

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**MEME KANSERİNDE TAMOKSİFEN'İN POTASYUM KANAL
GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Bio. Pelin EROĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap YALIN

MERSİN-2013

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**MEME KANSERİNDE TAMOKSİFEN'İN POTASYUM KANAL
GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Bio. Pelin EROĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Serap YALIN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından BAP-SBE BK (PE) 2011-3 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:37

MERSİN-2013

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “**Meme Kanseriinde Tamoksifen’in Potasyum Kanal Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması**” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

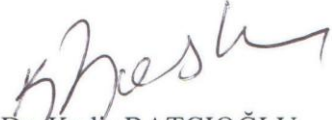
Tez Savunma Tarihi: 27.06.2013



Prof. Dr. Serap YALIN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU
İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 22.07.2013 tarih ve 2013/933 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Tez dönemim süresince benden yardım, bilgi ve desteğini esirgemeyen, tecrübeleri ile her türlü yardımda bulunan tez danışman hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Serap YALIN'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimime vermiş olduğu katkılardan ve tez izleme komitesindeki katkılarından dolayı Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN'a teşekkür ederim.

Çalışma boyunca gerekli bölüm olanaklarını sağlayan, yardım ve desteğini esirgemeyen Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, manevi desteğinden ve yardımlarından dolayı Sn. Arş. Gör. Fatma SÖĞÜT'e teşekkür ederim.

Bu çalışma sırasında fikirleri ve laboratuvar olanaklarından yararlanmam konusundaki katkılarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Necat YILMAZ'a, yardımlarından dolayı Sn. Arş. Gör. Derya YETKİN'e, Sn. Arş. Gör. Hülya DERVIŞOĞLU'na teşekkür ederim.

Gen ekspresyon çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Gürbüz POLAT'a ve Sn. Prof. Dr. Lülüfer Tamer GÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Tezimin istatistikleri ve bulgularının değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Sn. Yrd. Doç. Dr. Semra ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan sürekli destekleyen ve her zaman yanımda olan AİLEME sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım...

Pelin EROĞLU

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri	3
2.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi	4
2.4. Meme Kanseri Evrelemesi	5
2.5. Risk Faktörleri	9
2.5.1. Kalıtsal Faktörler	9
2.5.2. Hormonal Faktörler	10
2.5.3. Çevresel Faktörler	12
2.6. Meme Kanseri Tedavisi	14
2.7. Meme Kanseri Genetiği	15
2.7.1. BRCA1 ve BRCA2 Genlerinin Yapı ve Fonksiyonu	15
2.7.2. BRCA1 ve BRCA2 Nokta Mutasyonlar	17
2.7.3. Meme Kanseri ile İlişkili Diğer Gen Mutasyonları	18
2.7.3.1. p53	18
2.7.3.2. PTEN	18
2.7.3.3. Ataxia-telangiectasia (A-T)	19
2.8. İyon Kanalları	19
2.8.1. Voltaj-Duyarlı İyon Kanalları ve Kanser	22
2.8.1.1. Voltaj Duyarlı Na ⁺ Kanalları	22

2.8.1.2. TRP Kanalları	23
2.8.1.3. Voltaj Duyarlı Ca ²⁺ Kanalları	24
2.8.1.4. Voltaj Duyarlı K ⁺ Kanalları	24
2.8.2. Kanser Gelişiminde K ⁺ Kanallarının Rolü	25
2.8.3. Kanser Biyomarkırı Olarak K ⁺ Kanalları	26
2.9. HERG1 K ⁺ Kanalı	28
2.10. Yama Kenetleme	30
2.11. Tamoksifen	32
2.11.1. Meme Kanserinde Östrojen Reseptörü	33
2.11.2. Östrojen Reseptörü ve Tamoksifen	35
2.11.3. Tamoksifenin Faydaları ve Yan Etkileri	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı	38
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	38
3.2.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar	38
3.2.2. İlaç ve Toksisite Deneyinde Kullanılan Malzemeler	38
3.2.3. Gen Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kitler	39
3.2.4. Kullanılan Aletler	39
3.3. Kullanılan Ayraçlar	40
3.4. Kullanılan Yöntemler	41
3.4.1. Hücre Kültürü	42
3.4.2. MTT Testi	43
3.4.2.1. Sitotoksisite Analizi (MTT)	44
3.4.3. Elektrofizyolojik Kayıtlar	45
3.4.3.1. Pipetlerin Hazırlanması	45
3.4.3.2. Kayıt Sistemi	46
3.4.3.3. Uygulanan Voltaj Protokolü	47
3.4.3.4. Deney Grupları	47
3.4.4. Gen Ekspresyon Deneyleri	47
3.4.4.1. Primer Dizaynı	48
3.4.4.2. Total RNA Kiti ile RNA İzolasyonu	48
3.4.4.3. Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti ile cDNA Eldesi	49

3.4.4.4. Realtime Revers Transkriptaz PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi	49
3.5. İstatistiksel Analizler	51
4. BULGULAR	52
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	70
7. KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı (100.000'de Dünya standart nüfusu), Türkiye 2006-2008	5
Şekil 2.2.	Meme kanseri yaş insdansı	9
Şekil 2.3.	BRCA1 ve BRCA2'nin kromozomal lokasyonu	16
Şekil 2.4.	BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kodladığı proteinler	17
Şekil 2.5.	Voltaj kapılı iyon kanalları	21
Şekil 2.6.	İyon kanalları ve kanser türleri	26
Şekil 2.7.	HERG'in protein yapısı	29
Şekil 2.8.	Yama kenetleme yönteminde kayıt alma biçimleri	31
Şekil 2.9.	Tamoksifen sitrat	32
Şekil 2.10.	Östrojen davranış modeli	35
Şekil 3.1.	Yama kenetleme elektrofizyolojik kayıt sistemi	46
Şekil 3.2.	Zar için kenetleme potansiyel protokolü	47
Şekil 4.1.	MCF-7 hücrelerinin a) Konfluent olmamış hücreler b) Konfluent olmuş hücrelerin mikroskopik görünümü	52
Şekil 4.2.	Tamoksifen'in 24 saat sonunda MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	53
Şekil 4.3.	Tamoksifen'in 48 saat sonunda MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	54
Şekil 4.4.	5 µM tamoksifen uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları	56
Şekil 4.5.	10 µM tamoksifen uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları	57
Şekil 4.6.	20 µM tamoksifen uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları	57
Şekil 4.7.	Etil alkol uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları	57
Şekil 4.8.	5 µM tamoksifen grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20.	

	dakika akım voltaj eğrileri	58
Şekil 4.9.	10 μ M tamoksifen grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika akım voltaj eğrileri	59
Şekil 4.10.	20 μ M tamoksifen grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika akım voltaj eğrileri	60
Şekil 4.11.	Etil alkol grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika akım voltaj eğrileri	61
Şekil 4.12.	Ortalama akım değerlerinin grafik gösterimi	62
Şekil 4.13.	MCF-7 hücre hattında 24 saat sonunda HERG1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi	63
Şekil 4.14.	MCF-7 hücre hattında 48 saat sonunda HERG1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Meme kanseri sınıflaması	7
Çizelge 2.2.	Meme kanserinde evreleme sistemi	8
Çizelge 2.3.	Memeli hücrelerinin plazma membranında bulunan iyon kanallarının iki temel grubunun sınıflandırılması	20
Çizelge 2.4.	Memeli hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı temel beş elementin konsantrasyonu	21
Çizelge 2.5.	Kanserde iyon (Na^+) kanallarındaki ekspresyon değişiklikleri	23
Çizelge 3.1.	HERG1 K^+ kanalı gen ekspresyonunda kullanılan primer dizileri	48
Çizelge 3.2.	Beta Actin housekeeping gen ve HERG1 K^+ kanal gen ekspresyon analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları	50
Çizelge 3.3.	HERG1 gen ekspresyon analiz için uygulanan PCR koşulları	50
Çizelge 4.1.	MCF-7 hücre hattında HERG1 K^+ kanal geni için 24 ve 48 saatteki canlılık oranı, ortalamalar ve p değerleri	55
Çizelge 4.2.	MCF7 hücrelerinden elde edilen akım değerleri ortalamaları	62
Çizelge 4.3.	MCF-7 hücre hattında HERG1 K^+ kanal geni için 24 ve 48 saatteki gen ekspresyon oranı, ortalamalar ve p değerleri	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BRCA1	Meme Kanseri Geni 1
BRCA2	Meme Kanseri Geni 2
Bp	Baz Çifti
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
E2	17-östradiol
EAG	Ether-a-go-go
ERα	Östrojen Reseptör-alfa
HERG	Ether-a-go-go ilişkili gen
HRT	Hormon Replasman Tedavisi
kDa	Kilo Dalton
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeiltetrazolium bromid
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REAL-TIME PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit

ÖZET

Meme Kanserinde Tamoksifen'in Potasyum Kanal Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması

İyon kanalları sinir ve kas hücrelerinde elektriksel aktivitenin üretimi, hücre içi sinyal, hormon sekresyonu, hücre proliferasyonu ve hücre hacim düzenlenmesi gibi temel fizyolojik fonksiyonlarda hayati rol oynar. İyon kanallarının plazma membranında en çok çeşite sahip kanalları potasyum (K^+) kanallarıdır. Voltaj bağımlı K^+ kanallarının özellikle epitel kökenli tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisinin olduğu gösterilmiştir. Voltajla aktive olan K^+ kanallarından biri de HERG1'dir. HERG1 K^+ kanalı tümör hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde ve hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli bir rol oynar. K^+ kanal blokörleri hücre proliferasyonunu inhibe ederler. Klinikte meme kanseri tedavisinde bir anti-kanser ajan olarak kullanılan tamoksifen K^+ akımını ve hücre proliferasyonunu önemli derecede inhibe etmektedir. Bu çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattında tamoksifenin HERG1 K^+ kanal gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) tamoksifenin sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat için 20 μ M konsantrasyondaki tamoksifenin IC_{50} değeri 31,9 olarak bulunmuştur. Elektrofizyolojik analiz için yama kenetleme yöntemi kullanılmış, K^+ kanal akımlarında en fazla azalma tamoksifenin 5 μ M konsantrasyonunda gözlenmiştir. HERG1 K^+ kanal gen ekspresyonu Real-Time PCR ile analiz edilmiştir. 5 μ M konsantrasyonda gen ekspresyonu azalmış, artan tamoksifen konsantrasyonuna bağlı olarak gen ekspresyon düzeyi artmıştır. Tamoksifenin düşük doz konsantrasyonunda (5 μ M) K^+ kanal aktivitesinin azalması ve gen ekspresyonunun düşmesi tamoksifenin HERG1 K^+ kanalları üzerine bloke edici etkisini düşündürmekle birlikte, bu çalışmada tamoksifenin bloke edici etkisi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: İyon kanalları, HERG1 K^+ kanalı, MCF-7, MTT, yama kenetleme, gen ekspresyonu.

ABSTRACT

An Investigation of the Effect of Tamoxifen on Potassium Channel Gene Expression in Breast Cancer

Ion channels play a vital role in basic physiological functions such as generation of electrical activity in nerves and muscle, intracellular signaling, hormone secretion, cell proliferation, cell volume regulation. Potassium (K^+) channels are a most diverse class of ion channels in the plasma membrane. It is shown that voltage dependent K^+ channels are associated with tumor cell proliferation in particular if they are epithelium originated. One of the voltage activated K^+ channels is HERG1. HERG1 K^+ channels play important roles in regulating tumor cell proliferation, and cell cycle progression. K^+ channel blockers inhibit cell proliferation. In clinics, tamoxifen being used for the treatment of breast cancer significantly inhibits K^+ current and cell proliferation. In this study, we investigated the effect of tamoxifen on HERG1 K^+ channel gene expression in MCF-7 breast cancer cell. Cytotoxic effect of tamoxifen at different concentrations (0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) was evaluated for MCF-7 breast cancer cell line using MTT assay. Cells were incubated 24h and 48h. IC_{50} value is measured as 31.9 for 48 hours and 20 μ M concentration. For electrophysiological analysis patch-clamp experiments were conducted. The maximum reduction in K^+ channel current was observed 5 μ M concentration of tamoxifen. The levels of HERG1 K^+ channel gene expression were analyzed by using Real-Time PCR technique. While the gene expression levels observed to be decreased with 5 μ M tamoxifen concentration, depending on its increasing concentrations the levels of gene expressions increased. Although, decreased activity and gene expression of K^+ channel at low concentration (5 μ M) of tamoxifen give insight into tamoxifen's inhibitory effect on HERG1 K^+ channels, in this study this inhibitory effect of low concentration of tamoxifen on HERG1 K^+ channels was not statistically significant compared to control group.

Key Words: Ion channels, HERG1 K^+ channel, MCF-7, MTT, patch clamp, gene expression.

1. GİRİŞ

Kanser ölümcül hastalıklar içerisinde sıklık açısından kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelmektedir. Genetik hipotez olarak kanser, genetik hasara uğrayabilen progenitör hücrenin klonal büyümesi ile ortaya çıkan tümoral bir kitle olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücreleri kanser gelişiminin her aşamasında edindikleri mutasyonlarla yeni özellikler kazanırlar (1). Kanser hücreleri ve onların bölünerek oluşturdukları yeni hücreler normalde bulunan kontrol mekanizmalarını aşarak onlara rağmen ürerler ve normalde diğer hücreler için ayrılmış olan bölgeleri işgal edip buralara yerleşirler (2).

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü ve önemli bir ölüm nedenidir. Kanserden ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (3). Meme kanseri vakalarının büyük çoğunluğunda etiyoloji bilinmemektedir. Hastalık için çok sayıda risk faktörleri belirlenmiştir. Bunlar arasında, ilerleyen hasta yaşı, erken menarş, genç menopoz, uzamış hormon replasman tedavisi gibi çeşitli faktörler sayılabilir (4).

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü, normal vücut fonksiyonundan sorumlu iki önemli mekanizmadır. Anormal bir şekilde artmış proliferasyon ya da bozulan hücre ölümü hücre büyümesinde kontrol kaybına ve bunun sonucu olarak tümör oluşumuna sebep olmaktadır (5).

İyon kanalları belli iyonların hücre içi ve hücre dışına pasif geçişlerine izin veren integral membran proteinleridir (6). İyon kanalları elektriksel sinyal, hacim düzenlenmesi, kas kontraksiyonun kontrolü ve hormon sekresyonu olmak üzere bir çok fizyolojik fonksiyona sahiptirler. Bu faydalı aktivitelere ek olarak membranda bulunan iyon kanallarının hücre proliferasyonunda ve kanser gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir. Bu durum başlangıç olarak potasyum (K^+) kanalları ile gösterilmiş ve bunu diğer katyon kanalları ve Klor (Cl^-) kanalları takip etmiştir (7).

Tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerine özellikle epitelyum kökenli olmak üzere voltaj duyarlı K^+ kanallarının etkili olduğu gösterilmiştir (8). Human ether-a-go-go HERG ($Kv11.1$) kanalları evrimsel olarak korunmuş multigenik voltajla aktive olan bir K^+ kanal ailesi olan EAG ailesine aittir (9).

K^+ kanal blokörleri hücre proliferasyonunu inhibe ederler. Farklı toksinler ve bileşikler hücre gelişiminde bir azalmaya neden olarak farklı fazlarda hücre siklusunu durdururlar (10, 11). Klinikte kullanılan ve bir antikanser ajanı olan tamoksifen, önemli derecede K^+ akımını ve proliferasyonunu inhibe etmektedir (5). Tamoksifen, meme kanseri tedavisinde kullanılan bir östrojen reseptör antagonistidir (12). Hücre proliferasyonunda tamoksifenin etkisi dinlenme durumundaki K^+ akımındaki tamoksifenin etkisiyle ilişkilidir. Tamoksifenin antitümör aktivasyonu K^+ kanalları ile etkileşiminden dolayı olmaktadır (5).

Çalışmamızın amacı; meme kanseri hücre kültüründe (MCF-7) antikanser özelliğe sahip olan tamoksifenin HERG1 K^+ kanal gen ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, düzensiz hücre proliferasyonu ve hücre ölümüne neden olan gen ekspresyonundaki birden fazla değişiklik sonucu hücrelerin anormal büyümesi olarak tanımlanabilir. Bu nedenle dokuları istila edebilen hücrelerin sayıları artmakta uzak bölgelerde metastaza neden olmaktadır. Multipl genlerin ekspresyonundaki değişiklikler kansere neden olmaktadır. Bu da hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması gibi normal hücre programının bozulmasına yol açar. Bu hücre çoğalması ve hücre ölümünde dengesizlik tümör hücre popülasyonunun genişlemesine yol açar. Normal dokularda hücre çoğalması ve hücre kaybı denge halindedir (13). Tümör hücreleri çoğunlukla bol miktarda DNA taşıyan, çekirdek/sitoplazma oranları artmış, kromatinleri topaklanmış, değişik mitotik şekiller sergileyen hücrelerdir. Kansere, çok genli (onkogen, tümör baskılayıcı genler, onarım genleri), çok faktörlü (U.V, radyasyon, virus, hormon, beslenme) çok aşamalı bir süreçle oluşur (1). Son yıllarda epigenetik değişikliklerin de hücrenin malign karakter kazanmasında önemli rol oynadığı anlaşılmıştır (13).

Sonuç olarak, kanser anormal gen ekspresyonunun bir hastalığıdır. Bu gen ekspresyonuna neden olan çok sayıda mekanizma vardır. Bu mekanizmalar; gen mutasyonu, translokasyonlar, amplifikasyon, delesyon, heterozigot kaybı gibi DNA'da meydana gelen değişikliklerdir. Ayrıca anormal gen transkripsiyonu ya da translokasyonu da gen ekspresyonunda değişikliğe neden olan mekanizmalardandır. Hücre çeşitliliğine bağlı olarak gerek davranış gerekse tedaviye cevap verme yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü vardır (13).

2.2. Meme Kanseri

Bütün dünyada görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında akciğerden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanserlerinin görülme sıklığı coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir (14).

