

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Zoledronik Asit Tedavisinin Hücre Adezyon Moleküllerine Etkisi

Burak Cem SONER^{*1}, Eda AÇIKGÖZ², Gülperi ÖKTEM³, Çağ ÇAL⁴

¹ İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁴ Medicana International İzmir Hastanesi Üroloji Kliniği, İzmir.

ÖZET

Prostat kanserinin tanı ve tedavisine yönelik birçok alanda ilerleme sağlanabilmesine rağmen hastalık bazı vakalar için ölümcül olma niteliğini sürdürmektedir. Hastaların ölümden kurtulması için atılan her adım hedefe yaklaşılmasına yardım etse de halen sonuca ulaşmak için araştırılması gereken pek çok konu bulunmaktadır. Kök hücrenin keşfi ile bu hücrelerin insan sağlığı için önemi anlaşılmış ve tedavide nasıl kullanılacağı belirlenmesine yönelik çalışmalar büyük hız kazanmıştır. İlerleyen yıllarda Kanseri Kök Hücreleri kavramı ortaya çıkmış ve bu hücrelerin, kök hücre özelliklerini taşıyan ancak tümör dokusu içinde metastazı yapan, tedavi sonrası nükse yol açabilen veya tedaviye direnç geliştiren hücreler oldukları belirlenmiştir. Köklülük özelliğine sahip bu hücreler dışında kalan hücre grubu kanser kök hücreleri olmayan hücre grubudur ve konvansiyonel kanser tedavisine cevap veren kanser hücrelerdir. Kanserin metastaz yapması ve çevre dokuya invazyonunda adezyon moleküllerinin önemi büyüktür. Yapılan çalışmalar özellikle çoklu ilaç direnci ve epitelial mezenşimal geçişte adezyon moleküllerinin büyük önem kazandığını göstermiştir. Bu çalışmanın amacı prostat kanseri kök hücreleri üzerine zoledronik asit uygulaması sonrası, metastaz geliştirme sürecinde önemli rolü olan adezyon molekülleri üzerine etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla DU145 insan prostat kanseri hücre hattından akım sitometri cihazı ile CD133/CD44 yüzey belirteçleri kullanılarak izole edilen kanser kök hücreleri üzerine zoledronik asit tedavisi uygulanmıştır. Kanseri kök hücrelerinde oluşan değişiklikler adezyon molekülleri yönü ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar zoledronik asit tedavisi sonrası kanser kök hücreleri sayısında önemli bir düşüş olduğunu ve bu uygulamanın CD44, ITGB1, CD29, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPP1, TGFB1, TGFB1, TIMP2, ADAMTS1, ITGB5'de önemli değişimlere yol açtığını göstermiştir. Bu çalışmada in-vitro ortamda zoledronik asit uygulamasının kanser kök hücreleri adezyon molekülleri üzerine baskılayıcı etki oluşturduğu ve ilerleyen çalışmalarda bu ilacın klinik kullanımda prostat kanseri tedavisinde uygulanabilme olasılığının olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Prostat kanseri. Kanseri kök hücreleri. Zoledronik asit. Hücre adezyon molekülleri. Tedavi.

Effect of Zoledronic Acid Treatment on Cell Adhesion Molecules in Prostate Cancer Stem Cells

ABSTRACT

Although the diagnosis and treatment of prostate cancer has made a progress, the disease remains fatal for some cases. Every step taken to save patients from death helps to approach the goal but there are still many issues that need to be investigated to reach a result. With the discovery of stem cells, the importance of these cells for human health has been understood and studies on how to use them in treatment have gained great momentum. In the following years, the concept of Cancer Stem Cell has emerged. It has been shown that these cells have stem cell characteristics but metastasize within the tumor tissue. They can cause recurrence after treatment or develop resistance to treatment. The other group of cells with rootedness is the non-cancer stem cell group and are cancer cells that respond to conventional cancer treatment. Adhesion molecules are of great importance in the cancer metastasis and invasion into the surrounding tissue. Studies have shown that adhesion molecules has great importance specifically in multi-drug resistance and epithelial-mesenchymal transition. The aim of this study is to examine the effect of zoledronic acid application on prostate cancer stem cells on adhesion molecules, which have an important role in the metastasis development process. For this purpose, zoledronic acid treatment was applied to cancer stem cells isolated from DU145 human prostate cancer cell line using a flow cytometry device and CD133/CD44 surface markers. Changes in cancer stem cells have been investigated in terms of adhesion molecules. The results showed that there was a significant decrease in the number of cancer stem cells after zoledronic acid treatment and this application led to significant changes in CD44, ITGB1, CD29, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPP1, TGFB1, TGFB1, TIMP2, ADAMTS1, ITGB5. In this study, it has been shown that zoledronic acid administration in-vitro has a suppressive effect on cancer stem cell adhesion molecules and that this drug may be used in the treatment of prostate cancer in clinical use in further studies.

