

Şanlıurfa'daki Prostat Kanseri Hastalarında VGSC'lerin İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi

An Immunohistochemical Investigation of VGSCs in Prostate Cancer Patients in Sanliurfa

Hatice GUMUSHAN AKTAS¹, Cemal CAVUS², Ulaş ALABALIK³

1 Harran University, Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Sanliurfa, Turkey.

2 Harran University, The Institute for Graduate Studies in Science, Biology Department, Sanliurfa, Turkey.

3 Dicle University, Faculty of Medicine, Pathology Department, Diyarbakir, Turkey..

Sorumlu yazar:

Hatice GUMUSHAN AKTAS

Harran Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 63300, Şanlıurfa, Türkiye +90 414 3183000 / 1192
e-mail: haticeaktas@harran.edu.tr

Bu çalışma, 21 – 23 Eylül 2017 tarihinde Şanlıurfa'da yapılan 1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş tarihi / Received: 31.10.2017

Kabul tarihi / Accepted: 28.11.2017

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, genitoüriner sistem rahatsızlıkları nedeniyle Şanlıurfa'daki Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran bazı hastalardan alınmış prostat doku örneklerinde Nav1.7 geni tarafından kodlanan proteinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Çalışmada, tanı konulmuş (benign prostatik hiperplazi, prostatik intraepitelyal neoplazi, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri) 20 hastaya ait prostat dokusu örnekleri ve dört normal prostat kullanıldı. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Patoloji arşivlerinden alınan bu numuneler 2012–2014 yıllarına aittir. İşaretleme için anti-sodyum kanalı Nav1.7 monoklonal antikor (Millipore, Merck, ABD) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, üretici firmanın önerisine göre, sıçan beyincik dokusu ile çalışıldı. İmmünohistokimyasal boyama işlemi otomatik immünohistokimya cihazında (Ventana, Roche, ABD) yapıldı.

Bulgular: Primer antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitlerinde boyanma olmadı. Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında prostat doku örneklerinde (normal prostat dokusu, benign prostatik hiperplazi, prostatik intraepitelyal neoplazi dokusu, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri) dikkate değer bir boyanma gerçekleşmediği gözlemlendi.

Sonuç: Nav1.7 geni tarafından kodlanan VGSC proteini, normal prostat ve benign prostat hiperplazisi yanı sıra prostatik intraepitelyal neoplazi, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri gibi farklı derecelerde kanser bulunan hastalarda immünohistokimyasal olarak gösterilememiştir. İncelemeler, diğer genler tarafından kodlanan VGSC'lere karşı üretilmiş çeşitli antikorlarla işaretlenerek sürdürülmelidir. Ayrıca bulgular diğer moleküler tekniklerle de doğrulanmalıdır.

Anahtar kelimeler: Voltaj kapılı sodyum kanalları, Nav1.7 antikor, prostat kanseri, immünohistokimya.

ABSTRACT

Aim: In this study, it was aimed to investigate presence of the protein which encoded by Nav1.7 gene in prostate tissue specimens obtained from some patients consulted to Harran University Medical Faculty Hospital and Mehmet Akif Inan Training and Research Hospital in Sanliurfa owing to genitourinary system disorders.

Materials and Methods: In this study, it was used the prostate tissue samples which belong to 20 diagnosed patients (benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, non-metastatic prostate cancer and metastatic prostate cancer), and four normal prostate. These specimens obtained from Pathology Department archives of Harran University Faculty of Medicine Hospital and Mehmet Akif Inan Training and Research Hospital belong to 2012–2014. For labelling, Anti-Sodium channel Nav1.7 monoclonal antibody (Millipore, Merck, USA) was used. It was studied with rat cerebellum tissue as positive control in accordance with the manufacturer's protocol. The immunohistochemical staining procedure was

performed in automatic immunohistochemistry device (Ventana, Roche, USA).