Meme kanseri, memenin terminal kanalı ve lobular birimindeki hücrelerin anormal gelişimi ve kontrolsüz bölünmesi sonucu gelişen bir malignensidir. Meme tümörü malign ya da benign olabilir. Benign tümör vücudun uzak bölgelerine yayılabilme yeteneğinden yoksundur. Malign tümörde kanser hücreleri normal dokuların etrafını kuşatır ve o bölgeye zarar verir. Kan ve lenf sıvısı aracılığıyla vücudun yeni bölgelerinde metastaza uğrar. Metastatik hedefler, akciğer, lenf nodu, karaciğer, kemik, beyin ve ovaryum doku ve organlarıdır (15,17). Meme kanseri genellikle meme dokusunda bir kitle şeklinde ortaya çıkar fakat memedeki kitlelerin çoğu kanserli değildir. Meme kanseri gelişme riski tüm yaşam boyunca kadınlarda % 7-10 arasındadır, yaklaşık her 10 ile 14 kadından bir tanesi meme kanserine yakalanmaktadır. Tüm meme kanserleri olgularında erkek meme kanseri oranı ise % 1'den daha azdır (18). Östrojen meme kanserini riskini arttıran bir faktördür ve erkeklerde östrojen seviyesinin düşük olması meme kanserine yakalanma risklerini azaltır. Meme kanseri 25 yaşın altında nadirdir ve görülme sıklığı yaşla orantılı olarak artar. En sık 45-74 yaşları arasında görülür (19). Evreleme bakımından heterojen bir grup olan meme kanserinin uygun tedavi için hangi evrede olduğunun tespit edilmesi gerekmektedir (20).

2.3. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi

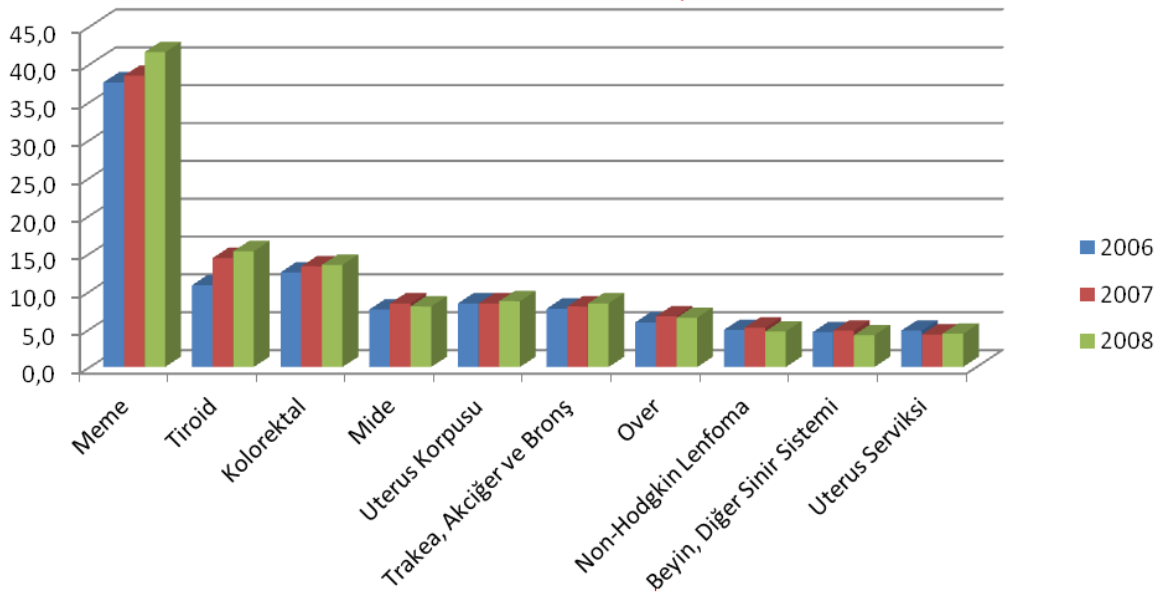
Batı ülkelerinin çoğunda ve Amerika'da kadınlarda görülen kanser tiplerinden en yaygın kanser türüdür (21). GLOBOCAN 2008 (IARC)'e göre 2008 yılında 1,383.523 yeni kayıtlı meme kanseri olgusu bulunmaktadır ve dünya çapında meme kanseri nedeniyle ölenlerin sayısı ise 458.367'dir (22). 2012'de tahmin edilen yeni olgu sayısı 229.060 ve ölüm oranı ise 39.920 olarak tahmin edilmektedir (14).

Mortalite ve morbidite verileri ülkelere göre değişiklik gösterir. Amerika'da 2005-2009 yılları arasında meme kanserine bağlı ölüm oranı % 23 olup akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır (23). Batı ülkelerine kıyasla meme kanseri insidansı Asya'da daha düşüktür. Uzakdoğu, Orta ve Doğu Avrupa'da oranlar tarihsel bakımdan nispeten daha düşük olmuştur. Fakat zamanla hızlı bir şekilde artış gözlenmiştir. Bu artışa; yaşam tarzı değişiklikleri, beslenme gibi bazı sebeplere bağlı

olarak mensturasyonun erken yaşta başlaması, daha ileri doğum yaşı, hormon replasman tedavisi (HRT), menopoz yaşının gecikmesi neden olarak gösterilmektedir (24, 25). Özellikle kolorektal ve meme kanserlerinde erken tanı ve tedavi mortalitenin azalmasına katkı sağlamaktadır (23).

Ülkemizde mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklık verilebilir. Bu sıklık farkı, batı Türkiye'deki yaşamın Avrupa'dakine benzerliğinden kaynaklanmaktadır (26).

T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, Türkiye'de kadınlarda en sık rastlanan kanser türünün meme kanseri olduğu bildirilmiştir. 2006 yılında meme kanseri insidansı % 37,6 iken 2008 yılında bu oran % 41,6'ya ulaşmıştır. Diğer kanser türleri ise sırasıyla tiroid, kolorektal, mide, uterus ve akciğerdir (Şekil 2.1) (26).



Şekil 2.1. Kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı (100.000'de Dünya standart nüfusu), Türkiye 2006-2008 (26).

2.4. Meme Kanseri Evrelemesi

Meme kanseri, histolojik görünümüne ya da tümör evresi göre sınıflandırılabilir. Tümör evrelemesi yapılmasındaki amaç, farklı prognostik alt gruplardaki meme kanseri

hastalarını ayırmaktır. Ayrıca hastalığın seyri ve uygulanacak tedavisinin belirlenmesinde evreleme yapılması şarttır (27).

Meme kanserinin histopatolojik sınıflaması

I- Meme başının Paget hastalığı

II- Meme duktusları karsinomu

A-Noninfiltratif

B-İnfiltratif

1-Prodüktif fibrozis ile birlikte olan adenokarsinoma

2-Medüller karsinom

3-Komodo karsinom

4-Kolloid karsinom

5-Papiller karsinom

6-Tübüler karsinom

III- Lobüler karsinom

A- Noninfiltratif

B- İnfiltratif

IV- Memenin nadir karsinomları

V- Meme sarkomu (28).

Evrelemede en çok kullanılan sistem American Joint Committee on Cancer Staging (AJCC) TNM sınıflandırmasıdır. Prognostik alt gruplar T, N, ve M kategorilerinden oluşmaktadır. T evresi, komşu doku invazyonunun var olup olmadığının yanı sıra tümörün invaziv bileşenlerinin boyutunu ifade eder. N evresi, bölgesel lenf nodlarının yayılımını belirtir. M evresi ise hastalığın lökale ve yaygın olup olmadığını ifade etmektedir (Çizelge 2.1) (29). Çeşitli defalar değiştirilen bu evrelemenin halen 2006 yılında düzenlenen son hali kullanılmaktadır (30).

Çizelge 2.1. Meme kanseri sınıflaması (29).

2006 AJCC TNM SINIFLAMASI	
Primer Tümör: T (Tümörün makroskopik görünümü)	
Tx	Değerlendirilemeyen primer tümör
To	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis	İn sitü karsinom
Tis (DCIS)	Duktal karsinoma
Tis(LCIS)	Lobüler karsinoma in situ
Tis (Paget)	Meme başının Paget hastalığı (primer başka tümör yok)
T1	En büyük çapı < 2cm tümör
T1mik	Mikroinvazyon; en büyük çapı <0,1 cm tümör
T1a	0,1 cm< Tümör çapı <0,5 cm
T1b	0,5 cm< Tümör çapı <1,0 cm
T1c	1 cm< Tümör çapı <2 cm
T2	2 cm< Tümör çapı< 5 cm
T3	Tümör çapı >5 cm
T4	Aşağıda belirtilen dokulara direkt yayılımı olan herhangi büyüklükte tümör
T4a	Pektoralis majör kası dışında göğüs duvarına yayılım
T4b	Ödem, “peau d’orange”, cilt ülserasyonu veya satellit cilt nodülleri
T4c	T4a ve T4b
T4d	İnfamatuvar karsinom
Bölgesel Lenf Nodları: N (Klinik Sınıflama)	
Nx	Değerlendirilemeyen nodal tutulum (örn: daha önce çıkarıldığı için)

Çizelge 2.1. Meme kanseri sınıflaması (29) (devam).

No	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
N1	Hareketli, ipsilateral bölgesel lenf nodu metastazı
N2	Komşu dokulara yapışık ipsilateral aksiler lenf nodu metastazı
N3	İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı veya ipsilateral internal mammaryan lenf nodu metastazı + aksiler lenf nodu metastazı veya subraklaviküler lenf nodu
Uzak Metastaz: M	
Mx	Değerlendirilemeyen uzak metastaz
Mo	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Meme kanserinde TNM sınıflamasına göre evrelerin gruplandırılması Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (30).

Çizelge 2.2. Meme kanserinde evreleme sistemi (30).

EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE I	Tmik	N0	M0
	T1	N0	M0
EVRE IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
EVRE IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
EVRE IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
EVRE IIIC	T1-4	N3	M0
EVRE IV	T1-4	N0-3	M1

2.5. Risk Faktörleri

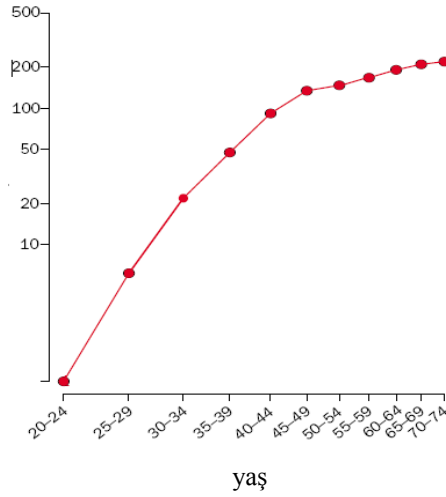
Meme kanserine neden olan çok sayıda risk faktörü sayılmıştır. Bunlar kalıtsal, hormonal ve çevresel faktörler olarak sınıflandırılabilir.

2.5.1. Kalıtsal Faktörler

Yaş

Meme kanseri insidansı yaş ile birlikte hızlı bir şekilde artmaktadır. Menopoz yaşından sonra (ortalama 50) artış yavaş seyretmektedir (Şekil 2.2). Avrupa ve Kuzey Amerika'da kadınlar arası meme kanseri insidansı 55 yaş için % 2,7, 65 yaş için % 5, 75 yaş için ise % 7,7 olarak saptanmıştır (31).

İnsidans oranı/100.000



Şekil 2.2. Meme kanseri yaş insidansı (31).

Aile öyküsü

Aile öyküsünün meme kanseri yakalanma riskine katkı sağladığı bulunmuştur. Meme kanseri saptanmış olan kişilerle birinci dereceden akraba olan kadınlarda (anne veya kızı, kız kardeş) bu riskin 2 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Meme kanserli hastalarla ikinci dereceden yakınlıkları bulunan kişilerde de riskin arttığı belirlenmiş ancak bu kişilerdeki risk oranının daha az olduğu gözlenmiştir (31, 32).

Genetik faktörler

Şimdiye kadar meme kanserine genetik yatkınlığı olan en az beş germline mutasyon saptanmıştır. Bunlar; BRCA1, BRCA2, P53, PTEN ve ATM genlerindeki mutasyonlar belirlenmiştir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonların meme kanseri ve özellikle ovaryum kanserinde rol oynadığı bilinmektedir (31).

Kalıtsal meme kanseri ile ilişkilendirilen sendromlar arasında şunlar yer almaktadır:

- Kalıtsal meme ovaryen kanser sendromu (BRCA1, BRCA2 mutasyonu)
- Li Fraumeni Sendromu
- Peutz Jeghers Sendromu
- Cowden hastalığı
- Muir Torre Sendromu (33).

2.5.2. Hormonal Faktörler

Östrojen

Meme epitel dokusunun normal büyüme ve gelişmesinin kontrolünü sağlayan östrojen hormonunun en aktif formu östradioldür. Kanda iki şekilde bulunmaktadır. Bunlardan serbest östradiol meme dokusu için hazır olan formudur ve meme kanseri için total östradiolden daha fazla risk taşımaktadır (33).

Erken yaşıta menarş, geç menopoz, gibi nedenler 6strojenin etkisine maruz kalma s6resini uzatmaktadır. Buna ek olarak ilk doğumunu 20 yaşından 6nce yapan kadınlar, hiç doğum yapmamış ve doğumunu 30 yaşından sonra yapan kadınlarda meme kanser riski artmaktadır (34, 35).

Menarş yaşı ve menopoz

Menarş yaşı meme kanseri riskini etkileyen fakt6rlerden biridir. Menarşıta her bir yıllık gecikeme için meme kanseri riski % 5 oranında azalmaktadır. Meme kanseri menarş yaşı ile ilgili olmasına rağmen b6t6n yaşılarda meme kanseri riski vardır ancak etki geç kadınlarda (premenopozal) daha g6l6 olabilir. Geç menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski menstruasyonu erken sona eren kadınlara g6re daha fazladır (31). Bunun aksine geç menarş ve erken menopoz bu riski aynı oranda azaltmaktadır (36).

Hamilelik

Hiç doğum yapmamış kadınlarda meme kanseri riskinin 1,4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (37). Kadınlarda ilk çocuğunu doğurma yaşı meme kanseri açısından 6nemlidir. İlk hamileliğin uzun yıllar prolaktinin d6ř6k seviyede tutulmasına katkı sağladığı g6sterilmiştir. Prolaktin d6zeyinin, doğum yapmış kadınlarda doğum yapmamış kadınlara g6re daha d6ř6k olduğu saptanmıştır (38).

Hormon replasman tedavisi (HRT)

Postmenopozal hormonlar, osteoporoz gibi klinik hastalıkların riskini azaltmak için 6rneğin sıcak basması ve uykusuzluk gibi menopozal sendromların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak postmenopozal hormonların kullanım s6resi artan meme kanseri ile ilişkilendirilmektedir. G6receli bu risk tek başına 6strojen için 1,06 6strojen

artı progestin için ise 1,24 kat arttığı gösterilmiştir (39). Yapılan çalışmalarda östrojene progestinin ilavesi ile beş yıllık bir kullanım sonunda meme kanseri riskinin % 10'dan % 30'a yükseldiği belirlenmiştir. Bunun aksine tamoksifen meme kanseri riskini azaltmaktadır (40).

2.5.3. Çevresel Faktörler

Beslenme

Günlük gıdalar çok çeşitli doğal bileşiklerin yanı sıra karsinojenler ve antikarsinojenler içermektedir (41). Karsinojenler serbest oksijen radikalleri oluştururlar bu da DNA hasarına yol açar ya da diğer zararlı bileşiklerin oluşmasına neden olur. Örneğin; yağ bakımından zengin besin tüketiminin meme kanserine riskinin artmasına neden olduğu düşünülmektedir (42, 43). Yapılan birçok çalışmada doğal vitamin bakımından zengin besinler, meyve ve sebze alımı meme kanseri riskini azaltmaktadır ve postmenopozal kadınlarda önemli koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Liften zengin gıdalarla beslenmenin barsaktan östrojenin reabsorbsiyonunu durdurarak meme kanseri gelişimine karşı önleyici etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir (38).

Alkol alımı

Bazı epidemiyolojik çalışmalar alkol tüketiminin hem premenopozal hem de postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığını göstermiştir. Alkol tüketenlerde bu riskin alkol tüketmeyenlere kıyasla 1.6 kat arttığı belirlenmiştir (44). Etanolün kendisi bir karsinojen değildir ancak potansiyel karsinojenik bileşiklere metabolize olur. Örneğin; asetaldehit ve serbest radikaller gibi. Asetaldehit DNA ve proteinleri bağlayabilen çok iyi karakterize olmuş karsinojen ve mutajendir. Ayrıca folat yıkımı ve ikincil hiperproliferasyon ile sonuçlanır (45). Kronik alkol tüketimi pre ve postmenopozal kadınlarda serum östrojen seviyesinin artmasına neden olur. Meme kanseri hücreleri invitro olarak alkole maruz bırakıldığında hücre göçü ve hücre

invazyonunun uyarıldığı gösterilmiştir. Etanol E2 (17-östradiol) stimülasyonu ve ER α (östrojen reseptör-alfa) aktivitesini 10-15 kat arttırmakta ve ER α protein seviyelerinde 2,5-3 kat artışa neden olmaktadır (44, 46). Ayrıca alkol bağışıklık sistemini bozabilmekte, folat, vitamin E, vitamin B12, vitamin D, çinko, selenyum gibi besinsel eksikliğe yol açmakta ve böylece kanser ile mücadele etme yeteneğini bozmaktadır (47).

Sigara

Sigara bir çok kanser türü ile ilişkilidir. Meme kanseri için de bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar sigara içmenin pre- ve postmenopozal kadınlarda farklı etkilere neden olabileceğini göstermiştir. Sigaranın antiöstrojenik bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Sigara içmeyenlere kıyasla sigara kullanan kadınların doğal menoz evresinin daha erken yaşta olduğu gözlenmiştir. (48, 49). Öte yandan yapılan araştırmalar, sigara dumanındaki karsinojenlere maruz kalmanın meme kanseri riskini arttırabileceğini varsaymaktadır. Bu karsinojenler yağda çözünebilir, meme yağ dokusunda depolanabilir (50).

Radyasyona maruz kalma

Radyasyon maruziyetinin meme kanseri riskini arttırdığı gözlenmiştir. Ergenlik döneminde ve erken yetişkinlik döneminde radyasyonun meme kanseri riskini arttırdığı düşünülmektedir; fakat menopoza yaklaşan kadınlarda bu risk azalmaktadır (51).

2.6. Meme Kanserinin Tedavisi

Cerrahi tedavi

Meme cerrahisinin amacı, meme ve lenf bezlerinde bulunan kanserli hücreleri ve tümörü almaktır. Lumpektomi operasyonunda, kanserli kitle ve onun etrafından bir miktar sağlıklı göğüs dokusu alınır; basit ya da toptan mastektomi'deyse göğsün tamamı alınır. Değiştirilmiş radikal mastektomi operasyonunda göğsün tamamı ve koltuk altı lenf bezleri alınır, ancak radikal mastektomide olduğu gibi göğsün altında göğüs duvarında bulunan göğüs kasları alınmaz. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki, lumpektomi ve ardından uygulanan radyasyon tedavisi pek çok durumda mastektomi kadar etkindir (52, 53).