Key Words: Prostate Cancer. Cancer Stem Cell. Zoledronic Acid. Cell Adhesion Molecules. Treatment.

Geliş Tarihi: 29.Haziran.2022

Kabul Tarihi: 22.Temmuz.2022

Dr. Burak Cem SONER
İzmir Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Tel.: 532 355 05 49
E-posta: burakcemsoner@gmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:

Burak Cem SONER: 0000-0002-3712-3210

Eda AÇIKGÖZ: 0000-0002-6772-3081

Gülperi ÖKTEM: 0000-0001-6227-9519

Çağ ÇAL: 0000-0002-6434-7631

Toplumun yaşlanması ürolojik kanserlerin görülme sıklığında bir artışa yol açsa da prostat kanserinden ölüm oranları giderek azalmaktadır¹. Prostat kanseri hastalarında sırasıyla 10 yıllık ve 15 yıllık yaşam beklentisi 2015 yılında %92 ve %61 düzeyinde iken 2015 yılı istatistiklerine 5 yıl için %100, 10 yıl için %99 ve 15 yıl için %94 oranlarına erişmiştir². Prostat kanserine bağlı ölüm oranındaki azalma; tanının daha erken evrede konulması, etkin tedavi seçeneklerinin klinik kullanıma alınması ile açıklanabilir. Bununla birlikte; prostat kanseri cerrahi, radyoterapi, androjen baskılama tedavisi, kemoterapi, hatta radyofarmasötik uygulamalardaki gelişmelere rağmen halen bireyin ölümüne neden olabilecek bir hastalıktır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kanser kliniğinde ve moleküler biyolojik araştırmalarında en önemli konunun “kanserin heterojenitesi” olduğunu göstermektedir³. Kanserin heterojenitesini oluşturan hücreler kanser kök hücreleridir (KKH). KKH'nin tümör oluşturmaya başlatma gücü ile hastalığın metastazlarla rekürrens göstermesi ve tedavilere direnç (kemorezistans, immunorezistans ve radyoterapi rezistansı) yaratabilme özelliğini arttırmaktadır⁴. KKH'nin yok edilmesi hastalığın nüks etmesine engel olarak tam tedavi oranlarında ve yaşam süresinde artışa zemin oluşturabilmektedir⁵. Köklülük özelliğine sahip KKH dışında kalan hücre grubu kanser kök hücresi olmayan hücre grubu olarak adlandırılmaktadır (NKKH) ve konvansiyonel kanser tedavisine cevap veren kanser hücrelerdir⁶. KKH'de görülen ama NKKH gurubunda bulunmayan simetrik ve asimetrik bölünebilme özellikleri kanserin kompleks davranışını oluşturmaktadır ve bölünmeler sırasında, her bir hücrede oluşan farklılaşmalar tümör kitlesini heterojen hale getirmektedir⁷. Bu farklılaşmalar transkripsiyonel, post transkripsiyonel modifikasyonlarla ve hatta hücre yüzey özelliklerinde de oluşmaktadır. KKH'si adezyon molekülleri, tümör dokusu içerisinde farklılaşmayı, çoklu ilaç direncini, heterojeniteyi, invazyonu, metastazı ve bunlarla ilişkili olarak da epitelial mezenşimal değişimi etkilemektedir^{8,9}. KKH'ne ait bu hücresele davranış özelliklerinde en etkili yapılardan biri hücre adezyon molekülleri'dir. Adezyon moleküllerinin tedaviden nasıl etkilendiğinin incelenmesi ve özellikle bunun KKH'lerindeki değişiminin ortaya konulması tedavide yeni moleküllerin çalışılması olasılığını gündeme getirebilecektir^{10,11}.

Kanser tedavisinde bifosfanatların (BP) antitümör etkisi yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir^{12,13}. Üçüncü jenerasyon bifosfonat olan zoledronik asit (ZOL), mevalonat biosentezinde spesifik enzim inhibisyonu yapmakta ve intrasellüler sinyal iletimini bozarak etki etmektedir. Bunun yanı sıra, ZOL tedavisinin prostat kanseri hücrelerinde çoğalmayı ve interlökin-6 ekspresyonunu azalttığı, tümör hücrelerinin kemik dokuya tutunmasını