Results: There was no staining in the negative control sections which non-treated with primer antibody. No remarkable staining was observed in prostate tissue specimens (normal prostate tissue, benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia tissue, non-metastatic prostate cancer and metastatic prostate cancer) when compared with the positive control.

Conclusion: The VGSC protein which encoded by Nav1.7 gene was not showed by immunohistochemically in patients with normal prostate, benign prostatic hyperplasia as well as different grades of cancer such as prostatic intraepithelial neoplasia, non-metastatic prostate cancer, and metastatic prostate cancer. Investigations should be continued by marking with various antibodies that produced against VGSCs encoded by other genes. Additionally, the findings should confirm with other molecular techniques.

Keywords: Voltage-gated sodium channels, Nav1.7 antibody, prostate cancer, immunohistochemistry

GİRİŞ

Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından 2014 yılında yayımlanan rapora göre, 2012 yılında dünya çapında yaklaşık 8.2 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiş olup 14.1 milyon yeni kanser vakası kaydedilmiştir (1). Kanser, hem kadınlar hem de erkeklerde kalp hastalıklarından sonra gelen en önemli ölüm nedenidir (2,3). Prostat kanseri ise erkeklerde en sık görülen kanserler arasında ülkemizde ve dünyada ikinci sıradadır (3,4). Ayrıca, prostat kanserinin görülme sıklığı, etnik gruplar ve ülkeler arasında da değişiklik göstermektedir. (5). Prostat kanseri için kullanılan cerrahi çıkartım, radyoterapi, hormon tedavisi ve izleyerek bekleme

gibi tedavi yöntemlerinin etkinlikleri farklı olmakla birlikte çoğu bireyde hastalık ilerleyerek metastatik evreye geçmektedir (6). Metastaz, primer tümörden ayrılan bir tümör hücrelerinin dolaşım sistemine girip uzak alanlara göç etmesi ve bu alanlarda yerleşerek ikincil tümörleri oluşturmasıdır. Metastatik süreçte, hücre iskeleti elemanları, hücre dışı matriksi yıkan enzimler ve onların inhibitörleri, hücre adezyon molekülleri vb. yanısıra iyon kanal aktivitesi gibi pek çok faktör rol oynamaktadır (7,8).

İyonların hücre içi ile dışı arasında taşınmasını gerçekleştiren iyon kanalları, sinir ve kas hücrelerinin uyarılması, hücrel homeostazın

sağlanması, hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre siklusunun kontrolü gibi önemli işlevlere sahiptirler (9-11). Bu yüzden kanal aktivitesindeki değişikliklerin birçok hastalıkla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (10). Özellikle prostat ve meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarla, voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC) artmış veya değişmiş ekspresyon ya da aktivasyonunun invazyon ve metastaz gibi çeşitli kanser hücre davranışlarını ortaya çıkardığı tespit edilmiştir (12-17). Bennett ve ark. (2004), metastatik olmayan veya orta derecede metastatik olan insan prostat kanseri hücrelerinin invazif potansiyelini arttırmak için VGSC'lerin aşırı ekspresyonunun gerekli ve yeterli olduğunu göstermişlerdir (18).

VGSC'ler iki alt üniteden oluşmaktadır. Kanalın poru meydana getiren kısmı olan α alt ünitesi 260 kDa ağırlığındadır (19). Bir veya daha fazla sayıdaki β alt üniteleri (33 – 36 kDa), düzenleyici proteinlerdir. Hem hücre adezyon molekülü olarak rol oynayabilirler hem de sodyum kanal yoğunluğunu ve hücre uyarılabilirliğini artırarak VGSC'lerin hücre yüzeyi ekspresyonunu düzenleyebilirler. (20). VGSC'lerin α alt ünitesini kodlayan on (Nav1.1 – Nav1.9, NaX) adet genden Nav1.1, Nav1.2 Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 ve Nav1.9'un sinir dokusunda, Nav1.4'ün iskelet kasında, Nav1.5'in ise kalp kasında bulunduğu tespit edilmiştir (21).