Kemoterapi

Kemoterapi, antikanser (sitotoksik) ilaçlar kullanılarak kanser hücrelerinin büyümesinin engellenmesi veya kontrol altına alınmasıdır. Kemoterapi genellikle diğer tedavileri tamamlamak amacı ile yapılır, bu tip kemoterapiler adjuvant kemoterapi olarak adlandırılırlar. Genellikle cerrahi tedavi sonrası ve radyoterapi öncesi verilir. Cerrahi tedavi ya da radyoterapi meme kanserinin bölgesel (göğüs) tedavisini amaçlamaktadır. Kemoterapi damar içine verilebildiği gibi tablet ya da kapsül olarak ağızdan da verilebilir. Kas ya da deri altına veya tümör bölgesine doğrudan enjeksiyon şeklinde de verilen kemoterapi ilaçları da vardır. Ancak primer meme kanserleri için intravenöz olarak uygulanır (53).

Radyoterapi

Radyasyon (ışın) tedavisi cerrahi tedavi sonrası meme bölgesi, koltuk altında kanser hücrelerini azaltmak ve hücreleri öldürmek için kullanılır. Cerrahi tedavi öncesi

tümörün boyutunu küçültmek için de kullanılabilir. Radyoterapi sağlıklı hücrelere de etki eder ancak genellikle bu hücreler kendini yenileyebilir ve tamir edebilir. Sağlıklı hücrelere zararı önlemek için radyoterapi düzenli ve küçük dozlarda verilmelidir. Teknolojik gelişmeler sayesinde bu tedavini hassas ve istenilen bölgeye odaklanarak daha başarılı sonuçlar elde edilmesine katkı sağlanmıştır (53).

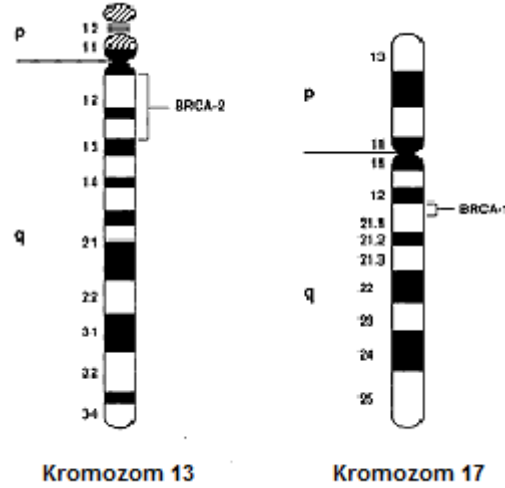
2.7. Meme Kanseri Genetiği

Meme kanserleri kalıtsal ya da sporadik olabilir. Olguların büyük bir kısmı sporadik olmakla birlikte kalıtsal ya da ailesel meme kanserleri tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır (54). BRCA1, BRCA2, p53 ve ATM, CHEK 2 ve PTEN gibi yüksek penetrasyon meme kanseri yatkınlığı olan genlerdeki germline mutasyonların kalıtsal meme kanseri için yüksek oranda bir risk oluşturduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte bu genlerin mutasyon frekansı genel populasyon içinde düşük orandadır. Bu genlerin mutasyonu tüm meme kanseri için yaklaşık % 5-10 civarındadır (55, 56).

2.7.1 BRCA1 ve BRCA 2 genlerinin yapı ve fonksiyonu

BRCA1 geni 1994'te keşfedilen bir tümör supressör geni olup 17q21 kromozomu üzerinde lokalizedir (Şekil 2.3) (57). 24 eksonu vardır. BRCA1'in ekson 11'i 1863 aminoasitlik proteinin % 61'ini kodlar. Sporadik tümörlerde, BRCA1 proteinin düşük ekspresyonu sporadik meme kanseri için bu genin önemini arttırmıştır. Son 10 yılda bu genlerin tümör supresyon mekanizmalarının yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. İkinci büyük meme kanseri yatkınlık geni olan BRCA2, kromozom 13q12.3 üzerinde bulunur (Şekil 2.3) (57, 58). 27 eksondan oluşur ve ekson 11 oldukça büyüktür. Moleküler ağırlığının 384 kDa olduğu tahmin edilen 3418 amino asitlik bir proteini kodlar. BRCA2'nin önemli bir özelliği de 30-80 amino asit tekrarının (BRC tekrarları) sekiz kopyasının bulunmasıdır. (Şekil 2.4) (59). Ekson 11, BRCA2'nin tamir

yolunda görev alan RAD51 olarak bilinen rekombinaz enzimin işlevini kontrol ettiği bilinmektedir (60).

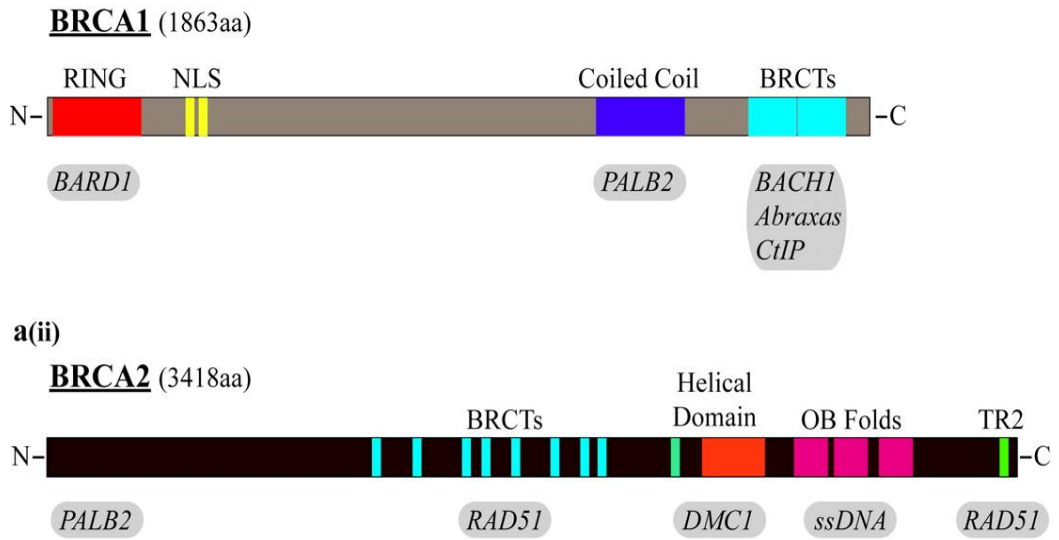


Şekil 2.3. BRCA1 ve BRCA2'nin kromozomal lokasyonu (61).

BRCA1 ve BRCA2 proteinleri DNA onarımı dahil olmak üzere homolog rekombinasyon, hücre döngüsü kontrol noktalarının düzenlenmesi ve transkripsiyonel regülasyon olmak üzere pek çok işleve sahiptir (62). BRCA1 ve BRCA2 genleri DNA tamirinde doğrudan bir role sahiptir. BRCA2 ve RAD51 ile etkileşim halindedir (63). Ayrıca BRCA1'de RAD51 proteini ile etkileşime girerek homolog rekombinasyona ve DNA hasarına yanıtta katkıda bulunur. BRCA1 ve BRCA2'nin her ikisinde çift iplikli DNA'nın tamirinde görev alırlar. BRCA1, transkripsiyonel tamirinde nükleotid eksizyon tamirinde ve crosslink tamirinde görev alır (58, 64).

BRCA1 ve BRCA2 genleri kromozomal yapının korunmasında önemlidir. Bu genler translokasyon ve delesyon gibi tüm kromozomal yeniden düzenlenmelerde (GCR) önemli bir yere sahiptir (65, 66, 67). Bu nedenle BRCA1 ve BRCA2 genomik bütünlüğün sağlanmasında koruyucu bir rol oynamaktadır. BRCA1'in diğer bir fonksiyonu ise kontrol noktalarında görev alıyor olmasıdır. BRCA1'in karboksi terminalindeki BRCT bölgesi DNA tamirinde ve/veya hücre döngüsü kontrol noktalarında görev alır (Şekil 2.4). Ayrıca BRCA1 proteini sentrozamla da ilişkilidir ve

sentrozomun aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Sentrozomun hiperamplifikasyonu sıklıkla ileri evre meme kansinomalarında saptanmıştır. Buna ek olarak BRCA1 S ve G2 evresinin kontrol noktasında işlev görür (68, 69).



Şekil 2.4. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin kodladığı proteinler (70).

BRCA1 çok fonksiyonlu bir proteindir ve birçok normal hücrel fonksiyona dahil olur. Bununla birlikte BRCA1'in varlığı veya yokluğu kemoterapiye hücrel yanıtı etkiler (71).

BRCA1 apoptozise yatkınlığı düzenler. BRCA1in ektopik ekspresyonu farklı hücre tipinde apoptozisi indüklemektedir. Eksojen BRCA1 sitotoksik ajanlar tarafından indüklenen apoptozise hassasiyeti arttırdığı düşünülmektedir. BRCA1'in transkripsiyonel represör ve aktivatörlerle etkileşerek genlerin birçok tipini regüle ettiği bulunmuştur (72, 73).

2.7.2. BRCA1 ve BRCA2 nokta mutasyonları

BRCA1 ve BRCA2 genleri yüksek penetrasyonlu otozomal dominant genlerdir. Bunların her ikisi de kalıtsal meme kanserinden sorumlu genlerdir. Bu genlerdeki

mutasyonlar önemli ölçüde bir kadının ömrü boyunca meme kanserine ve ovaryum kanserine yakalanma riskini artırır. Her iki gendeki germline mutasyonlar bütün meme kanserlerinin yaklaşık % 5-10'unu oluşturur. BRCA1'deki bir mutasyonda meme kanserinin kümülatif riski otuz yaşında % 3, kırk yaşında % 19, elli yaşında % 40,51, altmış yaşında % 50,54, yetmiş yaşında ise % 85 civarındadır. BRCA 2 mutasyonu taşıyanlarda risk oranı ise elli yaşında % 32, yetmiş yaşında % 70 ve doksan yaşında % 80'dir (74). BRCA1 mutasyonuna sahip kadınlarda meme kanserine ek olarak ovaryum kanseri riski de artmıştır. Çok daha az ölçüde erkeklerde prostat kanseri riski artmaktadır (75).

BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında erkeklerde ve kadınlarda meme kanseri risk yüksektir. Bunun yanında ovaryum, prostat pankreas, safra kesesi, mide kanseri ve melanoma gibi kanserler içinde risk teşkil etmektedir (76).

2.7.3. Meme kanseri ile ilişkili diğer gen mutasyonları

2.7.3.1. p53

p53 geni 17p13'de lökaleze nükleer bir fosfoproteindir. Hücre siklusunun düzenlenmesinde, DNA hasarının onarılmasında ve apoptozisde görev almaktadır. Bütün insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan tümör supressör genlerden biri de p53'tür. Sporadik meme kanserinin yaklaşık % 20-40'ında p53 geninde mutasyon gözlenir. p53 mutasyonu Li-Fraumeni sendromlu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Malkin ve ark. klasik Li-Fraumeni sendromlu ailelerin yaklaşık yarısında germline p53 mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir (36, 77).

2.7.3.2. PTEN

Cowden's sendromu proliferatif lezyonlar, ovaryum, meme ve tiroid kanserine yatkınlıkla karakterize olan otozomal dominant bir sendromdur. Taşıyıcı kadınların %

20-30'da meme kanseri gelişir. Bu sendroma kromozom 10q23.3 lokalize PTEN tümör supressör genindeki bir mutasyon neden olur. Şu ana kadar germline ve somatik PTEN mutasyonları meme kanserinde tespit edilmiştir. Cowden's sendromlu kadın hastalarda meme kanseri insidansının arttığı ve bu nedenle PTEN geninin ailesel meme kanserinde bir rol oynadığı düşünülmektedir (36, 78, 79).

2.7.3.3. Ataxia-telangiectasia (A-T)

Germline ATM gen mutasyonu genel popülasyonun % 0,5'ni oluşturur. ATM geni hasarlı DNA'nın tamirinde görev alır. Ataxi-telangiectasia (AT), ATM geninde mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir durumdur (80). Bunun yanında ATM genindeki homozigot mutasyonlar sonucu serebellar ataksi, immün yemezlilik ve kansere yatkınlık gelişmektedir (36). AT taşıyıcılarında meme kanseri riskinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Normal popülasyonla kıyaslandığında heterozigot taşıyıcılarda, meme kanseri riski beş kat artmıştır (80).

2.8. İyon Kanalları

İyonlar kanal aracılığıyla sadece kendi elektrokimyasal gradientlerine göre geçiş gösterirler. Hemen hemen tüm doku tipleri ve organlarda önemli rol oynayan iyon kanalları ayrıca çok sayıda patofizyolojik durumlarda yer alırlar. İnsan ve hayvanlarda iyon kanallarının disfonksiyonu sonucu oluşan hastalıklar kanalopatiler olarak adlandırılır. Kanalopatiler iyon kanallarının birçoğunu kodlayan genlerdeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal hastalıklar sonucu oluşmaktadır. Günümüzde epilepsi, episodik ataksi, long QT sendromu, Bartter's sendromu ve kistik fibrozis gibi insan hastalıklarının bir çoğu iyon kanallarının disfonksiyonu ile bağlantılıdır (5).

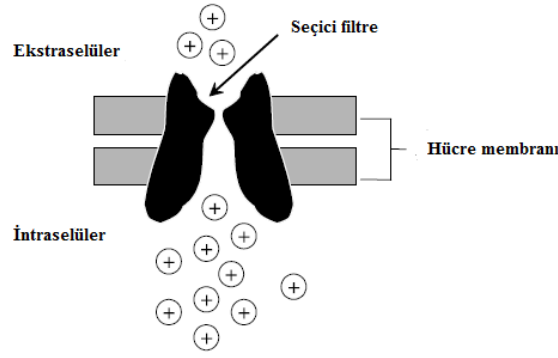
İyon kanalları genel olarak iki ana gruba ayrılır (Çizelge 2.3). 1) voltaj duyarlı kanallar; sinir ve kalp olmak üzere bir çok farklı dokuyu kapsayan ve membran potansiyelindeki değişikliklere cevap oluşturan sodyum, kalsiyum ve potasyum kanalları. 2) ligand kapılı kanallar; farklı ekstraselüler ya da intraselüler ligandlar tarafından

regüle edilen kanallar. Bu kanallar genellikle bağılandıkları liganda göre adlandırılır. Örneğin nikotinic asetilkolin reseptörü (nAChR) prototipik ligand kapılı bir kanaldır. Bu kanal endojen ligand asetilkolin ve nikotin ilacı tarafından aktive edilir. Mekanik uyarı, membran gerilim değişiklikleri ve hipo-osmotik şok gibi uyaranlara yanıt olarak açılıp kapanan stretch-aktif, stretch kapılı ve/veya harekete duyarlı kanallar iyon kanallarının diğer sınıfını temsil eder. Son birkaç yılda bu kanalların önemi artmıştır (5).

Çizelge 2.3. Memeli hücrelerinin plazma membranında bulunan iyon kanallarının iki temel grubunun sınıflandırılması (5).

İyon kanalları	Seçicilik	Aktivatör
Voltaj-kapılı kanallar		
Potasyum	K^+	Membran potansiyeli
Sodyum	Na^+	Membran potansiyeli
Kalsiyum	Ca^{2+}	Membran potansiyeli
Klor	Cl^-	Membran potansiyeli
HCN	Na^+, K^+	Membran potansiyeli
Ligand kapılı kanallar		
nAChR	Na^+, K^+, Ca^{2+}	Ach
GABA _{A,C}	Cl^-	GABA
Glisin	Cl^-	Glisin, Striknin
5-HT ₃	Na^+, K^+, Ca^{2+}	Serotonin
AMPA	Na^+, K^+, Ca^{2+}	Glutamat, AMPA
Kainate	Na^+, K^+, Ca^{2+}	Glutamat
NMDA	Na^+, K^+, Ca^{2+}	Glutamat, NMDA
CNG	Na^+, K^+, Ca^{2+}	cAMP
IP ₃ R	Ca^{+2}	IP ₃
P2x,P2Z	Na^+, K^+, Ca^{2+}	ATP

İyon kanalları yüklü moleküllerin yarı geçirgen bir bariyerden geçişine izine veren, çift katlı hücre lipid membranına uzanan protein kompleksidir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Voltaj kapılı iyon kanalları (5).

İç membran mesafe alanı elektriksel gradiyent boyunca hareket eden Na^+ , Ca^{2+} , K^+ ya da Cl^- gibi iyonların geçişine izin veren pordan oluşur (Çizelge 2.4). İyon kanalları genellikle gözenek ve seçici filtre içeren α alt birimden oluşur. Bunun yanı sıra bu kanallar farklı uyarılara yanıt olarak açılıp kapanırlar (5).

Çizelge 2.4. Memeli hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı temel beş elementin konsantrasyonu (5).

İyon	İyonik konsantrasyon (mM)	
	Ekstraselüler	İntraselüler
Na^+	145	12
K^+	4	155
Ca^{2+}	1.8	0.001(dinlenme) - 0.1 (aktif)
Mg^{2+}	1.5	0.8
Cl^-	123	4.2

İyon kanallarının çeşitliliği özellikle uyarılan sinir ve kas hücrelerinde oldukça önemlidir. İnsan genomunda şu an 400'den fazla iyon kanal genleri tespit edilmiştir. Bunlardan 170'i potasyum kanallarını, 38'i kalsiyum kanallarını, 29'u sodyum kanallarını, 58'i klor kanallarını ve 15'i glutamat kanalları kodlar (5).

2.8.1. Voltaj-duyarlı iyon kanalları ve kanser

Normal epitel hücresinde kansere dönüşüm sırasında bir dizi değişiklik meydana gelir. Bu değişiklikler iyon kanal ekspresyonunu etkiler veya iyon kanal aktivitesinde değişime neden olur. Tümör oluşumunda iyon kanalının hangi basamakta etki ettiği çok açık değildir. Kansere iyon kanallarının ilişkilendirilmesi, iyon kanalları üzerinde çalışan bilim insanları için oldukça ilginç yeni bir araştırma alanlarından biridir ve kansere karşı mücadelede umut veren yeni terapötik stratejileri oluşturmaktadır (5). Tümörün ilerlemesine neden olduğu düşünülen kanallar özellikle sodyum ve potasyum kanallarıdır (81).

Yapılan çalışmalarda voltaj duyarlı iyon kanalları prostat, kolon ve glioma gibi çeşitli kanser türlerinin başlangıcında, proliferasyon ve malign gelişiminde önemli rol oynar. Kanserin migrasyonu ve dokulara yayılmasında voltaj duyarlı iyon kanallarının işlevi çeşitli tekniklerle belirlenmiştir. Bu çalışmalar hücrelerde kanalların fonksiyonel durumunu değiştirmede iyon kanal agonist ve antogonistleri, kanser hücre davranışı üzerine kanal aktivitesini belirlemede kullanılır (82).