engellediği bilinmektedir¹⁴⁻¹⁶. ZOL, anjiyogenezde etkin olan integrin ve kaderin gibi adezyon moleküllerinin modülasyonu hücresele göçü inhibe edici etki göstermektedir¹⁷. Giraudo ve ark. deney hayvanlarında rahim ağzı kanser modelinde ZOL'ün anjiyogenik tedavisi için bir matris metalloproteaz 9 (MMP-9) inhibitörü olarak etki gösterdiğini, makrofajların içine sızarak MMP-9 ekspresyonunu bastırdığını ve metalloproteaz aktivitesini inhibe ettiğini, VEGF'nin anjiyogenik endotel hücreler üzerindeki reseptörü ile ilişkisini azalttığını rapor etmişlerdir¹⁸. Ayrıca ZOL'ün tutunma, hayatta kalma, göç ve aktin oluşumunu inhibe ettiğini bilinmektedir¹⁹. Bununla beraber en güçlü azot içeren BP'ler arasında ZOL, prostat kanser hücre hatları üzerinde *in vitro* olarak doğrudan sitostatik ve pro-apoptotik etki göstermekte, matris metalloproteinaz ekspresyonunun azaltılması yoluyla hücre istilasını inhibe etmektedir^{18,20}. Bu çalışmanın amacı prostat kanseri kök hücrelerinin zoledronik asit ile tedavisinin metastaz geliştirme sürecinde önemli rolü olan adezyon moleküllerine etkisinin belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

İnsan prostat kanser hücre hattı DU145 için besiyeri, RPMI 1640 içerisine %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 penisilin streptomisin, %1 gentamisin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hücrelerin çözülmesi süreci hücreler -80°C dolabından alınarak direk 37°C su banyosu içerisinde 2 dakika bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Ardından besiyeri içerisine aktarılan hücrelerin kriyoprotektan solüsyonundan kurtarılması için 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücreler 37°C %5 CO2 koşullarda sabitlenen inkübatörde çoğaltılmış ve hücreler yüzeyi %80 oranında kapladığında %0.05 tripsin ile yüzeyden ayrılmış ve 1000 rpm 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen çökelti içerisinde bulunan hücreler kanser kök hücrelerin izolasyonu olarak kullanılmıştır.

Akış Sitometrisi ile Hücrelerin Eldesi

Akış sitometrisi ile DU145 hücreleri içerisinde kanser kök hücrelerinin ayrılması sağlanmış ve DU145 hücreleri *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) yöntemi ile CD133 ve CD44 çift pozitif hücreler (kanser kök hücresi-KKH) ve pozitif olmayan hücreler (NKKH) olacak şekilde ayrılmıştır. Ayrılma işlemi Becton Dickinson Immunocytometry Systems ile gerçekleştirilmiştir. Daha önce çalışmış olan kapılama ile²¹ pozitif ve negatif hücreler elde edilmiştir.

Zoledronik Asit Doz Belirlenmesi

ZOL (LKT Laboratuvarı) 10 mg toz halinde temin edilmiştir. Bu toz 7,35 ml 0,1 M NaOH içerisinde

Zoledronik Asidin Prostat Kanseri Üzerine Etkisi

çözölmüş ve 500 uM'lık stok elde edilmiş ve -20°C de saklanmıştır. DU145 KKH ile DU145 NKKH'leri bir önceki çalışmada tespit edilen ZOL'e ait IC50 değerleri ile inkübe edilmiştir. Dozlar KKH'leri 108 uM, DU145 NKKH'leri 96 uM olarak belirlenmiştir²¹.

Total RNA izolasyonu, RT-PCR ve cDNA eldesi

Gerçek zamanlı PCR için öncelikli aşama olarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için SABiosciences-Qiagen, Frederick, MD firmasının Rneasy Mini Kiti kullanılmış ve üreticinin protokolü uygulanmıştır. Maestro Nano Mikro Hacim Spektrofotometre (Maestrogen MN-913, Hsinchu, Taiwan) cihazı ile ölçüm yapılmış ve OD 260nm/ OD 280nm değeri 2.0 altında çıkan örnekler deneylerde kullanılmıştır. cDNA Eldesi için SABiosciences-Qiagen firmasının RT2First Strand Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi Gene Amp PCR 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA) cihazı ile protokollere uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan cDNA eşit miktarda 96 kuyucuklu plakalar içerisine yerleştirilmeden önce 100 uL cDNA, 1350 uL Sybr Green içeren RT2 qPCR karışımı (master mix) (SABiosciences) ve 1250 uL distile su ile birleştirilmiştir. Karışım her kuyucuğa 25 uL olacak şekilde dağıtılmıştır. Örnekler Applied Biosystems ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA) cihazında çalışılmıştır. Data analizi $\Delta\Delta C_t$ değerlerini elde edebilmek için SABiosciences tescilli online program ile gerçekleştirilmiştir. Gen ifadeleri: Transmembran molekülleri CD44, CDH1, HAS1, ICAM1, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGA9, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, MMP14, MMP15, MMP16, NCAM1, PECAM1, SELE, SELL, SELP, SGCE, SPG7, VCAM1, hücre-hücre adezyon molekülleri CD44, CDH1, COL11A1, COL14A1, COL6A2, CTNND1, ICAM1, ITGA8, hücre-matriks adezyon molekülleri ADAMTS13, CD44, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, SGCE, SPP1, THBS3 ve diğer adezyon molekülleri CNTN1, COL12A1, COL15A1, COL16A1, COL5A1, COL6A1, COL7A1, COL8A1, VCAN, CTGF, CTNNA1, CTNNB1, CTNND2, FN1, KAL1, LAMA1, LAMA2, LAMA3, LAMB1, LAMB3, LAMC1, THBS1, THBS2, CLEC3B, TNC, VTN olarak incelenmiştir.