Fraser ve ark. (2005), yüksek metastatik özellikteki bir meme kanseri hücre soyunda (MDA-MB231) metastazın Nav1.5 geninin yüksek oranda eksprese edilmesiyle bağlantılı olduğunu bulmuşlardır (15). Sıçan prostat kanseri hücre soyu olan güçlü metastatik MAT-LyLu hücrelerinde ise yaklaşık yedi farklı VGSC α alt tipi mRNA bulunduğu ve en yüksek mRNA seviyesinin Nav1.7 alt tipine ait olduğu gösterilmiştir. Farklı metastatik özellikteki insan ve sıçan prostat kanseri hücre soyları üzerinde yapılan moleküler biyolojik analizler, zayıf metastatik hücrelerle karşılaştırıldığında, yüksek metastatik hücrelerde Nav1.7 geninin üç kat daha fazla eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır (22).

Prostat kanserli hasta dokularında VGSC'leri kodlayan Nav1.7 geninin ekspresyonunun artmış olduğu bildirilmektedir. Ex vivo olarak yapılan incelemelerle, Nav1.7 gen ekspresyonunun, ileri evre prostat kanserli hasta dokularında, normal prostat dokusundan yaklaşık 20 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (14). Bu bulgular ve biriken kanıtlar, VGSC'lerin hem metastatik kanserler için bir biyobelirteç hem de yeni ve kullanışlı bir tedavi hedefi olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bölgesel ve irksal farklılıkların çeşitli kanserlerin görülme sıklığı ve prognozu ile bağlantılı olduğu göz önüne alındığında Türkiye'de yaşayan prostat kanseri hastalarında VGSC ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, bu

genin ürünü olan proteinin bir biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelinin ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacağından, önem arz etmektedir.

MATERYAL VE METOD

Doku örneklerinin toplanması:

Bu çalışmada Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Patoloji arşivlerinden temin edilen 2012 – 2014 yıllarına ait prostat dokusu örnekleri kullanılmıştır. Tanı konulmuş 20 hastaya ait prostat dokusu örnekleri ve 4 normal prostat çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta örnekleri, benign prostatik hiperplazi (n=6), prostatik intraepitelyal neoplazi (n=4), metastatik olmayan prostat kanseri (n=5) ve metastatik prostat kanseri (n=5) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Çalışma için gereken etik kurul onayı Harran Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 15.04.2014 Sayı: 05/04).

İmmünohistokimyasal boyama:

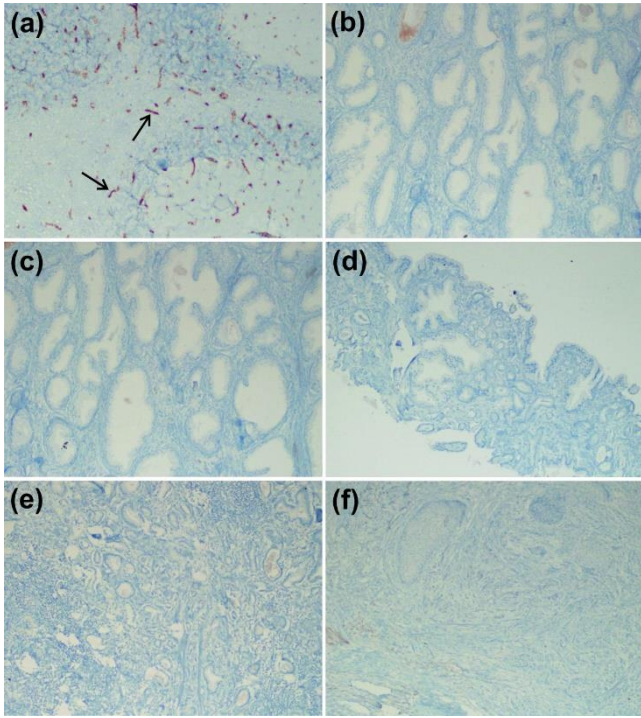
VGSC proteinin belirlenebilmesi amacıyla parafine gömülü doku örneklerinden immünohistokimyasal (IHC) inceleme için 3 – 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler pozitif yüklü lamlara yapıştırılmış ve etüve yerleştirilerek bir gece (14 – 16 sa) 56 oC'de bekletilmiştir. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü otomatik immünohistokimya cihazında (Ventana,