2.8.1.1. Voltaj duyarlı Na⁺ kanalları

Voltaj-duyarlı sodyum kanalları (VSSC ya da Na_v), memeli beyin ve iskelet kasından saflaştırılmıştır ve uyarılmış hücrelerde, lenfositler, osteoblastlar, endotelial, fibroblast ve renal tübül epitelyal hücrelerinde karakterizedir. Bu dokulardaki sodyum kanalları büyük bir α - alt birimi (~260 kDa) ve bir ya da iki β -alt biriminden oluşmuştur (30-40 kDa) α -alt birimi sodyum iyonlarının geçişine izin veren porlar içerir. Dokuz farklı α -alt birimi (Nav1.1 ve Nav1.9) tespit edilmiş ve fonksiyonel olarak ifade edilmiştir. Onuncu bir alt tipi Na_x henüz fonksiyonel olarak tanımlanmıştır. Bütün sodyum kanal modülatörlerinin α alt birimi ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Dört Nav1 β -alt birimi klonlanmış ve fonksiyonel olarak ifade edilmiştir (β 1- β 4). Tek bir membran kapsayan etki alanı içeri ve yüksek oranda glikozillenmiştir. β 1 ve β 2'nin kalp iskelet kasında önemli düzeyde bulunduğu rapor edilmiştir (5, 82).

Meme kanseri hücre hatlarında Na^+ akımının metastatik kapasite ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Çeşitli çalışmalarda metastatik pankreas kanser hücrelerinde Na_v bulunduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.5) (5).

Çizelge 2.5. Kanserde iyon (Na^+) kanallarındaki ekspresyon değişiklikleri (5).

Kanallar	Kansere ilişkili ekspresyon seviyeleri	Değerlendirme parametreleri	Kanser
Kv	Artma	İmmünohistokimya	Kolon
	Artma	RT-PCR	Glioma
	Artma	RT-PCR	Oral squamous hücresi
Nav	Artma	RT-PCR	Meme
	Artma	RT-PCR	Prostat
	Artma	RT-PCR	Prostat
Cav	Artma	qPCR	Kolon
	Artma	qPCR	Kolon
	Artma	Flow Sitometri	Nöroblastoma
	Artma	RT-PCR	Küçük Hücre
	Artma	RT-PCR	Küçük Hücre
	Artma	Elektrofizyoloji	Fibrosarkoma
	Artma	RT-PCR, Western	Lösemi
ENaC	Artma	RT-PCR, Western	Lösemi
N K-ATPaz	Azalma	İmmünohistokimya	Prostat

2.8.1.2. TRP kanalları

Ca^{2+} geçirgen TRP kanallarının bir serisinin ekspresyonu kanserde değişikliğe uğramıştır. Bunlar arasında, ilk olarak epitelyal Ca^{2+} taşıyıcıları TRPV5 ve TRPV6, soğuk/metol reseptörü TRPM8, melanoma spesifik TRPM1 (melasitatin) ve ısı/kaspasin reseptörü TRPV1 sayılabilir. Yüksek düzeyde Ca^{2+} seçici TRPV6 kanalının artmış ekspresyonu prostat, kolon, meme, tiroid ve ovaryumun primer tümörlerinde bunun yanı sıra yaygın insan tümörlerinden çoğalan hücre hatlarında saptanmıştır (LNCaP ve T47D meme kanser hücre hatları gibi). TRPV6 mRNA ekspresyon seviyelerinin normal meme dokusuna kıyasla meme kanser dokularında 2-15 kat arttığı gösterilmiştir (6).

2.8.1.3. Voltaj duyarlı Ca²⁺ kanalları

Voltaj duyarlı Ca²⁺ kanalları (VSCC ya da Ca_v) uyarılabilen ve uyarılamayan dokularda vücudun her bölgesinde her zaman eksprese edilmektedir. Bu kanallar tipik olarak $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ , ve γ olmak üzere beş alt birimden oluşur. Alfa alt birimi kanal porundan oluşur ve kanalın voltaj duyarlı elementini içerir. Diğer alt birimlerin temel olarak düzenleyici görevlere sahip olduğu düşünülmektedir (82).

Kanser hücreleri mitojenlerin varlığı, değişmiş ekspresyon ve/veya membran reseptör fonksiyonundan dolayı kontrolsüz çoğalma içsel potansiyel oluşması nedeniyle aşırı duyarlı hale gelir. İyon kanalları bu dışsal sinyalleri alır. Ca²⁺ akımı hücre döngüsünün ilerlemesi için gereklidir ve ekstraselüler Ca²⁺ düzeyinde bir azalma hücrelerin G1/S fazında kalmasına sebep olarak, G1 fazı boyunca hücre büyümesini durdurur. Bütün mitojenler Ca²⁺ giriş yollarını indükler. Voltaj duyarlı Ca²⁺ kanallarının düşük voltaj ile aktive olan Cav3 alt familyasının üyesi Cav3.2 kanalları proliferasyondan sorumlu tutulmaktadır. Cav3 kanalları kanser türevi olan hücre hatlarında eksprese olmaktadır ve Ca²⁺ kanallarını bloke eden en spesifik ajan olan mibefradil'in antiproliferatif etkisi gösterilmiştir (6).

2.8.1.4. Voltaj duyarlı K⁺ kanalları

Voltaj duyarlı K⁺ kanalları (VGKCs ya da K_v) plazma membranında bulunan iyon kanalları içerisinde en çok çeşide sahip kanallardır. K⁺ kanalları voltaj duyarlı K kanalları [K_v (K1-Kv12)], kalsiyum duyarlı K⁺ kanalları [K_{2p}(K2p1-7,9,12,13,15-18)], içeriye doğrultucu K⁺ kanalları [K_{ir} (Kir1-7)] ve ATP'ye duyarlı K⁺ kanalları [K_{ATP}] şeklinde gruplandırılabilir (83). K⁺ kanalları membran potansiyellerinin kontrolü, nörotransmitterlerin serbestleşmesi, sinir ve kardiyak aksiyon potansiyellerinin kontrolünde görev alırlar. Aynı zamanda insülinin serbestleşmesi, farklılaşma, aktivasyon, apoptozis ve çeşitli fizyolojik fonksiyonların gerçekleşmesine katkıda bulunurlar. Uyarılabilen ve uyarılamayan hücrelerin her ikisinde de bulunan bu kanallar beyin, kalp ve iskelet kası gibi uyarılabilen dokularda tipik bir şekilde lokalizedir. K⁺ kanallarının fonksiyonundaki bozukluk; felç, aritmi hipoglisemi ve epilepsi ile ilişkilidir

(82). K^+ kanalları hücre proliferasyonunda ve tümör gelişiminde önemli role sahiptirler. K^+ kanallarının hücre hacmine olan etkilerinden dolayı, hücre proliferasyonunda önemli bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu güne kadar bilinen 70'in üzerinde K^+ kanalı içerisinde ancak sadece bir kaç tanesi direkt olarak hücre proliferasyonu ve tümör gelişimi ile ilişkilidir. En çok çalışılan K^+ kanalları Kv1.3 (KCNA3), IKCa1(KCa3.1, KCNN4), TASK-3 (K2P9.1, KCNK9), HERG (Kv11.1, KCNH2) ve EAG (Kv10.1, KCNH1)'dir (81).

2.8.2. Kanser gelişiminde K^+ kanallarının rolü

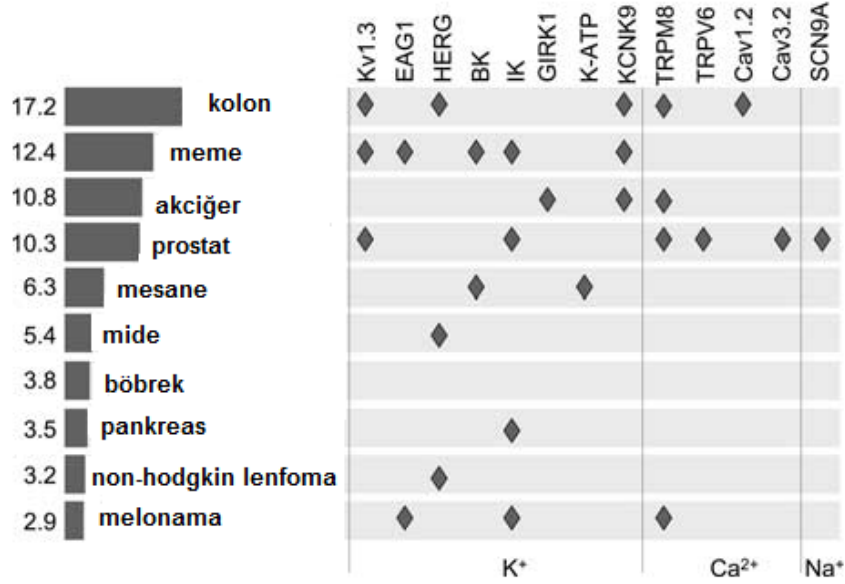
K^+ kanallarının farklı alt tipleri tümör proliferasyonu ile ilişkilidir. Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalları (K_{ca}), shaker tip voltaj kapılı K^+ kanalları (Kv), voltaj duyarlı K^+ kanalı ailesinden olan ether-*a-go-go* (EAG) ve iki-pore domain (2PD) K^+ kanalları. Ekspresyon ve kanal aktivite çalışmaları K^+ kanalları ve kanser arasındaki ilişkiyi sıkı bir şekilde ortaya koymuştur. Ayrıca farmakolojik ve modülasyon denemeleri kanser tedavisinde K^+ kanallarının kullanımı potansiyel terapötikler için önemli ipucu sağlamıştır (5).

K^+ kanalının hücre gelişimindeki rolünün yanı sıra, proliferatif kanser hücrelerinin artmış ya da azalmış düzenlenmesinde görev alır. Ayrıca K^+ kanallarının ekspresyonu farklı tümör tiplerinde bozulmaktadır. Bir malignansinin derecesi K^+ kanalının ekspresyonu ile ilişkilidir. K^+ kanallarının çeşitli tipleri olmasına rağmen onkogenik etkiye sahip yalnızca birkaç tipi proliferatif durumla ilişkilidir.

K^+ kanallarının tüm gruplarındaki üyelerinin değişen ekspresyonu tümör hücrelerinin farklı tiplerinde bulunmuştur. Kv 1 ailesinin en çok çalışılan kanalı olan Kv 1.3'ün meme, kolon ve prostatta aşırı eksprese olduğu, Kv1.1 ve Kv 5'in ise meme ve glioma malign hücre hatlarında ekspresyonunun bozulduğu gösterilmiştir (11).

Meme dokusunda yapılan çalışmalarda K^+ kanallarının ekspresyonu gösterilmiştir. EAG kanalları meme kanseri dahil olmak üzere bir çok tümör tipinde aşırı eksprese olmaktadır (Şekil 2.6). TASK (TWIK-Related Acid Sensitive K^+ kanalı) kanalı KCNK9 meme kanserlerinin % 10'unda 3-10 kat amplifiye olmakta ve meme

kanserlerinin % 44'ünde 5-100 kat aşırı eksprese edilmektedir. Hücre hattında KCNK9'un aşırı ekspresyonu tümör oluşumunu teşvik etmektedir (84).



Şekil 2.6. İyon kanalları ve kanser türleri (7).

2.8.3. Kanser biyomarkırı olarak K⁺ kanalları

Bir proteinin kanser biyomarkırı olması için aşağıdaki özelliklerden birine sahip olması gerekir. Bunlar, mutant gen, ekspresyondaki değişiklik ve transforme hücrelere karşılık gelen değişmiş fonksiyon özellikleridir. K⁺ kanal mutasyonlarından kaynaklanan malign fenotipler rapor edilmemiş olmasına rağmen K⁺ kanallarının aşırı ekspresyonunun kriterlere uyduğu görülmektedir. Bazı K⁺ kanalları, sağlıklı doku ve hücrelerde aşırı ya da düşük seviyede eksprese edilir. Daha da önemlisi, bu K⁺ kanallarının ekspresyonundaki artışın hücrelerin transformasyonuna neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu K⁺ kanalları kanserin erken teşhisinde biyomarkır olarak kullanılabilir (5).

Feokromositoma, prostat kanseri, Jurkat-T-lenfoma, glioma gibi çeşitli tümör hücre hatlarında Kv 1.3'ün aşırı ekspresyonu söz konusudur (85-88). Kv 1.3, K⁺ kanal alt tipinin en etkili bileşenidir. Kv 1.3'ün aşırı ekspresyonu 60 meme kanser örneğinde

Abdül ve arkadaşları tarafından immünohistokimya yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Meme kanser örneklerinin % 30'unda yüksek, % 58'inde orta ve % 12'sinde düşük seviyede ekspresyon gözlenmiştir (89). Son zamanlarda Mu ve ark. KCNK9 potasyum kanalını amplifiye etmişler; meme, akciğer ve prostat kanserlerinde aşırı ekspresyon belirlemişlerdir. Ayrıca KCNK9'un aşırı ekspresyonu kolorektal karsinomalı 124 hastanın 57'sinde (% 46) saptanmıştır. İlginç bir şekilde KCNK9'un aşırı ekspresyonu tümör oluşumuna neden olmuştur. Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanal ailesinin bir üyesi olan küçük iletkenliğe sahip SK4 kanallarının artan ekspresyonu bütün primer pankreatik kanser dokularında tespit edilmiştir. SK4 aktivitesinin inhibisyonu pankreatik kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemektedir. Bu kanal, Ras/ERK sinyal yolağının mitojenik aktivasyonuna yanıt olarak hücre proliferasyonunu pozitif bir şekilde regüle eder. Küçük iletkenli KCa (Ca ile aktive olan K) kanalları (SK3) yüksek oranda metastaza uğrayan meme kanser hücre hattı MDA-MD-436s'de ve tümörlü meme biyopsisinde eksprese olduğu gözlenmiştir; fakat tümör bulunmayan meme dokularında eksprese olmamaktadır (5).

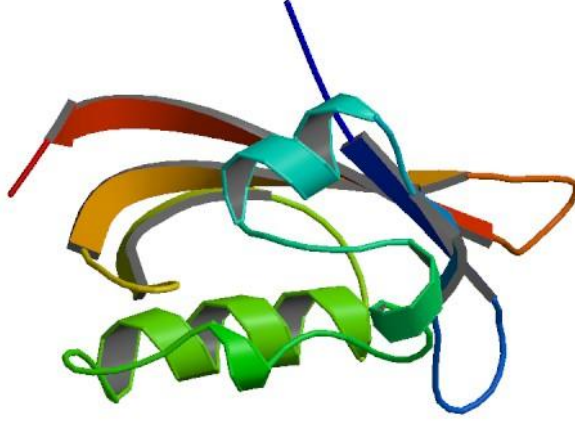
EAG, sağlıklı dokularda oldukça sınırlı bir dağılıma sahiptir. Ekspresyon neredeyse sadece beyinde, biraz plasentada ve geçici olarak ta iskelet kasında gözlenmektedir. EAG'in normal dokularda kısıtlı dağılımına karşın meme tümörü, melanoma IGR 1, HeLa serviks karsinoma ve MCF-7 somatik kanser hücre hatlarında eksprese olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada EAG ekspresyonu insan servikal kanser örneklerinin % 100'ünde ve normal kontrol örneklerinin % 33'ünde saptanmıştır (90). Buna ek olarak EAG meme bezi, karaciğer, prostat, uterin, serviks, ovaryum, endometrium, kolon ve tiroid içeren diğer çeşitli insan tümörlerinde bulunmuştur. Bunların onkogenik özelliklerinden, normal dokularda sınırlı dağılmış olmasından ve tümör hücrelerinde her yerde ekspresyonundan dolayı EAG K^+ kanalı potansiyel bir tümör markırı olarak çok cazip bir aday haline gelmiştir (5).

HERG kanalları sağlıklı kişilerde hemen hemen bütün dokularda bulunur. Kalp, beyin, böbrek, karaciğer, testis, uterus, prostat gibi dokularda bulunabilmektedir. Ancak HERG ekspresyonunun düzeyi bu dokularda kanser oluştuğunda sürekli bir şekilde artar. Gerçektende mRNA ve protein düzeylerinin her ikisinde de HERG doku oluşumu farklı olan tümör hücre hatlarında aşırı eksprese oldukları bulunmuştur. Özellikle endometrial adenokarsinomalar, hematopoyetik hücreler (Burkitt's lenfoma, akut

lenfoblastik lösemi ve akut promiyelositik lösemi) retinoblastoma, meme adenokarsinoma, Barrett's özafagus ve kolorektal kanser gibi primer insan kanserlerinde insan gliomalarda eksprese olduğu görülmüştür (5).

2.9. HERG1 K⁺ kanalı

Son zamanlarda K⁺ kanallarının bakteriyel ve memelilerdeki kristal yapısının çözülmesi K⁺ kanal kapılarının yapısal temelini anlaşılmasını sağlamıştır (91). HERG1 K⁺ kanalını kodlayan gen KCNH₂ genidir ve 1994'te keşfedilmiştir. Diğer K_v kanalları gibi HERG1 de voltaj yoluyla aktive edilir. Kanalı açmak için eşik seviyesinin yaklaşık -50 mV voltaj olması gereklidir ve ½ aktivasyon için gerekli voltaj ise yaklaşık -30 mV'dur (92). Bu kanal tetramerik bir yapıya sahip olan benzer dört α -alt birimin bir araya gelmesiyle oluşmuştur (Şekil 2.7) (93). Bu alt birim altı defa membranı geçen α -heliks segmentinin bir araya gelmesiyle oluşur (S1-S6). Her HERG1 alt birimindeki D1-S4 heliks transmembran potansiyeline hassas bir voltaj duyarlı sensör domaininden (VSD) oluşur ve merkezi bir por bölgesi ile birleşmiştir. Her por bölgesi, por heliks ve seçici filtre ile koordine olan bir dış heliks (S5) ve iç heliks (S6)'den oluşur. Por heliksin karboksi ucu ve seçici filtre yüksek ölçüde korunmuş K⁺ kanal işaret dizisi içerir. HERG1 geninde bu dizi Treonin-Serin-Valin-Glisin-Fenilalanin-Glisin'den oluşmaktadır. HERG1 ve diğer kanallardaki kapıların inaktivasyonu tamamen anlaşılabilir değildir. Ancak zarar görmüş K⁺ koordinasyonu ve iletimin boke edilmesi sonucu seçici filtrenin omurgasındaki yapısal değişimlerin inaktivasyona neden olabileceği düşünülmektedir. Büyük olasılıkla mutasyon sonucu seçici filtrenin iletkenlik durumunun stabilitesi etkilenmektedir. S4 gibi daha uzak bölgelerdeki mutasyonlar, voltaj sensörü ve por arasındaki bağlantıyı etkileyerek inaktivasyona neden olabilir (92).