İmmüno Floresan Boyama

İmmüno floresan boyama DU145 KKH ve DU145 NKKH'lerin ZOL uygulamasından sonra farklı ifadelenen SPP1 geninin protein bazındaki farklılığını belirlemek için gerçekleştirilmiştir. İmmüno floresan boyama için araştırma grubunun daha önceki çalışmalarında uyguladığı protokoller kullanılmıştır²². Görüntüleme CellSens Entry programı ile gerçekleştirilmiştir.

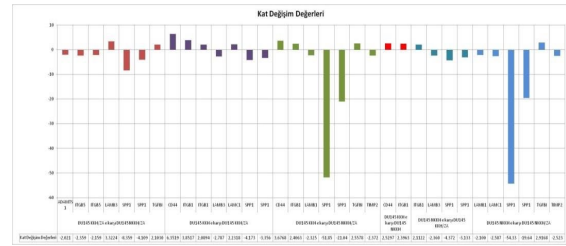
Akış Sitometri Analizi

Akış sitometrisi ile CD44 analizi DU145 KKH ve DU145 NKKH'lerin IC50 değerinde ZOL uygulamasından sonra farklı ifadelenen CD44 geninin protein bazındaki farklılığını belirlemek için gerçekleştirildi. CD133 ve CD44 kapılamalarına dayanarak analiz sadece CD44 kapılamasına göre yapılmıştır.

Bulgular

KKH ve NKKH grupları arasında $\Delta\Delta C_t$ değerine göre anlamlı genler ve transcript varyant sonuçları

Yapılan analizlerde anlamlı çıkan gen ifadeleri aşağıdaki şekilde listelenmiştir. Ayrıca ekspresyon katsayısına göre sunulmuştur (Şekil 1)



Şekil 1:

Gruplar arasında ekspresyon katsayısına göre anlamlı gen ifadeleri gösterilmiştir.

- CD44: Homo sapiens CD44 molecule (Indian blood group) (CD44), transcript variant 4, mRNA.
- ITGB1: Homo sapiens integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1), transcript variant 1A, mRNA.
- LAMB3: Homo sapiens laminin, beta 3 (LAMB3), transcript variant 1, mRNA.
- LAMC1: Homo sapiens laminin, gamma 1 (formerly LAMB2) (LAMC1), mRNA.
- SPP1: Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (SPP1), transcript variant 2, mRNA.
- LAMB1: Homo sapiens laminin, beta 1 (LAMB1), mRNA.
- TGFBI: Homo sapiens transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFBI), mRNA.
- TIMP2: PREDICTED: Homo sapiens TIMP metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2), mRNA.
- ADAMTS1: Homo sapiens ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 (ADAMTS1), mRNA.
- ITGB5: PREDICTED: Homo sapiens integrin, beta 5, transcript variant 3 (ITGB5), mRNA.

Elde edilen bulgulara göre üç farklı grupta belirgin şekilde SPP1 genine ait ifadelerin farklılığı dikkat çekmektedir. Benzer şekilde CD44 ifadesindeki gruplar arası değişiklik anlamlıdır. Gruplar arasındaki farklılıklar aşağıdaki şekilde listelenmiştir. SPP1 gen ekspresyonu

- *DU 145 KKH ile benzer DU 145 NKKH
- *DU 145 KKH < DU 145 KKH ZOL
- *DU 145 KKH ZOL < DU 145 NKKH
- *DU 145 NKKH < DU 145 NKKH ZOL

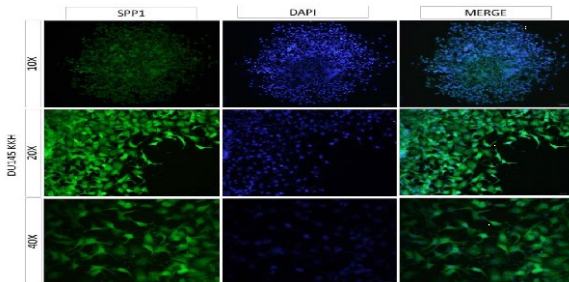
CD44 gen ekspresyonu

- *DU 145 KKH > DU 145 NKKH
- *DU 145 KKH > DU 145 KKH ZOL
- *DU 145 KKH ZOL ile benzer DU 145 NKKH ZOL
- *DU 145 NKKH ile benzer DU 145 NKKH ZOL olarak belirlenmiştir.