Roche, USA) çalışılmıştır. İki aşamalı çalışma sistemine sahip olan cihazda birinci basamakta deparafinizasyon ve antijen geri kazanma işlemleri ikinci basamakta ise; antikor inkübasyonu, kromojen (diamino benzoik asit, DAB) ve zıt boya (Mayer hematoksilin) uygulanması işlemleri yapılmıştır. Antijen geri kazanımı sitrat tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Primer antikor inkübasyonu için 1:200 oranında dilüe edilmiş Anti-Sodium channel Nav1.7 monoklonal antikor (Millipore, Merck, USA) kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak üretici firmanın önerisine göre sıçan beyincik dokusu kullanılmıştır. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor uygulanmamıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda analiz edilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

BULGULAR

Normal ve hasta (benign prostatik hiperplazi, prostatik intraepitelyal neoplazi, metastatik olmayan prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri) prostat dokusu örneklerinde voltaj kapılı sodyum kanalı varlığı immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. VGSC'leri kodlayan genlerden Nav1.7'ye karşı üretilmiş Anti-sodium channel Nav1.7 primer antikor uygulanmayan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir işaretlenme gözlenmemiştir. Üretici firmanın önerisine göre pozitif kontrol olarak kullanılan sıçan beyincik dokusunda boyanma Şekil 1a'da

görülmektedir. Normal prostat dokusu (Şekil 1b) ve benign prostat hiperplazili (Şekil 1c) doku örneklerinde pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında dikkat çekici bir boyanma gözlemlenmemiştir. Benzer şekilde prostatik intraepitelyal neoplazili doku (Şekil 1d), nonmetastatik prostat kanseri dokusu (Şekil 1e) ve metastatik prostat kanseri (Şekil 1f) örneklerinde de voltaj kapılı sodyum kanalının varlığı immünohistokimyasal olarak gösterilememiştir.



Şekil 1. Prostat dokusu örneklerinde Nav1.7'nin immünohistokimyasal analizi (ışık mikroskobu, büyütme oranı: 4x). (a) Pozitif kontrol (Sıçan beyincik dokusu) (b) Normal prostat dokusu (c) Benign prostat hiperplazisi (d) Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (e) Prostat kanseri (f) Metastatik prostat kanseri

TARTIŞMA

Dünyada kadın ve erkek ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan kanserden kaynaklanan ölümlere bakıldığında, esas etkenin metastaz olduğu göze çarpmaktadır (23,24). Kanser gelişimi ve metastatik sürecin aydınlatılması amacıyla yürütülen in vitro ve in vivo çalışmalar, birçok kanserin ortaya çıkışı, ilerlemesi ve yayılmasında iyon kanallarının önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir (25,26). İyon kanallarından özellikle voltaj kapılı sodyum kanallarının, kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde kuvvetlendirici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmalardan elde edilen bulgular, hüresel uyarılabilirlik (CELEX) hipotezini ortaya çıkarmıştır. Bu hipotez, metastazın başlamasında VGSC ekspresyonunun arttığını, güçlü metastatik karsinoma hücrelerinin uyarılabilir hale geldiğini, bu membran uyarılabilirliğinin kanser hücrelerini hiperaktif ve invazif yaptığını ve böylece metastazı desteklediğini önermektedir (27).