Şekil 2.7. HERG'in protein yapısı (94).

Belli K^+ kanallarının fonksiyonu proliferen hücrelerde hücre döngüsünün ilerlemesini düzenlediği için önemlidir. Örneğin kanal blokörleri ile inhibe edilen EAG kanal akımı birçok farklı kanser hücre hatlarının proliferasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca G1 fazındaki hücrelerin proliferasyonunun azalmasına ve durdurulmasına neden olabilmektedir. Bir çok olguda bloke edilen HERG1 kanal akımı ile hücre proliferasyonu inhibe olmaktadır. Üterin kanser hücrelerinde bloke edilen HERG1 kanalları G2/M fazında hücrelerin proliferasyonunu durdurmaktadır. Lösemi hücrelerinde ise blokaj hücrenin G1/S transisyon aşamasında gerçekleşmektedir (95). HERG1 birçok tümör hücre suşlarında oldukça fazla ekspresyona sahiptir. HERG1'in pozitif ekspresyonu kısa yaşam süresi ile ilişkilidir. Gastrik kanserde HERG1'in fazla ekspresyonu gastrik kanser gelişimi ile ilişkilidir. Bundan dolayı HERG1 gastrik kanser gelişiminde önemli rol oynar ve HERG1 gastrik kanser için önemli bir teşhis ve prognoz faktörüdür (96).

HERG1 kanalları sağlıklı dokularda da örneğin kalp, beyin, böbrek, karaciğer, testis, uterus, prostat gibi her bölgeye dağılmış durumdadır. Ancak HERG1 ekspresyonunun seviyesi bu dokular kanserli olduğunda sürekli bir şekilde artar. Endometrial adenokarsinom, meme adenokarsinom, akut lenfoblastik lösemi, meme

karsinoma, retinoblastoma ve kolorektal kanser gibi primer insan kanserlerinde artmış ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. K^+ kanallarının fazla ekspresyonunun bir potansiyel belirteç ve kanser için ilgi çekici bir terapötik hedef olduğu düşünülmektedir (6, 97).

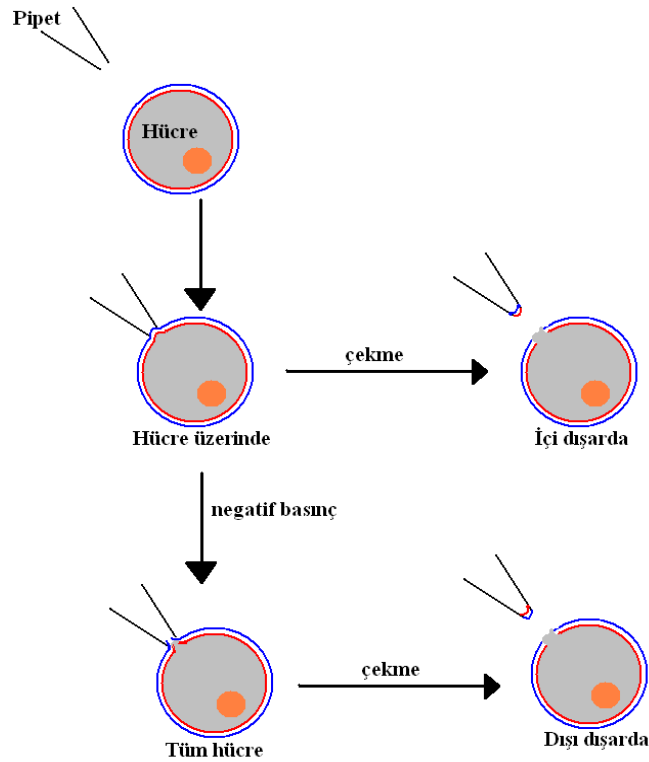
2.10. Yama Kenetleme

Hücre dışı yama kenetleme yöntemi, hücre zarında bulunan iyon kanalları boyunca oluşan iyonik akımların ölçülmesini sağlayan, iyon kanallarının fonksiyonları ile ilgili bilgi veren bir yöntemdir. Bu yöntemin temelleri, 1976 yılında Neher ve Sakmann'ın kurbağa iskelet kası hücresinde yaptıkları bir çalışma ile atılmış, aynı bilim adamlarına, bu alanda 1991 yılında yapmış oldukları devam niteliğindeki çalışmaları ile Nobel Ödülü kazandırmıştır (98, 99).

Yama kenetleme yöntemi, uç çapı mikrometreler büyüklüğünde olan bir cam mikropipetin sadece bir veya birkaç tane iyon kanalını içerebilecek büyüklükte bir zar parçasına yaklaşarak hücre zarının yüzeyine mühürlenmesi prensibine dayanmaktadır. Pipet içinin deney koşullarının belirlediği doğrultuda uygun çözelti ile doldurulması sonrasında, pipet içine ince bir Ag/AgCl elektrot yerleştirilmesi ile banyo çözeltisi içinde bulunan hücre-pipet arasında iletkenliğin oluşması için uygun koşullar sağlanmış olur (100). Mühürlenme oluşturulduktan sonra zar ile pipet arasında gigaohm ($G\Omega$) mertebesinde bir direnç oluşmaktadır. Ohm Yasası gereğince, oluşan bu yüksek direnç, zar belirli bir gerilim değerine kenetlendiğinde hücre zarında oluşan pikoamper (pA) düzeyindeki küçük iyonik akımların kayıtlanabilmesini sağlamaktadır. Gerilim kaydının yanı sıra sinir ve kas hücreleri gibi hücrelerde, hücrenin belirli akım değerlerine kenetlenmesi ile zar potansiyeli ve aksiyon potansiyelleri de kayıtlanabilmektedir. Benzer bir yöntem olan mikroelektrot yönteminden en önemli farkı kayıt yapılan pipetin hücre içine girmeden zar ile dışardan etkileşmesidir (101).

Yama kenetleme yönteminde başlıca, hücre üzerinde, tüm hücre, dışı dışarda ve içi dışarıda olmak üzere dört temel kayıt alma yöntemi vardır (Şekil 2.8). Kayıt alınacak yöntem ne olursa olsun, öncelikle pipetin hücreye yaklaşıp dokunması gerekmektedir. Hücre zarı parçalanmadan pipetin hücreye dokunarak mühürleme oluşturulması durumunda hücre üzerinde kayıt biçimi oluşturulmuş olur. Hücre üzerinde kaydında

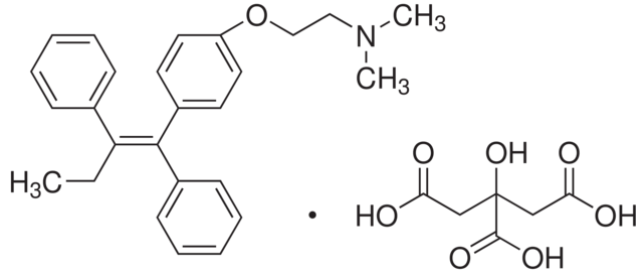
pipeti gerilim takip eden yseltece bağlayan pipet tutucu kısıma yeterli miktarda negatif basınç uygulanması durumunda pipetin ucundaki zar parçası yırtılarak hücre içi ile pipet arasında bir bağlantı oluşacaktır bu kayıt biçimi ise tüm hücre kayıt biçimi olarak isimlendirilir. Tüm hücre kayıt biçiminde pipet uygun miktarda geri çekilerek zar parçası pipet ucunda birleşirse zarın hücre dışına denk gelen kısmı, pipetin dış kısmına denk gelir, bu kayıt biçimine ise dışı dışarıda kayıt biçimi denir. Bunun dışında pipet ile zar hücre üzerinde kayıt biçimindeyken pipet uygun Şekilde geri çekilirse, bu sefer hücre zarının iç kısmı pipetin dış kısmına denk gelir buna ise içi dışarıda kayıt biçimi denir. Hangi kayıt biçimi olursa olsun, dikkat edilmesi gereken en önemli durum banyo çözeltisinin seçimidir. Kayıt alınması sırasında pipetin içi, hücre zarının dış tarafına denk geliyorsa (hücre üzerinde, içi dışarıda kayıt biçimleri) bu durumda pipet içi çözelti, kayıt alınan hücre için hücreler arası sıvıyı temsil etmeli. Eğer kayıt aşamasında pipetin içi, hücre zarının i tarafına denk geliyorsa (tüm hücre, dışı dışarıda kayıt biçimleri) bu durumda pipet içi çözelti, kayıt alınan hücre için hücre içi sıvıyı temsil etmelidir (102).



Şekil 2.8. Yama kenetleme yönteminde kayıt alma biçimleri.

2.11. Tamoksifen

Tamoksifen bir nonsteroidal trifeniletilen türevidir. Bazı dokularda kısmi östrojen aktivitesinden dolayı bir antiöstrojen olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.9) (103).



Şekil 2.9. Tamoksifen sitrat (104).

Meme kanserinin tedavisinde antiöstrojen tamoksifenin kullanımı ilk olarak Cole ve ark. tarafından 1971’de rapor edilmiştir (105). Meme kanseri genellikle hücrelerin mutasyona maruz kalması sonucu ortaya çıkar ve genetik olarak hasara uğramış hücreler sınırsız bölünmeye duyarlı hale gelir. Bu nedenle dişilik hormonları ve diğler hormonlar meme bezlerinin gelişiminde etkilidirler ayrıca meme kanseri için potansiyel bir risk faktörüdür. Buna karşın hamilelik ve laktasyon gibi meme bezlerinde farklılaşmayı uyaran faktörler, meme kanseri riskini muhtemel olarak azaltmaktadır (106).

Östrojenlerin, pre ve postmenopozal kadınlarda meme kanserinin gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte östrojenlere duyarlı tümörlerin oranı yaşla birlikte artar (107). Aslında 17-östradiol (E2) normal meme bezinde anahtar bir büyüme regülatörü olmasına karşın klinik ve deneysel datalar açıkça, bu steroid hormona maruz kalmanın sporadik kadın meme kanserine neden olduğunu göstermektedir. Bu yüzden antiöstrojenlerin faydası açıkça E2’nin antagonize aktivitesi ile ilişkilidir. Östrojenler karsinogenezise ya tetikleyici ya da düzenleyici olarak etki edebilirler ve östrojenik hormon replasman tedavide tamoksifen gibi antiöstrojenik

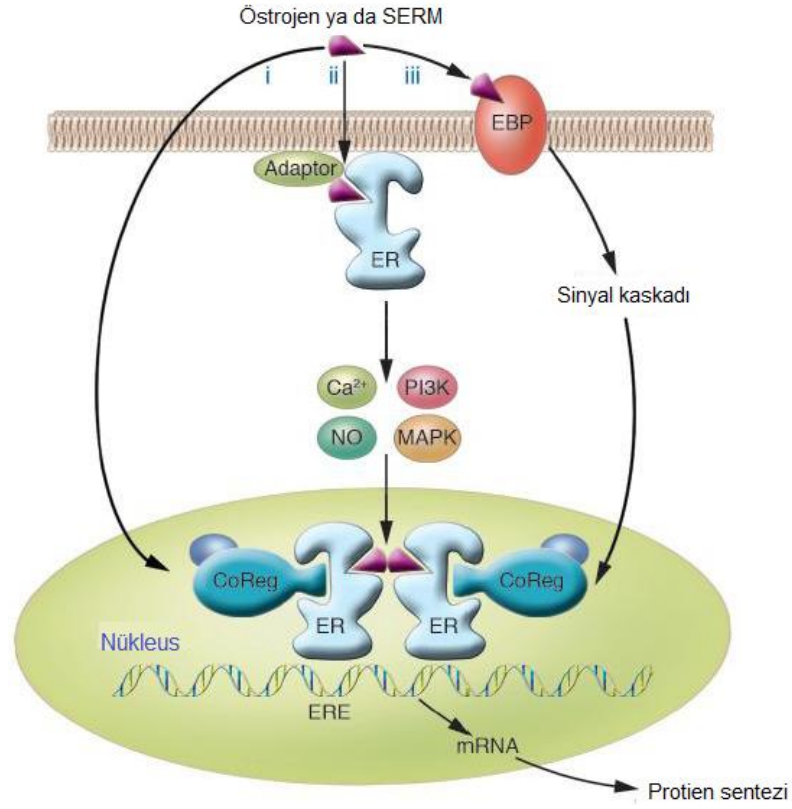
bileşiklerin kullanımında gereklidir. Ancak, kadın üreme fonksiyonlarında onların anahtar rollerine ek olarak, östrojenler ilgili olmayan dokularda yararlı etkilere sahiptir. Bu durum postmenopozomal kadınlar üzerine hormon replasman tedavisinin etkileriyle gösterilmiştir. Aslında östrojenler kemik resorpsiyonunu inhibe ederek osteoporozu önleyebilir ve kısmen hepatik lipit metabolizması ve vasküler düz kas hücreleri üzerine etkileri aracılığıyla koroner kalp hastalığının insidansını azaltmaktadır. Tamoksifenin kullanımı memede bir östrojen reseptör (ER) antagonisti olarak hareket etme yeteneğine bağlıdır. Tamoksifen kemikte ER'nin kısmi bir antagonisti gibi davranarak östrojenin karsinojenik etkisini önler. Kemik dansitesinin korunmasında E2'nin faydalı etkisini taklit eder (106).

2.11.1. Meme kanserinde östrojen reseptörü

Östrojen ve östrojen reseptörleri meme hücrelerinin farklılaşması ve gelişmesinde anahtar bir rol oynar. Östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme hücrelerinin gelişimi büyük çoğunlukla östrojenin stimülasyonu ile düzenlenmektedir. Bu nedenle aberrant ER ekspresyonu, ER'de meydana gelen mutasyonlar ya da ER genlerinde ki herhangi bir değişim, genellikle meme kanserinin gelişimini ve ilerlemesinden sorumlu tutulmaktadır. Ancak etkili tedavi için meme kanser hücrelerinin gelişiminin engellenmesi amacıyla (terapötik hedef olarak) östrojen reseptörleri geliştirilmiştir (108).

Östrojen reseptörleri, hücre içi reseptörlerin nükleer hormon ailesinin bir üyesidir ve östrojen tarafından aktive edilir. Esas fonksiyonu, gen ekspresyonunu düzenleyen bir DNA-bağlayıcı transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. ESR1 ve ESR2 tarafından kodlanan ER α ve ER β östrojen reseptörü olmak üzere iki formu vardır. Östrojen aktive edildiğinde, onlar ER $\alpha\alpha$ ve ER $\beta\beta$ homodimer formlarına konformasyonel olarak dönüşürler ya da hücre içinde birlikte eksprese edildiklerinde ER $\alpha\beta$ heterodimerlere dönüşürler. ER α ve ER β farklı dokularda ekspresyon şekillerine sahiptir. ER α meme hücreleri, endometrial hücreler, ovaryum stroma hücreleri ve hipotalamusta eksprese olurken ER β böbrek kemik, beyin, kalp, akciğer, barsak mukozası ve endotelial hücrelerde bulunur (108, 109).

Östrojen ya “genomik” mekanizma aracılığıyla ya da “non-genomik” mekanizma aracılığıyla östrojen reseptörlerini aktive edebilir (Şekil 2.10). Genomik mekanizmalarda, östrojenler hücre içine nüfuz ederler ve nükleusta ER’ye bağlanırlar. Bir kez ER aktive edildiğinde dimer kompleksi oluşturur. Ya direkt olarak ya da dolaylı olarak transkripsiyon faktörü, aktivatör protein 1 (AP1) ya da SP1 ile protein-protein etkileşimi sayesinde östrojene duyarlı genlerin promotör bölgesindeki östrojen respons elementine (ERE) bağlanır. Fizyolojik yanıtı neden olan hedef genlerin mRNA ve protein seviyeleri değişir. Bu mekanizma tipik bir şekilde saatlerce sürebilir. Saniyeler ve dakikalar içinde daha hızlı bir yanıt gerçekleşmesi için, östrojen non-genomik mekanizma üzerinden hareket eder. Bu, Caveolin-1 ya da Shc gibi adaptör proteinler aracılığıyla plazma zarına bitişik ya da lokalize olan ER’ye bağlanır. Bu durum P13K ya da MAPK kinazların aktivasyonu ve Ca^{2+} veya NO seviyelerinde artış gibi hücre içi yanıt ile sonuçlanır. Alternatif olarak östrojen, östrojen-bağlayıcı proteinlerle (EBP) ile ilişkili diğer non-ER membran üzerinden hareket edebilir ve sinyal kaskadı aracılığıyla hücre içi yanıtı neden olur (Şekil 2.10) (108).



Şekil 2.10. Östrojen davranış modeli (108).

2.11.2. Östrojen reseptörü ve tamoksifen

Meme kanseri hücrelerinin bir kısmında östrojen reseptörü bulunduğu ve östrojen reseptörü bulunan tümörlerin endokrin tedaviye daha iyi yanıt vereceği fikri ortaya atılmıştır. Tamoksifen otuz yılı aşkın süredir pre- ve postmenopozal kadınlarda ER⁺ meme kanseri tedavisinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Tamoksifen ilk olarak ilerlemiş meme kanseri tedavisinde cerrahi tedavi ve kemoterapi sonrası ER⁺ meme kanseri hastalarında kanserin yayılmasını önlemek için kullanılır. Yıllık meme kanseri mortalitesini 1/3'e ve hastalığın yayılımını yarıya indirir (110).

Tamoksifen, selektif östrojen reseptör modülatörü (SERM) olup, meme dokularında östrojen reseptörünün bir antagonisti gibi davranırken uterus gibi diğer dokularda agonist gibi hareket eder. Meme kanserlerinin yaklaşık % 70'i ER⁺ meme kanseri olarak sınıflandırılır. ER⁺ meme kanseri hücrelerinin gelişimi östrojene bağlıdır.

Tamoksifen meme dokusunda ER reseptörüne bağlanması için östrojenle rekabet eder. Tamoksifen ER'nin transkripsiyon aktivitesini engeller ve kanser hücrelerinin hücre döngüsünü G0 ve G1 fazında durdurur. Kanserli hücrelerin bölünmesini engeller. Ancak uzun süreli tamoksifen tedavisi gören kadınların 1/3'ünün tamoksifene yanıtı zaman içerisinde başarısız olur ve sonunda hastalık yayılır. Tamoksifen direnci gelişen bu kanser hastaları tüm meme kanseri hastaların yaklaşık 1/4'ünü temsil eder. Öne sürülen mekanizmalar ER ekspresyonunun kaybı ve ko-regülatörlerde aberant değişimler tirozin kinaz sinyal reseptörü ya da hücre sağ kalım sinyalinin düzenlenmesindeki bozukluktur. Bu durum henüz tam olarak anlaşılmış değildir ve klinik uygulama için hala etkili bir çözüm beklenmektedir (110).