SPP1 ve CD44 Protein İfadesi

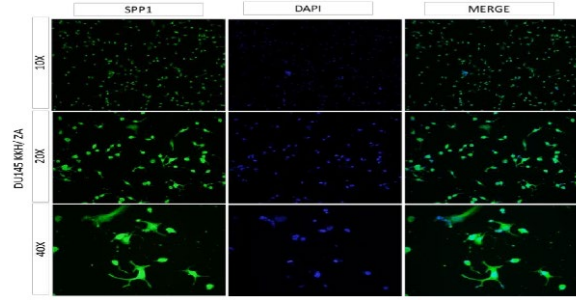
Genetik analiz sonuçları dahilinde en anlamlı çıkan genlerden biri olan SPP1 immüno Floresan boyama ile ve CD44 akış sitometresi analizi ile protein seviyesinde değerlendirilmiştir.

İmmüno Floresan boyama sonuçlarına göre, DU145 KKH (Şekil 2) ve DU145 NKKH (Şekil 4) grupları benzer ışımaya ve yüksek yüzey kaplaması gösterirken, ilaç sonrası SPP1 ekspresyonu KKH grubunda (Şekil 3) ve NKKH grubunda (Şekil 5) için de yükselme göstermiştir. Ayrıca lokalizasyon olarak normalde hücre içerisinde eşit dağılım gösteren SPP1 proteini ZOL tedavisi sonrası hücre membranına yakın lokalizasyonunu artırmış ve şerit halinde bir yapılanma göstermiştir. ZOL tedavisi ekspresyon değişimi yanı sıra hücre ölümünü de artırdığından görüntülerde kontrol hücrelerine göre çok az sayıda hücre elde edilmiştir. Ayrıca yüzeyden ayrılan hücrelerin yüksek seviyede kalıntıları da yine SPP1 pozitif olarak yer yer boyanmıştır. SPP1 ZOL maruziyeti sonrası DU145 KKH ve DU145 NKKH gruplarında artış göstermiştir. Bu sonuçlar SPP1 gen ekspresyonu ile de korelidir. Kontrol görüntülerindeki belirli bölgelerdeki bulanıklık ve yüksek ışımaya gösteren bölgeler kanser hücrelerinin özelliklerinden biri olan 'anchorage independence' yani büyüme alanı bittiğinde diğer hücre üzerinde yeni bir katman oluşturabilme özelliğinden dolayıdır ve o bölgelerde birden fazla hücre katmanı bulunmaktadır.



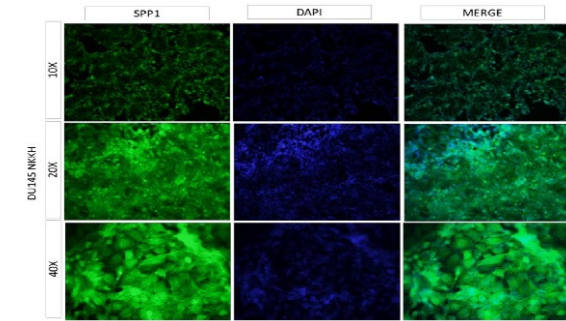
Şekil 2:

DU145 KKH'lerinin SPP1 immüno Floresan boyaması sonuçları gösterilmiştir.



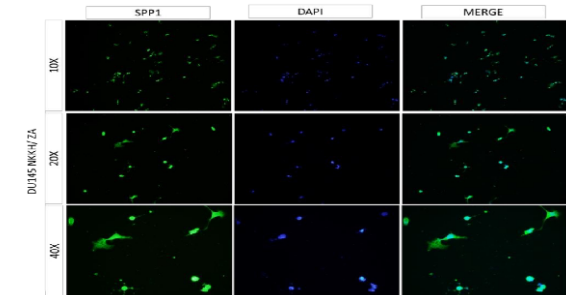
Şekil 3:

ZOL maruziyeti sonrası DU145 KKH'lerinin SPP1 immüno Floresan boyaması sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4:

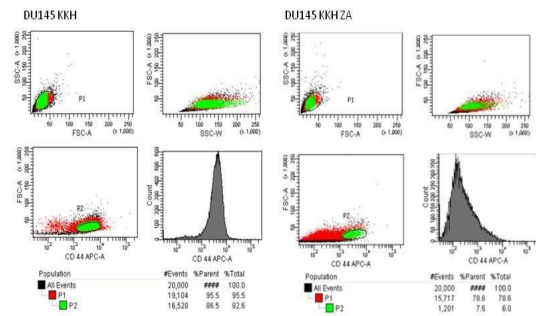
DU145 NKKH'lerinin SPP1 immüno Floresan boyaması sonuçlarıdır.