Spesifik bir VGSC blokeri olan tetrodotoksinin kullanıldığı in vitro (12,18,28) ve in vivo (29) çalışmalarla metastatik prostat kanseri hücrelerinde VGSC ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Diss ve ark. (2001), insan ve sıçan prostat kanseri hücrelerinden yüksek metastatik özellikte olanların (PC-3 ve MAT-LyLu) zayıf metastatik olanlara (LNCaP ve AT-2) oranla daha

fazla VGSC (özellikle Nav1.7) eksprese ettiğini göstermişlerdir (22). Ex vivo olarak yapılan çalışmalarla da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Araştırmacılar, ileri evre prostat kanseri hastalarına ait prostat dokularındaki Nav1.7 gen ekspresyonunun normal prostat dokusundan yaklaşık 20 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (14). Bütün bulgular, VGSC'lerin metastazlar için yeni ve önemli bir tedavi seçeneği olabileceğini işaret ederken VGSC'lerin biyobelirteç olarak tarama ve teşhis amacıyla kullanılabilceğini göstermektedir.

Ülkemizde birçok farklı etnik kökenden insanı barındıran Güneydoğu Anadolu Bölgesi Şanlıurfa ilinde bulunan Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ile Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne 2012 – 2014 yılları arasında başvurmuş ve teşhis konulmuş hastalardan alınan prostat dokusu örneklerinde VGSC proteininin varlığı, Nav1.7'ye karşı üretilmiş primer antikor kullanılarak immünohistokimyasal yöntem ile araştırılmıştır. İnceleme sonucunda, normal prostatın yanısıra benign prostat hiperplazisi, prostatik intraepitelyal neoplazi, non-metastatik prostat kanseri ve metastatik prostat kanseri teşhisi konulmuş prostat örneklerinde de voltaj kapılı sodyum kanalının