2.11.3. Tamoksifenin faydaları ve yan etkileri

Tamoksifen yakın zamana kadar, ER⁺ meme kanserinde kullanılan tek adjuvan endokrin tedavi seçeneğiydi. EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group) tarafından 2005 yılında yapılmış 2.000 çalışmanın meta analizini içeren bir çalışmada ER⁺ meme kanserinde tamoksifenin sağladığı faydalı etkiler şu şekilde bildirilmiştir (34).

- Adjuvan tamoksifen verilmeyen hastalar ile kıyaslandığında, 5 yıl boyunca tamoksifen alan hastalarda meme kanseri yinelenme riskinde % 41, meme kanserinden ölüm riskinde % 34'lük bir azalmanın olduğu görülmüştür.
- Tamoksifen ile yapılan 5 yıllık adjuvan endokrin tedavinin yaşlı kadınlar kadar gençlerde de etkili olduğu ve benzer şekilde 5 yıllık kanser yinelenme riskini yaklaşık % 10 azalttığı gösterilmiştir.
- Tamoksifen kullanımı kesildikten sonrada faydalarının devam ettiği görülmüştür.

- ER⁺ veya ER bilinmeyen meme kanserli hastalarda 5 yıllık tamoksifen kullanımının karşı tarafta meme kanseri oluşma riskini % 39 oranında azalttığı görülmüştür.
- ER⁺ olan erken evre meme kanserli, pre- ve postmenapozal kadınlarda 5 yıllık adjuvan tamoksifen tedavisi standart bir seçenektir

Tamoksifen kaynaklı yan etkilerin çoğu, ilacın değişik dokularda ER üzerine antagonist olduğu kadar agonist etki etmesi ile ilişkilidir. Tamoksifen meme kanseri hücrelerine antiöstrojenik etki gösterir ancak kemik, karaciğer ve endometriyum gibi dokularda östrojenik etkiye sahiptir. Bu etkilerin bazıları faydalı iken bazıları ise faydalı değildir. Örneğin; tamoksifen osteoporozdan korur, fakat karaciğerde pıhtılaşma proteinlerini artırır. Bunun tersine aromataz inhibitörlerinin sadece antiöstrojenik etkileri vardır. Anastrozol ile tamoksifenin karşılaştırıldığı çalışmalarda, aromataz inhibitörlerinin osteoporoz ve kırılma oranının % 7 ye % 4 gibi küçük bir oranda arttırdığı görülse de, tedavi esnasında osteoporoz riski baseline osteopeni ile sınırlanabilir. Anastrozol ile letrozolün kullanıldığı en az iki çalışmada 5 yıllık aromataz inhibitörü kullanımının tamoksifen kullanımına göre, yineleme oluşum süresini uzattığı, karşı tarafta meme kanseri oluşum riskini azalttığı fakat toplam hayatta kalma süresinde herhangi bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır. Diğer yandan, son zamanlarda yapılan randomize çalışmalarda, tamoksifen ve aromataz inhibitörlerinin ardışık kullanımının, tamoksifenin 5 yıllık tek başına kullanımına göre hastalısız sağ kalım süresini uzattığı ve meme kanseri oluşum riskini de azalttığı gösterilmiştir. En az iki çalışmada ise bu işlemin yaşam süresini arttırdığı belirtilmiştir (34).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı

Bu çalışmada kullanılan, insan meme adenokarsinomuna özgü MCF-7 hücre hattı Ankara Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) temin edildi.

Bu hücrelerde sitotoksiteyi göstermek için MTT sitotoksite analizi protokolü kullanıldı. Kontrol ve tamoksifen uygulanmış gruplardaki hücrelerden total RNA izole edildi. HERG1 K⁺ kanallarının gen ekspresyon düzeyleri Realtime Revers Transkriptaz PCR ile belirlendi ve elektrofizyolojik analiz için yama kenetleme yöntemi kullanıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

3.2.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

- RPMI-1640 hücre besiyeri ortamı (Biological Industries 01-106-1B)
- Tripsin EDTA (Sigma)
- Fötal Sığır Serumumu (GIBCO)
- L-Glutamin (GIBCO)
- Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin (GIBCO)
- Tripın Mavi Boyası (Sigma)

3.2.2. İlaç ve Toksikite Deneyinde Kullanılan Malzemeler

- Tamoksifen (Sigma)
- MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma)
- Di Metil Sülfoksit (Merck)
- Glisin (Merck)

- Sodyum klorür (Merck)
- Sodyum Hidroksit (Merck)
- Etanol (Sigma)

3.2.3. Gen Ekspresyonu Saptanmasında Kullanılan Kitleler

- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche 05 091 284 001)
- High Pure RNA Isolation Kit (Roche 11 828 665 001)
- Light Cycler 480 Probes Master (Roche 04 707 495 001)

3.2.4. Kullanılan Aletler

- Mikrosantrifuj (Eppendorf)
- Santrifuj (Eppendorf 5804)
- Derin Dondurucu
- Hassas Terazı (Mettler Toledo)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Otomatik pipet (Gilson)
- PClamp software
- Thermal Cycler (Techne, TC 512)
- Gerçek zamanlı PCR cihazı (Light Cycler 480 II, Roche)
- İnkübatör (Esco Cell Culture CO₂ inkubator, CCL-170B-8)
- Etüv (Wisecube Fuzy Control System)
- Hücre Sayım Cihazı (Cedex XS)
- Laminar Akımlı Kabin (Cyto Fast elite, 218 115)
- Vorteks (VELP)

3.3. Kullanılan Ayıraçlar

MTT (5 mg/mL)

- 5 mg MTT
- 1 mL distile suda çözülerek 5 mg/mL'lik konsantrasyona getirildi.
- Hazırlanan çözelti +4 °C'de muhafaza edildi.

Glisin Tamponu

- Glisin.....0,75 g
- NaCl.....0,58 g
- Tartılan kimyasal maddeler distile suda çözüldü ve 1 M NaOH ile pH'sı 10,5'e ayarlandı.
- Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Banyo Çözeltisi

(135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM Glukoz, 10 mM HEPES)

- NaCl.....7,89 g
- KCl.....0,35 g
- CaCl₂.....0,11 g
- Glukoz.....1,08 g
- HEPES.....2,38 g
- Tartılan kimyasallar 500 mL distile suda çözüldü.
- Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- +4 °C'de muhafaza edildi.

Pipet Cözeltisi

(150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA 10 mM HEPES)

- KCl.....1,12 g
- MgCl₂.....0,0095 g
- EGTA.....0,19 g
- HEPES.....0,24 g
- Tartılan kimyasallar 50 mL distile suda cözöldü.
- Distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- +4 °C'de muhafaza edildi

3.4. Kullanılan Yöntemler

Bu araştırmada kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

- Tamoksifen'in 0,1µM, 1µM, 5µM, 10µM, 20µM şeklinde belirlenen konsantrasyonlarını uygulamak üzere MCF-7 hücreleri laboratuvar şartlarında cözögtüldü.
- Tamoksifen'in sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT analizi yapıldı.
- Etkin ve toksik olmayan dozun saptanmasından sonra belirlenen gruplara ilaç uygulaması yapıldı. 24 ve 48 saat sonunda HERG1 K⁺ kanalı gen ekspresyonu için total RNA eldesi ve bunu takiben cDNA eldesi yapıldı.
- Deney grupları şu şekilde oluşturuldu;
 1. 0,1 µM Tamoksifen
 2. 1 µM Tamoksifen
 3. 5 µM Tamoksifen
 4. 10 µM Tamoksifen
 5. 20 µM Tamoksifen

6. Etil Alkol
 7. Kontrol
- Yama Kenetleme
 - Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Statistica v7.0, SPSS for Windows v11.5 ve Scion Image for Windows v4.0 paket programlarındaki basit varyans analizi (One Way ANOVA), Welch, t testi, Bonferroni ve Games Howell, Shapiro Wilk testleri kullanıldı.

3.4.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan MCF-7 hücreleri, hücre kültüründe çoğaltılarak laboratuvar şartlarına uyumu sağlandı. Deney grupları belirlendikten sonra MTT testi kullanılarak sitotoksosite deneyleri yapıldı.

Hücrelerin Besiyeri Ortamı

RPMI	
Fötal sığır serumu	% 10
Penisilin	10.000 U/mL
Streptomisin	10 mg/mL
Amfoterisin-B	0,025 mg/mL
L-Glutamin	29,2 mg/mL

Hücrelerin Fiziksel Ortam Şartları

Sıcaklık	37°C
pH	7,0-7,4
CO ₂	% 5

Hücrelerin Bölünme ve Pasaj Zamanları

Ekilen hücreler, konfluent olana kadar 3-4 günde bir katkılı medyum ile beslendi. Konfluent olan hücrelerm Tripsin EDTA ile yapışıkları yüzeyden kaldırılarak 1:5 oranında pasajlandı.

Üreme Ortamı

T25 (25 cm²) ve T75 (75 cm²) ortam kapları,
24 ve 96 kuyucuklu petri kapları

Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı için, hücre süspansiyonundan 20 µL alındı ve üzerine eşit miktarda tripan mavisi boyası eklendi. Daha sonra bu karışımdaki hücreler özel lamlara damlatılarak CEDEX XS hücre sayım cihazı ile sayıldı. Sayım sonuçlarına göre her kuyucukta 2.500 hücre olacak şekilde 96 kuyulu petri'lere ekim yapıldı.

3.4.2. MTT Testi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizi, tetrazolium tuzunun yalnızca metabolik aktiviteye sahip hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesi prensibine dayanır. Bu yöntem sadece canlı hücreleri belirler. Formazan kristalleri çözüldükten sonra ise hızlı ve pratik bir şekilde mikropate okuyucusunda 570 nm'de miktarı tayin edilir. Prolifere olmayan hücrelere göre, çoğalan hücreler daha çok aktivite göstermektedir. Bu nedenle bu yöntemle sitotoksosite ve hücre canlılığının belirlenmesinin yanı sıra hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir (111).

3.4.2.1 Sitotoksisite Analizi (MTT)

MTT analizi için MCF-7 hücreleri, 5'i ilaç (0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM), 1'i kontrol ve 1'i taşıyıcı (etil alkol) grubu olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Deneyler 96 kuyulu petri kaplarında, her bir kuyuya 200 µL medyum içinde 2500 hücre ekilerek gerçekleştirildi. Her bir petri kabında bir grup için 4 kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Her kuyu bir denek sayıldı. Ayrıca, iki petriye daha aynı şekilde hücreler ekilerek ilk petrinin iki tekrarı daha oluşturuldu. Böylece her grupta 12 denek (n=12) yer almış oldu. Ayrıca ilaç uygulanmasından 24 ve 48 saat sonraki etkileri de karşılaştırabilmek için aynı üçlü set 48 saat için de oluşturuldu. Böylece toplam 6 adet 96 kuyulu petride çalışıldı. Tüm petrilere hücreler aynı anda ekildikten sonra 24 saat inkübe edilerek logaritmik artış fazına (log fazı) girmeleri sağlandı. Petrilere hücrelerin yerleşim düzeni şu şekildeydi:

1. kolona hücre içermeyen boş medyum kondu. Bu medyumların işlevi; bir yanlarındaki kuyularda bulunan hücrelere nem sağlayarak, "kenar etkisi" adı verilen ve çalışma sonuçlarını etkileyebilecek olan olumsuzluğu gidermekti.

2. kolon ilaçsız kontrol grubu olarak kullanıldı.

3. kolon, 0,1 µM tamoksifen içeren deney grubu olarak kullanıldı.

4. kolon 1 µM tamoksifen içeren deney grubu olarak kullanıldı.

5. kolon 5 µM tamoksifen içeren deney grubu olarak kullanıldı.

6. kolon 10 µM tamoksifen içeren deney grubu olarak kullanıldı.

7. kolon 20 µM tamoksifen içeren deney grubu olarak kullanıldı.

8. kolon taşıyıcı madde olan etil alkol grubu olarak kullanıldı.

9. kolonda tekrar ilaçsız kontrol grubu oluşturuldu.

10. kolona da yine bir önceki kolonda kenar etkisi oluşmasını diye hücre içermeyen boş medyum kondu.

Hücre ekiminden 24 saat sonra ilaç gruplarına öngörülen konsantrasyonlarda tamoksifenli medyum, alkol grubuna ilaçlı gruplardaki medyumda var olan konsantrasyonda alkol eklendi. Kontrol gruplarının ise sadece medyumları tazelendi. Petrilere yarısından 24 saat sonra, diğer yarısından ise 48 saat sonra ilaçlı medyum çekilerek ilaçsız medyum kondu. Bu andan itibaren hücrelerin sayılarını ikiye katlama sürelerinin (Population Doubling Time-PDT) 3 katı bir süre (3x29 saat), medyumlar her

gün tazelenerek inkübasyon yapıldı. Bu süre dolduktan sonra MTT analizi gerçekleştirildi. MTT analizi protoklü şu şekilde gerçekleştirildi:

Kuyulardaki medyumlar çekilerek 200 µL taze medyum kondu. Bunun da üzerine PBS içinde eritilerek hazırlanmış 5 mg/mL MTT solüsyonu eklendi. Petriler ışık almaması için alüminyum folyo ile sarılarak inkübatöre yerleştirildi ve 5 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüm medyumlar çekilerek kuyulara 200'er µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi, böylece erimeden kalan MTT-formazan kristalleri de eritildi. DMSO'nun üzerine 50 µL glisin tamponu da eklendikten sonra petri kapları bekletilmeden 570 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucuda okutuldu. Hücre içermeyen, sadece medyum içeren 1. kolon okuyucuda boş (blank) olarak tanıtıldı. Sonuçlar absorbans değerleri olarak elde edildi. Aşağıdaki formüle göre de sitotoksosite hesaplandı:

$$1-(\text{deney kuyucuğunun absorbansı} / \text{kontrol kuyucuğunun absorbansı}) \times 100$$

Kontrole göre % 50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edildi.

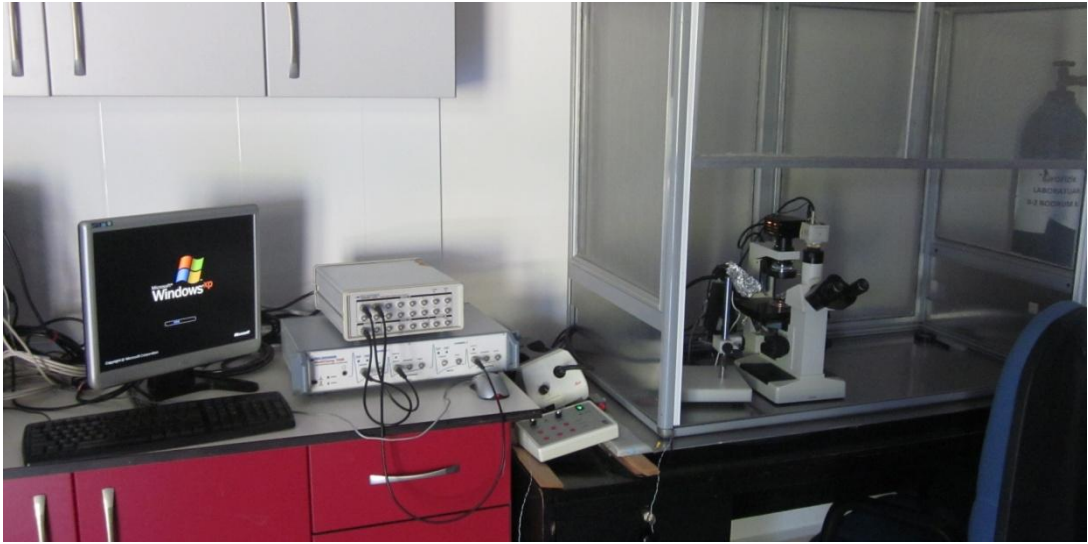
3.4.3. Elektrofizyolojik Kayıtlar

3.4.3.1. Pipetlerin Hazırlanması

Kayıtlarda 1,5 mm dış çapı ve 0,84 mm iç çapı olan, World Precision Instruments (ABD) markalı 1B150F-4 model filamentli borosilikat pipetler kullanıldı. Pipet uçlarının uygun şekil ve büyüklükte olabilmesi için Sutter Instruments CO. (ABD) firmasına ait P-97 model programlanabilir pipet çekici kullanıldı. Pipet içi çözelti ile doldurulduktan sonra, kayıt aşamasında pipet direnç değerleri 2-6 MΩ aralığında elde edildi.

3.4.3.2. Kayıt Sistemi

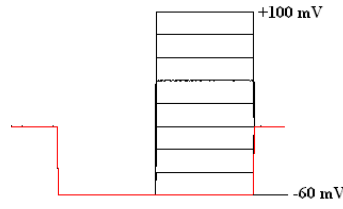
Hücre zarından akım kaydı yapılabilmesi için yama kenetleme yöntemi kullanıldı. Bu amaçla iki kanallı olan bilgisayar kontrollü Multiclamp 700B (Axon Instruments, ABD) yama kenetleme yükselteci ve bununla uyumlu olan Digidata 1322A sayısal çevirici (Axon Instruments, ABD) kullanıldı. Multiclamp 700B yükselteci bilgisayarda kurulu olan MultiClamp 700B Commander (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile yönlendirildi. Kullanılacak olan pipetler CV-7B (Axon Instruments, ABD) model gerilim takibi yapan bir operasyonel yükseltecin pipet tutucu kısmına takılarak Multiclamp 700B yükselteci ile bağlantısı yapıldı. Kayıt aşamasında hücre ile pipetin takibini yapabilmek için BM-37XB (U-Therm International (H. K.) Limited), invert mikroskop kullanıldı (Şekil 3.1). Kenetleme direncinin takibi, belirlenmiş gerilim protokolün hücreye uygulanabilmesi ve akım kayıtlarının yapılabilmesi amacıyla Clampex 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı kullanıldı. Elde edilen kayıtlar Clampfit 9.2 (Axon Instruments, ABD) yazılımı ile analiz edilerek değerlendirildi.



Şekil 3.1. Yama kenetleme elektrofizyolojik kayıt sistemi.

3.4.3.3. Uygulanan Voltaj Protokolü

Hücreler ile pipet arasında mühürleme oluşturularak hücre -40 mV'ta kenetlendi. Ardından 10 ms süreli -60 mV'a kenetleme ve onun sonrasında 10 ms'lik -60 mV ile başlayarak 20 mV'luk artışlarla 100 mV'a kadar arttırılan voltaj protokolü uygulandı (Şekil 3.2). Alınan akım kayıtlarında tüm hücre kayıt alma yöntemi kullanıldı. Mühürleme direnci $2-10$ G Ω arasında olan kayıtlar değerlendirildi.