Şekil 5:

ZOL maruziyeti sonrası DU145 NKKH'lerinin SPP1 immüno Floresan boyaması sonuçlarıdır.

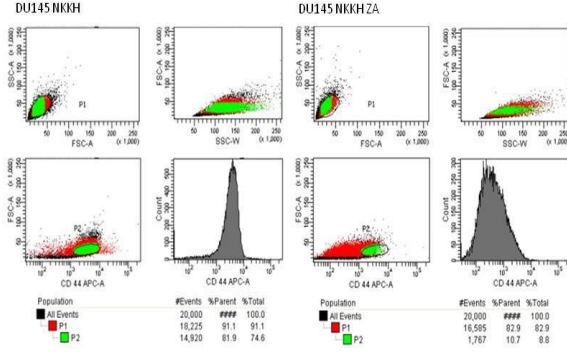
CD44 molekülü akış Sitometresi Analizinde hücreler yöntem kısmında belirtildiği gibi hazırlandı ve her hücre grubundan 20000 hücre analiz edilmiştir (Şekil 6-7).



Şekil 6:

DU 145 KKH kontrol ve ZOL grubunda CD44 protein ekspresyonu gösterilmiştir.

Zoledronik Asidin Prostat Kanseri Üzerine Etkisi



Şekil 7:

DU 145 NKKH kontrol ve ZOL grubunda CD44 protein ekspresyonu gösterilmiştir.

CD44 ekspresyonu DU 145 KKH grupta daha yüksek (%82,6) iken DU145 NKKH grupta %74,6 olarak belirlendi ve bu durum gen ekspresyonu ile korelasyon göstermektedir. Her iki hücre grubu da ZOL maruziyeti sonrası CD44 protein ekspresyonunda düşüş gösterdi (DU145 KKH ZOL: %6 iken DU145 NKKH ZOL: %8,8). Fakat gen ekspresyonunda (gerçek zamanlı PCR sonucunda) düşüş sadece DU145 KKH grupta belirlenmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Prostat kanseri gelişmiş ülkelerde erkekler arasında en sık teşhis konulan ve kansere bağlı ölüme ikinci sıklıkta yol açan malign hastalıktır. Biyolojik özellikleri, buna bağlı klinik, sosyal ve ekonomik etkileri nedeniyle prostat kanseri araştırmaların giderek daha fazla hedefi haline gelmektedir. Tedavi sonrasında kanserin tekrarlaması, hastalığın ilerleme göstermesi ve metastaz gelişimi prostat kanseri hastalarında yaşam süresinin uzatılması açısından halen aşılması gereken engellerdir.

Diğer kanserlerde olduğu gibi prostat kanserinde de ileri evre hastalık tanısı konulması hasta ve hekim açısından zorlu bir sürecin yaşanacağını işaretidir. Tedavilerle hastalığın kontrol edilememesi, rekürrens gelişmesi ve metastatik kanserle mücadele yoğun mesai gerektirir. Yüksek riskli ve/veya ileri evre prostat kanseri hastalarında kemoterapi uygulamasının yaşam süresini uzattığı artık bilinen bir gerçektir. Son 10 yıl içerisinde prostat kanserinin sistemik tedavisinde çok sayıda ve mucizevi başarılar elde edilmesine rağmen yaşam savaşının kazanıldığından halen söz etmek için erkendir.

İleri evre prostat kanserinin tedavisinde yeni ve gelişmiş seçeneklerin ortaya konulmasını hedefleyen araştırmaların temel odak noktasında prostat kanseri kök hücrelerini hedefleyen yöntemler yer almaktadır. Kanseri kök hücrelerine yönelik tedavi seçenekleri geleneksel antiproliferatif yöntemlerden daha etkin

maligante sağaltımına önderlik yapabilecek kapasiteye sahip olabilir²³⁻²⁵.

Kanser kök hücrelerini hedef alan tedavilerde hücre yüzeyindeki belirleyiciler, sinyalizasyon yolları ve kanser kök hücresi mikroçevresine (niche) odaklanılmaktadır. Tümör mikroçevresi için büyük önem taşıyan anjiyogenezis adeta köşe taşıdır ve kanser kök hücrelerinin yaşaması ve ilaç direnci gelişimi açısından önemlidir²⁶.