varlığı immünohistokimyasal olarak gösterilememiştir. Ancak bu sonuçlar, normal prostat dokusunda ve hasta örneklerinde VGSC'lerin bulunmadığını kesin olarak söylemez; çünkü VGSC'lerin α alt ünitesini kodlayan 10 farklı gen bulunmaktadır (21). Suy ve ark. (2012), insan prostat kanseri dokularında VGSC'leri kodlayan başka bir gen olan Nav1.8'in varlığını immünohistokimyasal yöntemle araştırdıkları çalışmalarında; farklı Gleason skoruna sahip örneklerde Nav1.8'e karşı üretilmiş antikor ile işaretleme yapmışlar ve boyanma yoğunluğundaki artışın, artan Gleason skoru ile uyumlu olduğunu bulmuşlardır. Böylece Nav1.8'in bir biyobelirteç adayı ve aynı zamanda yeni bir tedavi hedefi seçeneği olabileceğini önermişlerdir (30). Bölgesel ve ırksal farklılıkları göz önüne aldığımızda çalışmalarımızın, diğer VGSC antikorlarıyla sürdürülmesi ve bulgularımızın diğer moleküler tekniklerle konfirme edilmesi planlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü (HÜBAK) 14014 nolu projesi ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Stewart BW. and Wild CP. World Cancer Report 2014. Lyon: World Health Organization; IARC Nonserial Publication, 2014: 632 s.
2. Siegel RL., Miller KD., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67:7–30.
3. Şencan İ.ve Keskinliç B. Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2017: 48 s.
4. Staunton L., Tonry C., Lis R., Espina V., Liotta L., Inziatari R., Bowden M., Fabre A., Oleary J., Finn SP., Loda M. and Pennington SR. Pathology-driven comprehensive proteomic profiling of the prostate cancer tumour microenvironment. *Mol Cancer Res* 2016; 15(3): 1–13.
5. Anonymus, 2017. Prostate Cancer Rates by Race and Ethnicity [online], <https://www.cdc.gov/cancer/prostate/statistics/race.htm>, [Ziyaret tarihi: 27/10/2017]. Centers for Disease Control and Prevention.
6. Shelley M., Wilt TJ., Coles B., Mason MD. Cryotherapy for localised prostate cancer. *Cochrane Db Syst Rev* 2007; 18(3): CD005010.
7. Woodhouse EC., Chuaqui RF., Liotta L.. General mechanisms of metastasis. *Cancer Supplement* 1997; 80(8): 1529-37.
8. Fraser SP., Salvador V., Manning EA., Mizal J., Altun S., Raza M., Berridge RJ., Djamgoz MBA. Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. *J Cell Physiol* 2003; 195: 479-87.
9. Lang F., Föllner M., Lang KS., Lang PA., Ritter M., Gulbins E., Vereninov, A., Huber, SM. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membrane Biol* 2005; 205: 147-57.
10. Ashcroft FM. From molecule to malady. *Nature* 2006; 440 (23): 440-7.
11. Conti M. Targetting ion channels for new strategies in cancer diagnosis and therapy. *Curr Clin Pharmacol* 2007; 2: 135-44.
12. Grimes JA., Fraser SP., Stephens GJ., Downing JEG., Laniado, ME., Foster CS., Abel PD., Djamgoz MBA. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett* 1995; 369: 290-4.
13. Grimes JA., Djamgoz MBA. Electrophysiological characterization of voltage-gated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. *J Cell Physiol* 1998; 175: 50-8.
14. Diss, JKJ., Stewart, D., Pani F., Foster CS., Walker MM., Patel A., Djamgoz MBA. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vitro. *Prostate Cancer P D* 2005; 8: 266-73.
15. Fraser SP., Diss, JKJ., Chioni, AM., Mycielska ME., Pan H., Yamaci RF., Pani F., Siwy Z., Krasowska M., Grzywna Z., Brackenbury WJ., Theodorou D., Koyuturk M., Kaya H., Battaloğlu E., Tamburo De Bella M., Slade MJ., Tolhurst R., Palmieri C., Jiang J., Latchman DS., Coombes RC., Djamgoz MBA. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5381-9.
16. Onkal L., and Djamgoz, MBA. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Na_v1.5 in breast cancer. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 206–19.
17. Nakajima T., Kubota N., Tsutsumi T., Ogurğ A., Imuta H., Jo T., Oonuma H., Soma M., Meguro K., Takano H., Nagase T., Nagata T. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 2009; 156(3): 420- 31.
18. Bennett ES., Smith BA., Harper JM. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Eur J Physiol* 2004; 447: 908-14.
19. Yu FH., Catterall WA. Overview of voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003; 4(3): 207/1-207/7.
20. Patino GA., and Isom LL. Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel beta subunits in development and disease. *Neurosci Lett* 2010; 486: 53–9.
21. Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol* 2002; 205: 575-84.
22. Diss, JKJ., Archer SN., Hirano J., Fraser SP., Djamgoz MBA. Expression profiles of voltage-gated Na⁺ channel α -subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 2001; 48: 165-78.
23. Nandana S., Chung LWK. Prostate cancer progression and metastasis: potential regulatory pathways for therapeutic targeting. *Am J Clin Exp Urol* 2014; 2(2): 92-101.
24. Nelson M., Yang M., Millican-Slater R., Brackenbury WJ. Na_v1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget* 2015; 20: 6(32).
25. Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membrane Biol* 2005; 205: 159-73.

26. Fiske JL., Fomin VP., Brown ML., Duncan RL., Sikes RA., Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metast Rev* 2006; 25: 493-500.
27. Djamgoz MBA. Biophysics of Cancer: Cellular Excitability (“CELEX”) Hypothesis of Metastasis. *J Clin Exp Oncol* 2014; S1:005.
28. Laniado ME., Lalani EN., Fraser SP., Grimes JA., Bhangal G., Djamgoz MBA., Abel PD. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol* 1997; 150(4): 1213-21.
29. Yildirim S., Altun S., Gumushan H., Patel A., Djamgoz MBA. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Lett* 2012; 323: 58-61.
30. Suy S., Hansen TP., Auto HD., Kallakury BVS., Dailey V., Danner M., Macarthur L., Zhang Y., Miessau MJ., Collins SP., Brown ML. Expression of voltage-gated sodium channel Na_v1.8 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *J Clin Exp Oncol* 2012; 1:1(2).