara-Ciruelos D, Dandapani M, Russell FM, et al. Phenformin, but not metformin, delays development of t cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma via cell-autonomous ampk activation. Cell Rep. 2019;27(3): 690-8.
5. McKendry JB, Kuwayti K, Rado PP. Clinical experience with DBI (phenformin) in the management of diabetes. Can Med Assoc J. 1959;80(10):773-8.
6. Pollak M. Metformin and other biguanides in oncology: advancing the research agenda. Cancer Prev Res (Phila). 2010;3(9):1060-5.
7. Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. Cancer Prev Res. 2010;3(11):1451-61.
8. Appleyard MV, Murray KE, Coates PJ, et al. Phenformin as prophylaxis and therapy in breast cancer xenografts. Br J Cancer. 2012;106(6):1117-22.
9. Huang X, Wullschleger S, Shpiro N, et al. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. Biochem J. 2008;412(2):211-21.
10. García Rubiño M, Carrillo E, Ruiz Alcalá G, et al. Phenformin as an anticancer agent: challenges and prospects. Int J Mol Sci. 2019;20(13):3316.
11. Park JH, Kim YH, Park EH, et al. Effects of metformin and phenformin on apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in chemoresistant rectal cancer. Cancer Sci. 2019;110(9):2834-45.
12. Jackson AL, Sun W, Kilgore J, et al. Phenformin has anti-tumorigenic effects in human ovarian cancer cells and in an orthotopic mouse model of serous ovarian cancer. Oncotarget. 2017;8(59):100113.
13. Jafari-Gharabaghlu D, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Dadashpour M, et al. Combination of metformin and phenformin synergistically inhibits proliferation and hTERT expression in human breast cancer cells. Iran J Basic Med Sci. 2018;21(11):1167.
14. Huang Y, Zhou S, He C, et al. Phenformin alone or combined with gefitinib inhibits bladder cancer via AMPK and EGFR pathways. Cancer Commun. 2018;38(1):1-4.
15. Coperchini F, Croce L, Denegri M, et al. The anti-cancer effects of phenformin in thyroid cancer cell lines and in normal thyrocytes. Oncotarget. 2019;10(60):6432.
16. Fu YT, Zheng HB, Zhang DQ, et al. MicroRNA-1266 suppresses papillary thyroid carcinoma cell metastasis and growth via targeting FGFR2. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(11):3430-8.
17. Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(2):179-86.
18. Larrieu-Lahargue F, Welm AL, Bouche-careilh M, et al. Blocking fibroblast growth factor receptor signaling inhibits tumor growth, lymphangiogenesis, and metastasis. PLoS One. 2012;7(6):e39540.
19. Bai A, Meetze K, Vo NY, et al. GP369, an FGFR2-IIIb-specific antibody, exhibits potent antitumor activity against human cancers driven by activated FGFR2 signaling. Cancer Res. 2010;70(19):7630-9.
20. Tu DG, Yu Y, Lee CH, et al. Hinokitiol inhibits vasculogenic mimicry activity of breast cancer stem/progenitor cells through proteasome mediated degradation of epidermal growth factor receptor. Oncol Lett. 2016;11(4):2934-40.
21. Specht E, Kaemmerer D, Sängler J, et al. Comparison of immunoreactive score, HER2/neu score and H score for the

- immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Histopathology*. 2015;67(3):368-77.
22. Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):65-72.
 23. Leone A, Di Gennaro E, Bruzzese F, et al. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Adv Nutr Cancer*. 2014;355-76.
 24. Scappaticcio L, Maiorino MI, Bellastella G, et al. Insights into the relationships between diabetes, prediabetes, and cancer. *Endocrine*. 2017;56(2):231-9.
 25. Tokajuk A, Krzyżanowska-Grycel E, Tokajuk A, et al. Antidiabetic drugs and risk of cancer. *Pharmacol Rep*. 2015;67(6):1240-50.
 26. Totten SP, Im YK, Cepeda Cañedo EN et al. STAT1 potentiates oxidative stress revealing a targetable vulnerability that increases phenformin efficacy in breast cancer. *Nat Commun*. 2021;12(1):1-20.
 27. Zhou S, Xu L, Cao M, et al. Anticancer properties of novel pyrazole-containing biguanide derivatives with activating the adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway. *Archiv der Pharmazie*. 2019;352(9):1900075.
 28. Di Magno L, Manni S, Di Pastena F, et al. Phenformin inhibits Hedgehog-dependent tumor growth through a complex 1-independent redox/corepressor module. *Cell Rep*. 2020;30(6):1735-52.e7.
 29. Orecchioni S, Reggiani F, Talarico G, et al. The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Int J Cancer*. 2015;136(6):E534-44.
 30. Guo Z, Zhao M, Howard EW, Zhao Q, et al. Phenformin inhibits growth and epithelial-mesenchymal transition of ErbB2-overexpressing breast cancer cells through targeting the IGF1R pathway. *Oncotarget*. 2017;8(36):60342-57.
 31. Peng M, Deng J, Zhou S, et al. Dual inhibition of pirarubicin-induced AKT and ERK activations by phenformin sensitively suppresses bladder cancer growth. *Front Pharmacol*. 2019;10:1159.
 32. Wang Y, Meng Y, Zhang S, et al. Phenformin and metformin inhibit growth and migration of LN229 glioma cells in vitro and in vivo. *OncoTargets Ther*. 2018;11:6039-48.
 33. Petiot A, Conti FJ, Grose R, et al. A crucial role for Fgfr2-IIIb signalling in epidermal development and hair follicle patterning. *Development*. 2003;130(22):5493-501.
 34. Revest JM, Suniara RK, Kerr K, et al. Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J Immunol*. 2001;167(4):1954-61.
 35. Yu K, Xu J, Liu Z, et al. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development*. 2003;130(13):3063-74.
 36. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, et al. Skeletal over growth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 1996;12(4):390-7.
 37. Kunii K, Davis L, Gorenstein J, et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res*. 2008;68(7):2340-8.
 38. Moffa AB, Ethier SP. Differential signal transduction of alternatively spliced FGFR2 variants expressed in human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2007;210(3):720-31.
 39. Tyulyandina A, Demidova I, Gikalov M, et al. Role of FGFR2 amplification in prognosis of patients with ovarian cancer. *Annals of Oncology*. 2018;29:viii354-5.
 40. Katoh Y, Katoh M. FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics. *Int J Mol Med*. 2009;23(3):307-11.
 41. Bailey CJ. Biguanides and NIDDM. *Diabetes care*. 1992;15(6):755-72.
 42. Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, et al. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(29):10574-9.
 43. Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, et al. Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PloS one*. 2014;9(1):e85576.