Kanser kök hücrelerinin homeostazisine etki edecek Hh, Wnt, Notch, and NF-κB yolları inhibitörlerinin inhibisyonu kök hücrelerin kendisini yenileme yeteneğini engelleyecek, kök hücre faktörlerinin (Oct4, Sox2, c-Myc, and Nanog) pluripotent halini baskılayacak ve tümör büyümesini inhibe edecektir.

Prostat kanseri tedavisi özelinde Wnt yolağı inhibitörleri (Foxy-5 ve OMP-54F28) kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarının tedavisinde Faz I çalışma olarak araştırılmaktadır^{27,28}. Hh yolağı inhibisyonunu hedefleyen klinik çalışmalar da yoğun bir ilgi ile devam etmektedir²⁹⁻³¹. Klinik çalışmalar prostata sınır kanser ve metastatik olgulara yönelik gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmada, ZOL'ün prostat KKH ve NKKH hücre popülasyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir ve sonuçlarda, CD44 hücre yoğunluğunda önemli düşüşler tespit edilmiştir. Bu sonuç, ZOL uygulamasında KKH'lerin büyük oranda hedeflenebildiğini göstermektedir. ZOL uygulamasında CD44, ITGB1, CD29, LAMB1, LAMB3, LAMC1, SPP1, TGFB1, TIMP2, ADAMTS1, ITGB5 adezyon genlerinde önemli değişimlerin olduğu tespit edilmiştir. En belirgin değişim SPP1'de görülmüştür. Sonuçlar, KKH-adezyon molekülleri ekseninde ZOL'un önemli rollerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Klinik araştırmalarda elde edilen sonuçların klinik öncesi çalışma verilerinin getirdiği umutlara erişememesine rağmen üzerinde inceleme yapılması gereken çok sayıda seçenek bulunmaktadır. Prostat kanseri kök hücrelerini hedefleyen birden fazla ilacın birlikte kullanımı esasına dayalı protokollerin bugün için bilinen tedavi seçeneklerini değiştirebilir. Böylesi bir değişim prostatta sınırlı hastalık, lokal ileri hastalık, metastatik hastalık ve tedavilere rağmen ilerleyen hastalık olgularına çözüm getirebilir. Kök hücreler rejeneratif tıbbi tedavi uygulamalarıyla birçok kronik hastalık sahibi için ümit ışığı olma yolunda ilerlemektedir. Bununla birlikte, kanser kök hücresi ve kanser kök hücresi üzerinden etki edecek tedavi uygulamaları göreceli olarak yeni araştırma sahalarıdır. Bu araştırma birbirinden bağımsız üç ayrı bileşeni bir araya getirerek bugün için in vitro ortamda ama gelecekte prostat kanserli hastaların tedavisinde kullanılabilme potansiyeli olan yeni bir tedavi seçeneği yaratmayı başarabilmiştir. Hiç şüphesiz laboratuvar şartları ile klinik pratik her zaman aynı başarıya erişememektedir. Yine de zoledronik asit

uygulanmasıyla prostat kanseri kök hücreleri adezyon moleküllerinde elde edilen değişimler klinik uygulamada kullanılabilecek potansiyel etkileri işaret etmektedir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Çalışmamız hücre kültürü hattında gerçekleştirilmiş olup, Klinik Araştırmalar, Girişimsel olmayan etik kurul veya herhangi bir etik kurul onayı ihtiyacı bulunmamaktadır.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: Ç.Ç., B.C.S., G.Ö., E.A.; Veri toplama ve işleme: Ç.Ç., B.C.S., G.Ö., E.A.; Analiz ve verilerin yorumlanması: Ç.Ç., B.C.S., G.Ö.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: Ç.Ç., B.C.S., G.Ö., E.A.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Çalışma için destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Rebecca L. Siegel, Kimberly D. Miller, Ahmedin Jemal. Cancer Statistics, 2018, CA Cancer J Clin 2018;68:7–30.
2. American Cancer Society. Survival rates for prostate cancer. <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-survival-rates>. Erişim tarihi: Mart 12, 2015
3. Kumar VE, Nambiar R, De Souza C, Nguyen A, Chien J, Lam KS. Targeting Epigenetic Modifiers of Tumor Plasticity and Cancer Stem Cell Behavior. *Cells*. 2022 Apr 21;11(9):1403.
4. Ju F, Atyah MM, Horstmann N et al. Characteristics of the cancer stem cell niche and therapeutic strategies. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jun 3;13(1):233. doi: 10.1186/s13287-022-02904-1.
5. Alison MR, Murphy G, Leedham S. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res*. 2008;331:109–24
6. Oktem G, Bilir A, Uslu R et al. Expression profiling of stem cell signaling alters with spheroid formation in CD133high/CD44high prostate cancer stem cells. *Oncol Lett*. 2014 Jun;7(6):2103-2109.
7. Majumdar S, Liu ST. Cell division symmetry control and cancer stem cells. *AIMS Mol Sci*. 2020;7(2):82-98.
8. Duzagac F, Inan S, Ela Simsek F et al. JAK/STAT pathway interacts with intercellular cell adhesion molecule (ICAM) and vascular cell adhesion molecule (VCAM) while prostate cancer stem cells form tumor spheroids.
9. Heinly BE, Grant CN. Cell Adhesion Molecules in Neuroblastoma: Complex Roles, Therapeutic Potential. *Front Oncol*. 2022 Apr 27; 12:782186.
10. Witte KE, Pfitzenmaier J, Storm J et al. Analysis of Several Pathways for Efficient Killing of Prostate Cancer Stem Cells: A Central Role of NF-κB RELA. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 18;22(16):8901.
11. Adamowicz J, Pakravan K, Bakhshinejad B, Drewa T, Babashah S. Prostate cancer stem cells: from theory to practice. *Scand J Urol*. 2017 Apr;51(2):95-106.
12. Gnant M, Clézardin P. Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: a brief review of published literature. *Cancer Treat Rev*. 2012 Aug;38(5):407-15.
13. Yamada J, Tsuno NH, Kitayama J et al. Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. *J Surg Res*. 2009 Jan;151(1):115-20. doi: 10.1016/j.jss.2008.01.031
14. Gallo M, De Luca A, Lamura L, Normanno N. Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: implications for adjuvant therapy of breast cancer. *Ann Oncol*. 2012 Mar;23(3):597-604.
15. Borghese C, Casagrande N, Pivetta E et al. Self-assembling nanoparticles encapsulating zoledronic acid inhibit mesenchymal stromal cells differentiation, migration and secretion of proangiogenic factors and their interactions with prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(26):42926-38.
16. Tanaka, T., Morimoto, K., Nakatani, T. Zoledronic Acid Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasion via Degradation of Ubiquitinated NEDD9 in PC-3 Prostate Cancer Cells. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 2018;10(04):80–4.
17. Yoshiyama A, Morii T, Ohtsuka K et al. Development of Stemness in Cancer Cell Lines Resistant to the Anticancer Effects of Zoledronic Acid. *Anticancer Res*. 2016 Feb;36(2):625-31.
18. Giraudo E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest*. 2004 Sep;114(5):623-33.
19. Santini, D., Zoccoli, A., Gregorj, C. Et al. Zoledronic acid induces a significant decrease of circulating endothelial cells and circulating endothelial precursor cells in the early prostate cancerneoadjuvant setting. *Oncology (Switzerland)*, 2013;85(6), 342–7.
20. Hasmim, M., Bieler, G., & Rüegg, C. Zoledronate inhibits endothelial cell adhesion, migration and survival through the suppression of multiple, prenylation-dependent signaling pathways. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007;5(1), 166173.
21. Rouhrazzi, H., Turgan, N., & Oktem, G. Zoledronic acid overcomes chemoresistance by sensitizing cancer stem cells to apoptosis. *Biotechnic and Histochemistry*, 2018;93(2), 77–88.
22. Acikgoz E, Soner BC, Ozdil B, Guven M. CD133+/CD44+ prostate cancer stem cells exhibit embryo-like behavior patterns. *Acta Histochem*. 2021 Jul;123(5):151743.
23. Maitland NJ, Collins AT: Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26:2862-70.
24. Dubrovskaya A, Elliott J, Salamone RJ et al. Combination therapy targeting both tumor-initiating and differentiated cell populations in prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16:5692-5702.
25. Castelo-Branco P, Zhang C, Lipman T et al. Neural tumor-initiating cells have distinct telomere maintenance and can be safely targeted for telomerase inhibition. *Clin Cancer Res* 2011; 17:111-2
26. Leão R, Domingos C, Figueiredo A, Hamilton R, Tabori U, Castelo-Branco P. Cancer Stem Cells in Prostate Cancer: Implications for Targeted Therapy. *Urol Int* 2017;99:125-136
27. Sheikh A, Niazi AK, Ahmed MZ, Iqbal B, Anwer SM, Khan HH: The role of Wnt signaling pathway in carcinogenesis and implications for anticancer therapeutics. *Hered Cancer Clin Pract* 2014;12:13.
28. Le PN, McDermott JD, Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther*. 2015 Feb;146:1-11.
29. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP: Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:97-106.
30. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K: Hedgehog signaling in prostate cancer and its therapeutic implication. *Int J Mol Sci* 2013;14:13979-14007.
31. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K: Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget* 2015;6:13899-913.