Şekil 3.2. Zar için kenetleme potansiyel protokolü.

3.4.3.4. Deney Grupları

Tamoksifen uygulaması için 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M'lık doz grupları oluşturuldu ve yapılan güç analizi değerlendirmesine göre her bir grupta $n=3$ olacak şekilde hücrelerden kayıt alındı. Bu üç gruba ek olarak tamoksifenin etil alkolde çözülmesinden dolayı hücrelerin maruz kaldığı maksimum alkol miktarına (% 1,18) uyum bir etil alkol grubu ($n=3$) da çalışıldı. Mühürleme oluştuktan sonra hücreden tamoksifen/etil alkol eklenmeden $0.$ dakika kontrol ve tamoksifen/etil alkol uygulamasından sonra ise $10.$ dakika ve $20.$ dakikalarda akım kaydı alındı.

3.4.4. Gen Ekspresyon Deneyleri

PCR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. In vivo

şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir (112). Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermal cyclers) hassas ölçüm aletleri ile birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Bu yöntem ile DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmektedir. Ayrıca çok sayıda örnek oldukça az kontaminasyon riski ile güvenle çalışılabilmektedir (113).

3.4.4.1. Primer Dizayını

Çalışma için kullanılan primer setleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. HERG1 K⁺ kanalı gen ekspresyonunda kullanılan primer dizileri.

Primer	Uzunluk	Pozisyon	Tm	% GC	Primer dizileri
Forward	20	678-697	59	45	CAAAGTGGAAATCGCCTTCT
Reverse	21	720-740	59	52	ACCACATCCACCAGACATAGG

3.4.4.2. Total RNA kiti ile RNA İzolasyonu

İçerisinde tamoksifenin farklı konsantrasyonları uygulanmış MCF-7 hücreleri (10⁶ hücre) 200 µL PBS ve 400 µl lizis binding tamponu karışımında süspansiyon edildi. Toplam hacmi 600 µL olan bir karışım elde edildi. Örnek sayısı kadar filtreli tüp ve toplama tüpleri hazırlandı ve karışım filtreli tüp içerisine konuldu. 15 sn 8000xg'de santrifüj edildi. Toplama tüpleri boşaltıldı. Filtreli tüpler tekrar toplama tüplerine aktarıldı. Her bir örneğe 90 µL DNaz inkübasyon tamponu + 10 µL DNaz I eklendi. 15 dk süre ile +15/+25 °C'de inkübasyona bırakıldı. Filtreli tüplerin içerisine 0,5 mL yıkama tamponu I ilave edilip, 15 sn 8000xg'de santrifüj edildi. Toplama tüpleri boşaltıldı ve filtreli tüpler tekrar toplama tüplerine aktarıldı. Filtreli tüplerin içerisine 0,5

mL yıkama tamponu II eklendi, 15 sn 8000xg'de çevrildi ve toplama tüpleri boşaltıldı. Filtreli tüpler tekrar toplama tüplerine aktarıldı. Filtreli tüplerin içerisine 0,2 mL yıkama tamponu II konulup 2 dk (maksimum devirde 13000xg'de) çevrildi ve toplama tüpleri atıldı. Filtreli tüpler kapaklı 1,5 mL lik ependorf tüplere aktarıldı. Her örneğe 50-100 µL elüsyon tamponu eklendi ve 1 dk 8000xg'de santrifuj edildi.

Elde edilen RNA'lar direkt cDNA sentez kiti ile cDNA ya çevrildi veya elüsyon içindeki RNA'lar -80 °C de saklandı.

3.4.4.3. Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti ile cDNA Eldesi

cDNA eldesi 2 aşamada yapıldı. İlk aşamada elde edilen her bir 9 µl'lik saf total RNA'ya 2 µL random hexamer primer ve 2 µL distile su eklendi ve bu karışım termal cycler cihazında, 65 °C de 10 dk bekletildi. İkinci aşamada ise 13 µL ürün + 4µL transkriptör revers transkriptaz reaksiyon tamponu, 0,5 µL RNaz inhibitörü, 2µL deoksiribonükleotid trifosfat karışımı ve 0,5 µL transkriptör revers transkriptaz eklendi. Bu karışım 25 °C'de 10 dk, 50 °C'de 60 dk, 85 °C'de 5 dk bekletildi ve elde edilen cDNA örnekleri analizi yapılmıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.4.4.4. Realtime Revers Traskriptaz PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi

Elde edilen cDNA örneklerinden HERG1 ve Beta Actin housekeeping gen ekspresyonları Realtime Revers Transkriptaz PCR ile Light Cyclers 480 Probes Master (Roche) kiti kullanılarak analiz edildi. HERG1 K⁺ kanalı gen ekspresyonu analizi için kullanılan materyallerin konsantrasyonları ve miktarları Çizelge 3.2'de verildi.

Çizelge 3.2. Beta Actin housekeeping gen ve HERG1 K⁺ kanal gen ekspresyon analizinde kullanılan materyallerin konsantrasyon ve miktarları.

İçerik	Konsantrasyon	Bir örnek için harcanan miktar
Saf Su	-	3,8 µL
Primer (Forward)	20 µM	0,4 µL
Primer (Reverse)	20 µM	0,4 µL
UPL Probe	10 µM	0,4 µL
Probe Master	2x	10 µL
Toplam Hacim		15 µL

Her bir örnek için yukarıdaki karışıma 5'er µL cDNA eklenerek, Light Cycler 480 Sistemine ait pleytler üzerinde çalışıldı.

Light cycler cihazı ile PCR koşulları şu şekilde belirlendi (Çizelge 3.3);

Çizelge 3.3. HERG1 gen ekspresyon analiz için uygulanan PCR koşulları.

PCR koşulları	Döngü	Hedef ısı (°C)	Bekleme Süresi (sn)	Isı geçiş oranı (°C/sn)
Denatürasyon	1	95	600	4,4
Amplifikasyon	45	95	10	4,4
		60	30	2,2
		72	1	4,4
Soğuma	1	40	60	2,2

Analiz

Housekeeping gen (Beta Actin) FAM (465-510) dalga boyunda, hedef gen (HERG) ise VIC / HEX / Yellow 555 (533-580) dalga boyunda Roche Light Cycler 480 Real Time PCR sisteminin Version 1.5.0 Software üzerinden "Advanced Relative Quantification" hesaplamaları ile yapıldı. Her bir gruptan elde edilen geçiş noktası değeri (CP), Beta Actin housekeeping gene oranlanarak ekspresyonların rölatif oranı (E

değeri, efficiency) saptandı. Kontrole göre örneklerin E değeri karşılaştırılarak gen ekspresyon düzeyi belirlendi. E değeri;

$$E = 2^{-(\text{rnek CP değeri/housekeeping CP değeri})}$$

formülü ile hesaplandı.

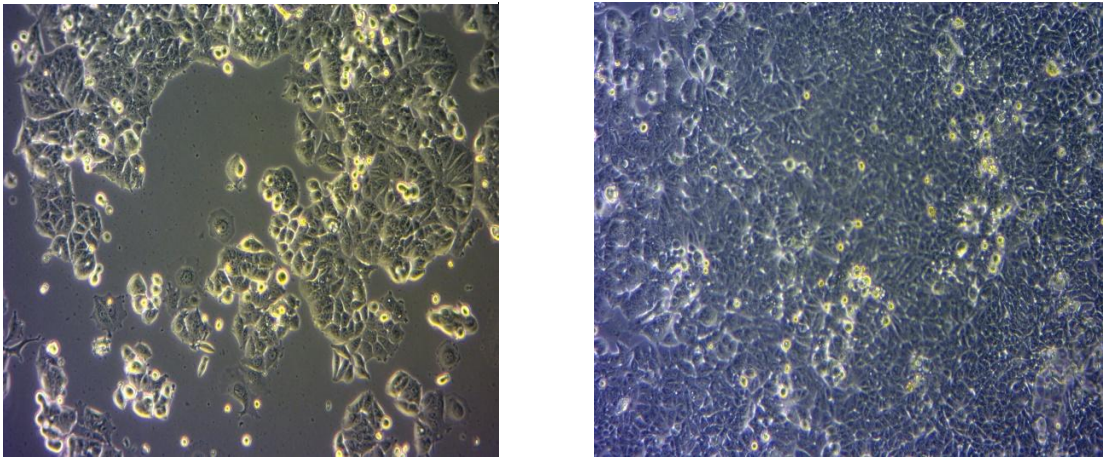
3.5. İstatistiksel Analizler

MTT analiz deneyleri on iki kez, gen ekspresyon deneyleri dört kez tekrar edildi ve bu çalışmada elde edilen veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. MTT analizinde yedi grup, gen ekspresyon deneylerinde ise beş grup çalışıldı. Bu grupların 24. ve 48. saatlerdeki ölçümleri kaydedildi. Saatlerdeki gruplar arası farklılıklar için basit varyans analizi (One Way ANOVA) testi kullanıldı. Varyansların homojenliğinin kontrolü Levene testi ile yapıldı; varyansları homojen olanlar için One Way ANOVA, olmayanlar için Welch testi kullanıldı. İekli karşılaştırmalar için ise Bonferroni ve Games Howell testleri kullanıldı. Her bir gruptaki tekrarlanan ölçümler arasındaki farklılıklar için t testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MTT sitotoksisite bulguları

Hücre kültürü çalışmaları için; Ankara Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK) tarafından temin edilmiş olan MCF-7 hücreleri 3 gün arayla, medyumlarının değiştirilmesi suretiyle 75 cm' lik flasklarda beslenmiştir. Hücreler faz kontrast mikroskopunda incelendiğinde, hücrelerin % 70 konfluense ulaştıkları görüldüğünde hücre canlılığının ve sayısının devamlılığını sağlamak için hücreler pasajlanmıştır (Şekil 4.1.a). Kontrol kuyucuğunun 48 saatlik inkübasyon sonrası hücrelerdeki çoğalma açıkça görülmektedir (Şekil 4.1.b).



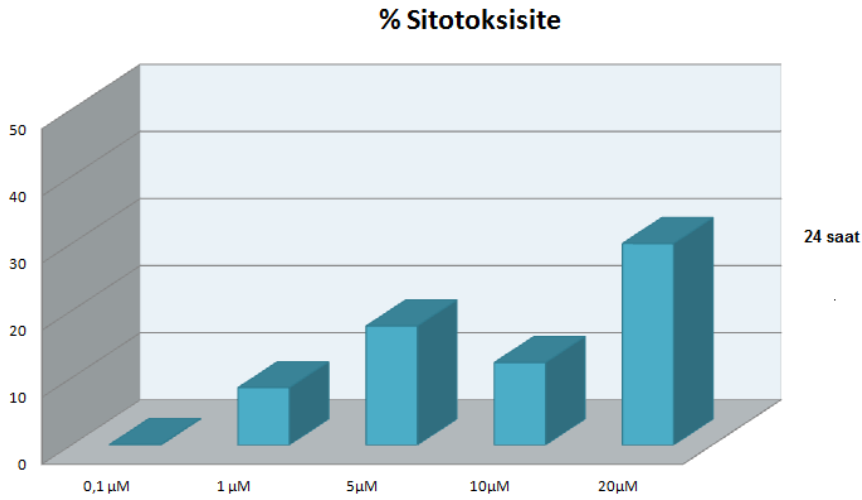
Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerinin a) Konfluent olmamış hücreler b) Konfluent olmuş hücrelerin mikroskopik görünümü.

Bu aşamadan sonra kontrol olarak sadece medium, 5 farklı konsantrasyon tamoksifen ve tamoksifenin çözücüsü olarak etanol eklenerek çalışmaya devam edilmiştir.

Sitotoksisite bulgularında, MTT metoduna uygun olan hücre sayısını belirlemek için MCF-7 hücreleri kullanıldı. Farklı sayılarda MCF-7 hücrelerinin MTT testiyle

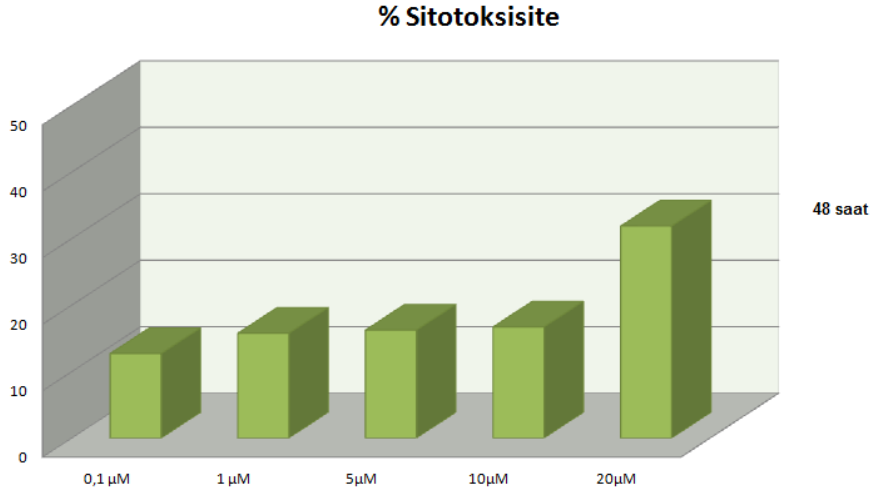
verdiği absorbanslar ölçüldü. Alınan sonuçlara uygun sayıda hücreler sitotoksik testlerinde kullanıldı.

Buna göre; 24 saat sonunda tamoksifenin MCF-7 hücreleri üzerine konsantrasyona bağımlı sitotoksik etkisi saptanmıştır (Şekil 4.2). 0,1µM konsantrasyonda sitotoksik etki % 50'nin çok altında iken 20 µM'da ise % 30'a ulaşmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Tamoksifen'in 24 saat sonunda MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.

48 saat sonunda ise farklı konsantrasyonlardaki tamoksifenin MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinde, en etkin doz aralığının 20 µM olduğu belirlenmiştir, diğer dozlarda ise IC₅₀'nin oldukça altında değerler saptanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Tamoksifen'in 48 saat sonunda MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.

Çalışmadaki 7 grubun ve bu grupların 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık ölçümleri kaydedilmiştir. Tekrarlanan ölçümleri dikkate almadan sadece gruplar arası farklılıklar incelendiğinde canlılık oranları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Gruplar dikkate alınmadan sadece zamanlar açısından incelendiğinde farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Grup ve zaman birlikte ele alındığında ise hücre canlılık ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p = 0,502$).

Ardından, her bir grup için zamanlar arasında farklılığın anlamlı olup olmadığı araştırılmıştır ve her bir grupta 24. ve 48. saatlerdeki ölçümler arası farklılıklar anlamlı bulunmuş ve 48. saatteki ölçüm ortalamaları 24. saatteki ölçüm değerlerinin ortalamalarından daha küçük bulunmuştur. Yani, 48. saatte canlılık oranı azalmıştır. Bunlara ait tanımlayıcı istatistikler (ortalama ve standart sapma) ve p değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bunun yanı sıra, her bir zaman diliminde gruplar arası farklılıklar incelenmiş ve 24. saatte alınan ölçümlere bakıldığında, 20 µM grubu ile kontrol grubu, 20 µM grubu ile 0,1 µM grubu, 20 µM grubu ile etil alkol grubu arasındaki farklılık anlamlı olarak saptanmıştır ($p < 0,05$). Yine 24. saatte kontrol grubu ile 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve etil alkol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. 48. saatteki canlılık oranları incelendiğinde 0,1 µM grubu ile kontrol grubu, 10 µM grubu ile kontrol, 20 µM grubu ile kontrol grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, 20 µM grubu ile 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM ve

etil alkol grupları arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur. Bunlara ait tanımlayıcı istatistikler ve p değerleri de Çizelge 4.1’de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. MCF-7 hücre hattında HERG1 K⁺ kanal geni için 24 ve 48 saatteki canlılık oranı, ortalamalar ve p değerleri.

Gruplar	24.saat	48.saat	P
Kontrol (n=12)	0,122 ± 0,019	0,105 ± 0,012	0,006
0,1 µM (n=12)	0,122 ± 0,033	0,092 ± 0,006 ^a	0,005
1 µM (n=12)	0,112 ± 0,028	0,088 ± 0,013	0,006
5 µM (n=12)	0,101 ± 0,015	0,088 ± 0,015	<0,001
10 µM (n=12)	0,108 ± 0,025	0,087 ± 0,009 ^a	0,024
20 µM (n=12)	0,086 ± 0,009 ^{a,b}	0,071 ± 0,006 ^{a,b,c,d,e}	0,002
Etil alkol (n=12)	0,122 ± 0,023 ^f	0,099 ± 0,021 ^f	0,010
P	0.001	<0.001	

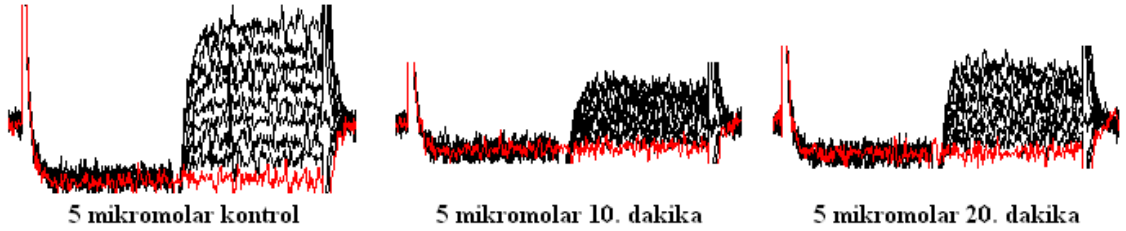
a: kontrol grubu ile olan farklılıkları, b: 0.1 µM olan farklılıkları,
c: 1 µM ile olan farklılıkları, d: 5 µM ile olan farklılıkları
e: 10 µM ile olan farklılıkları, f: 20 µM ile olan farklılıkları
g: etil alkol ile olan farklılıkları göstermektedir.

4.2. Elektrofizyolojik bulgular

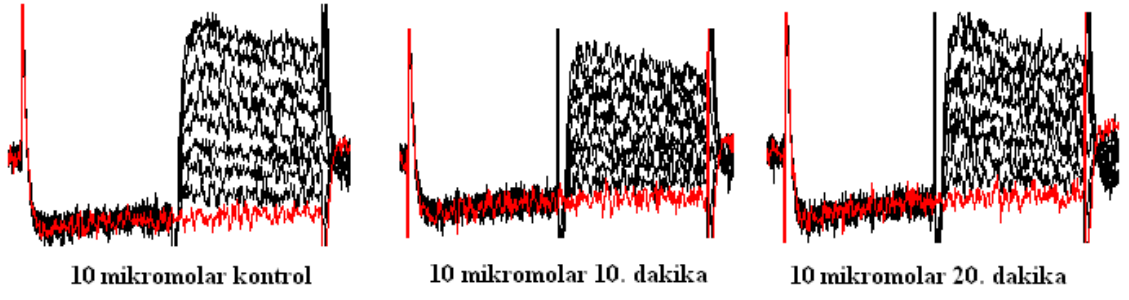
Clampfit 9.2 yazılımı ile her doz grubu için kaydedilen akımların kendi içlerinde ortalamaları alınmış ve Şekil 4.4’deki eğriler elde edilmiştir. Bu akım değerleri ve kenetleme potansiyeli arasındaki ilişkiyi veren akım-voltaj eğrileri Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8’de gösterilmiştir. Her bir grup için ortalama akım değerleri Çizelge 4.2’de ve bunun grafik olarak gösterimi de Şekil 4.9’da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında doza ve süreye bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır.

İstatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen doz gruplarının kendi içlerinde süre ve yüzdellik değişimler dikkate alındığında büyük miktarda değişimler olduğu gözlenmiştir. Gruplar tek tek değerlendirildiğinde, 5 µM tamoksifen doz grubunda 0.dakikada (kontrol) ortalama akım değeri 53,51±36,65 pA, 10. dakikada 27,06±2,76 pA ve 20. dakikada 29,70±9,14 pA olarak bulunmuştur. Kontrol değeri ile karşılaştırıldığında 10. dakikada akımın % 49,43 ve 20. dakikada % 44,50 azaldığı gözlenmiştir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p<0,05). Yine

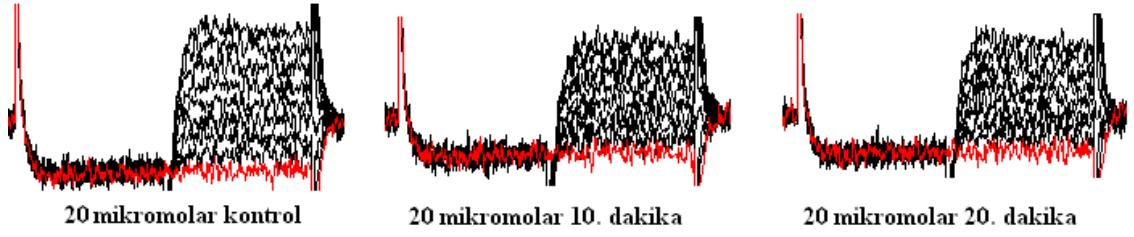
10 μ M tamoksifen grubunda ortalama akım değeri kontrol grubunda $68,15 \pm 12,72$ pA iken, 10. dakika $44,76 \pm 23,97$ pA ve 20. dakikada $52,69 \pm 20,14$ pA olarak bulunmuş ve kontrol değeri ile karşılaştırıldığında 10. dakika akımının % 34, 32 azaldığı ve 20. dakika % 22,69 azaldığı görülmüştür. Tamoksifen dozunun en yüksek olduğu 20 μ M'lık doz grubunda ise ortalama akım değeri kontrol grubunda $52,49 \pm 3,17$ pA, 10. dakikada $44,35 \pm 15,85$ pA ve 20. dakikada $48,42 \pm 20,80$ pA değerlerindedir. Bu grupta ise kontrole göre ortalama akım değeri 10. dakikada % 15,51 azalmış ve 20. dakikada % 7,75 azalmıştır. Etil alkol grubunda ise kontrol için ortalama akım değeri $131,59 \pm 86,37$ pA iken 10. dakikada $206,24 \pm 220,54$ pA ve 20. dakikada da $124,52 \pm 76,75$ pA olmuştur. Tamoksifen gruplarının tersine etil alkol grubunda ortalama akım değeri kontrole göre 10. dakikada % 56,85 artmış 20. dakikada ise % 5,37 artış olmuştur. Bunun yanı sıra doz grupları arasında bakıldığında bu yüzdeler tamoksifen dozu ile yüzdeler değişim arasında ters orantı vardır, alkol grubunda ise tamoksifenin tersine akım değerlerinde azalma değil artış gözlenmiştir.



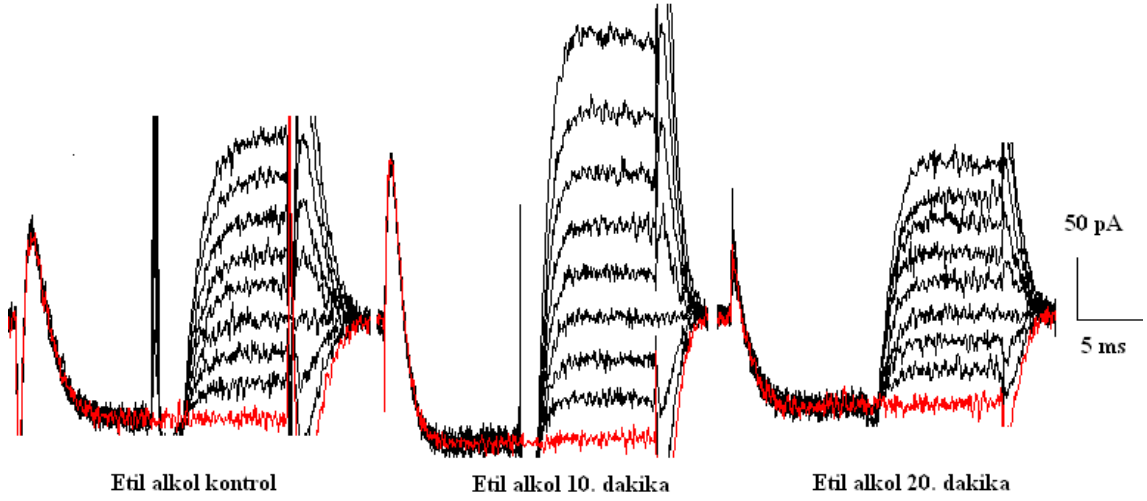
Şekil 4.4. 5 μ M tamoksifen uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları.



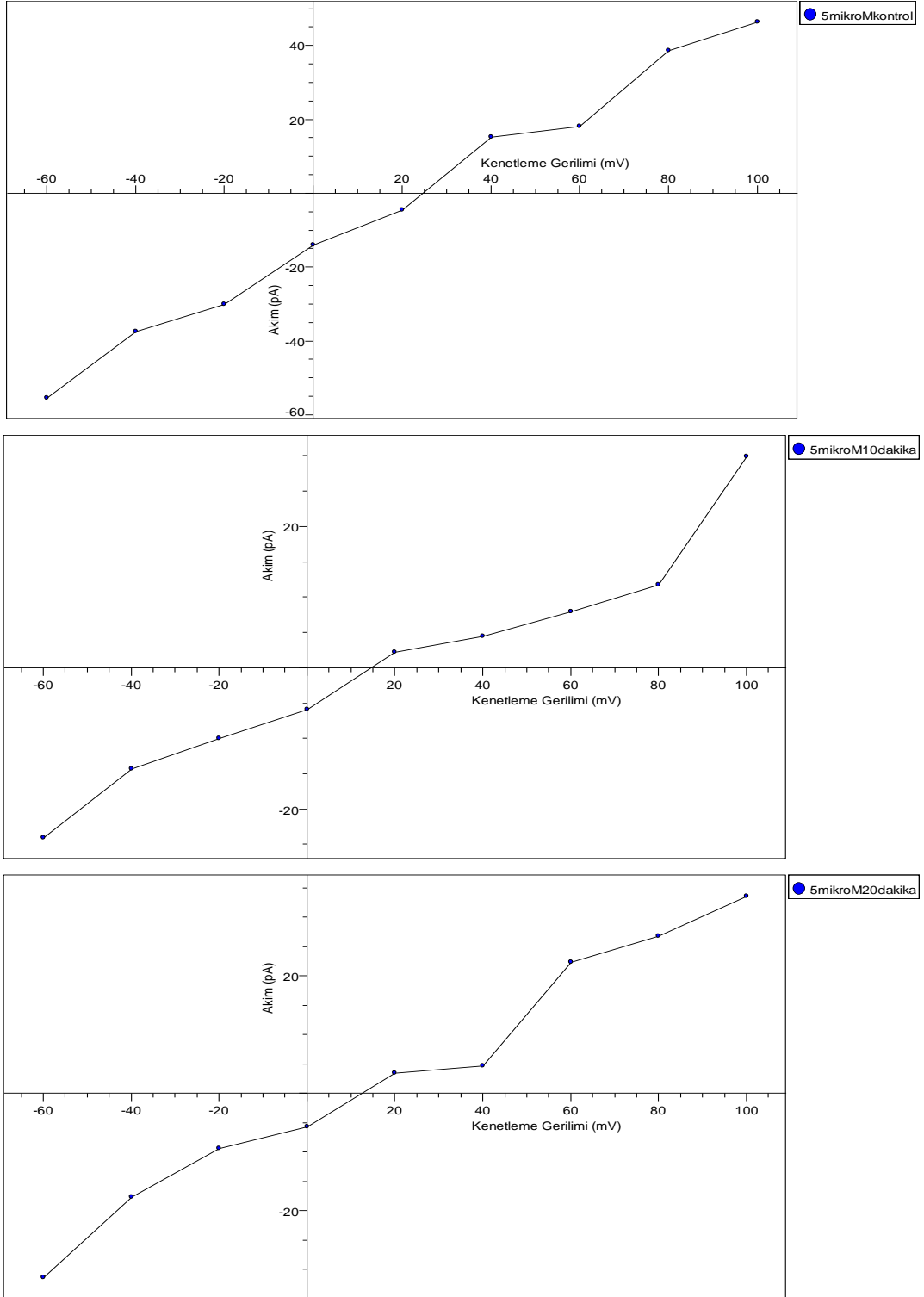
Şekil 4.5. 10 μ M tamoksifen uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları.



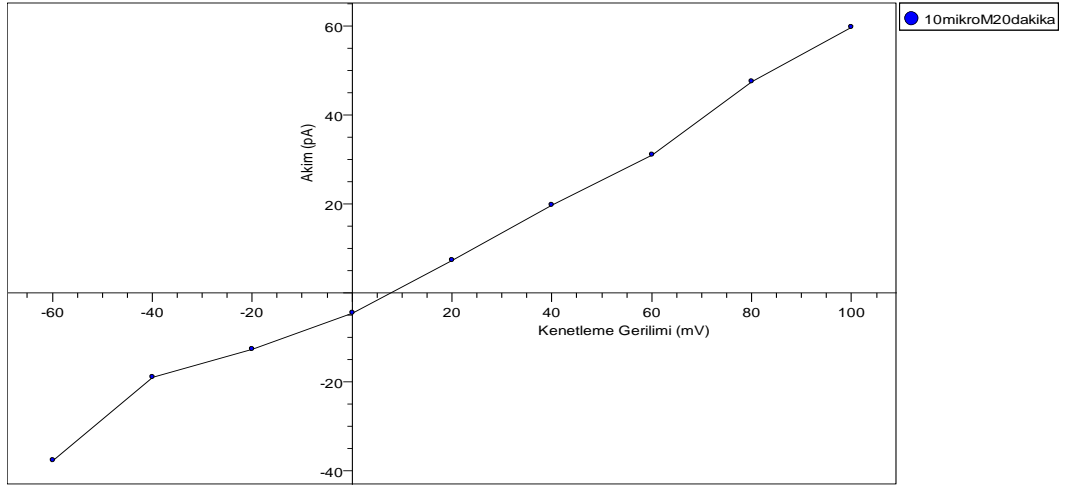
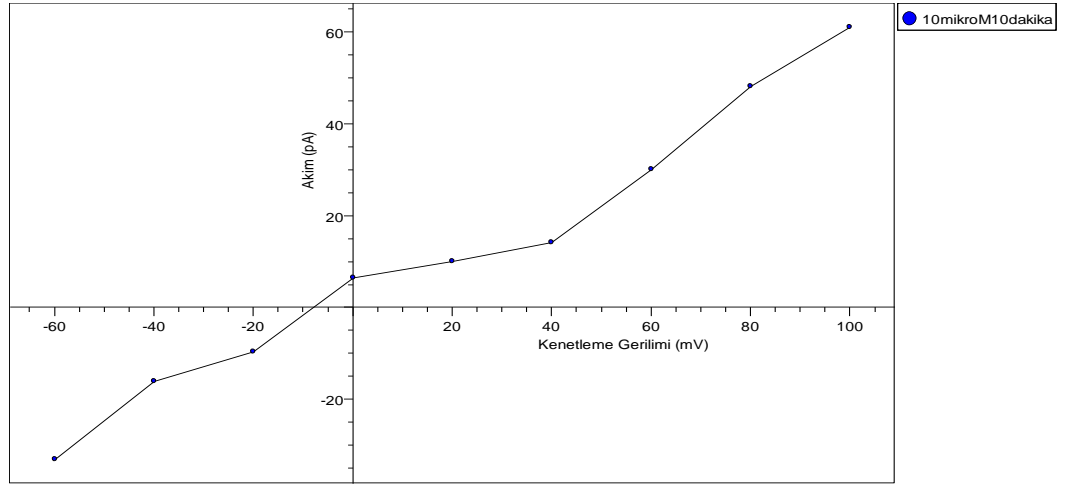
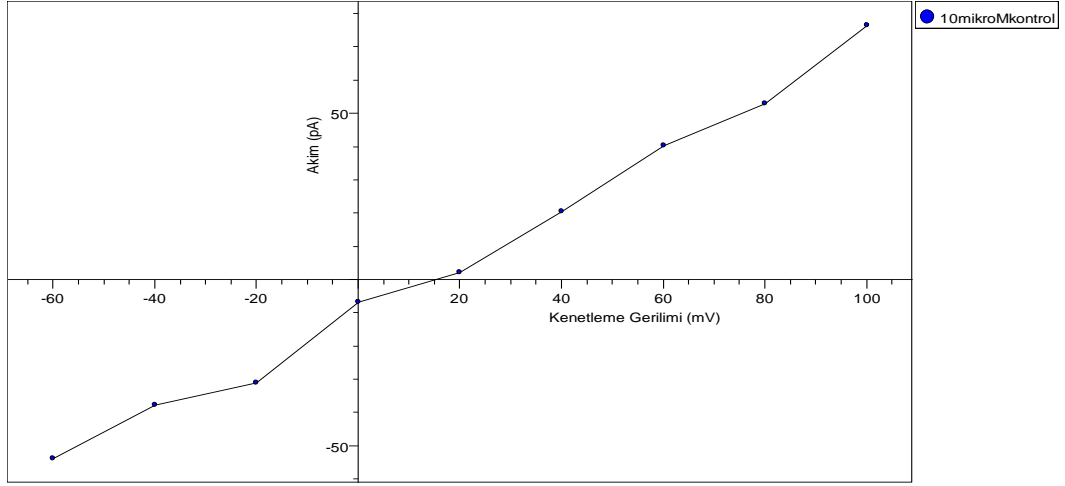
Şekil 4.6. 20 μ M tamoksifen uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları



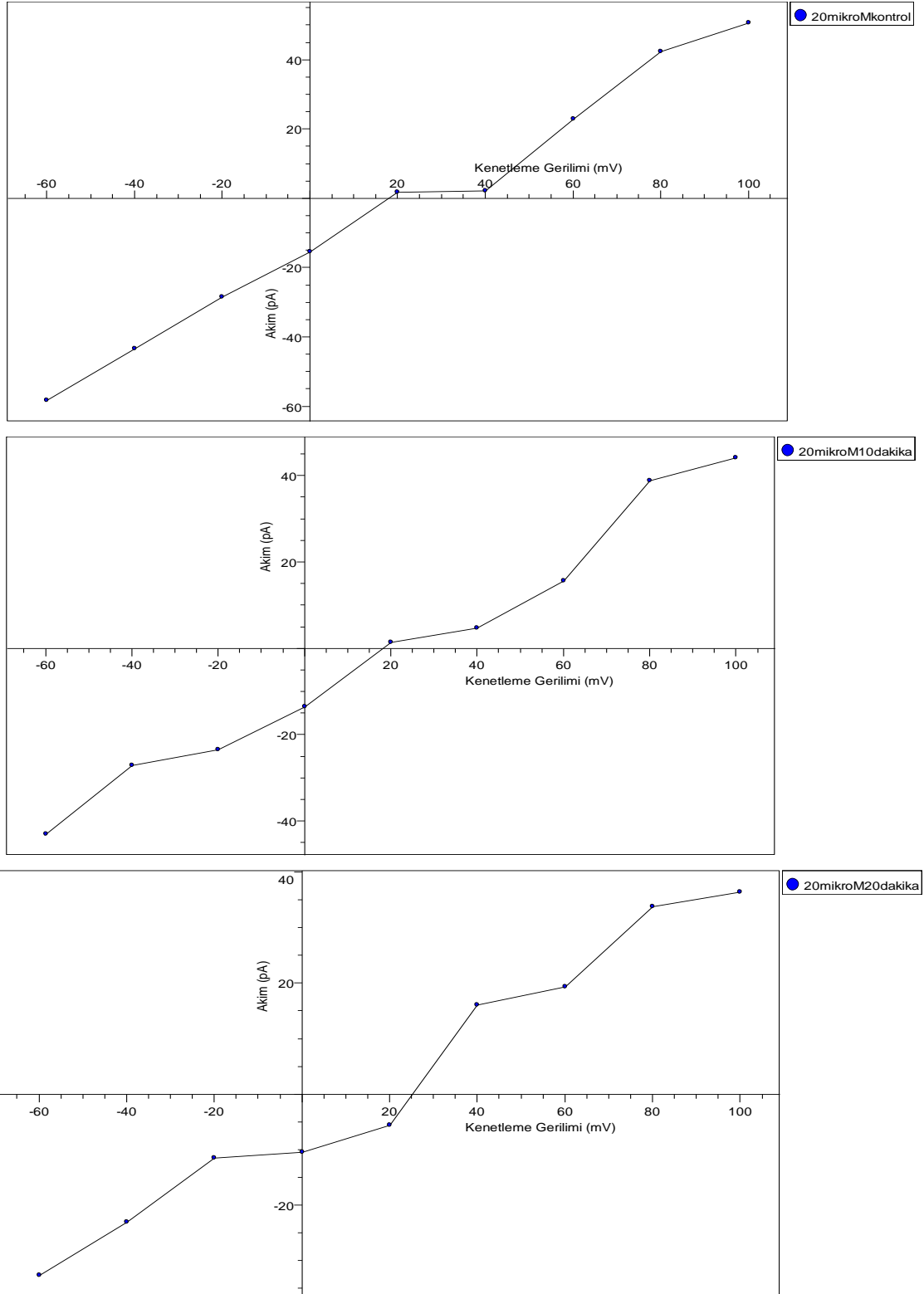
Şekil 4.7. Etil alkol uygulaması için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika kayıtları.



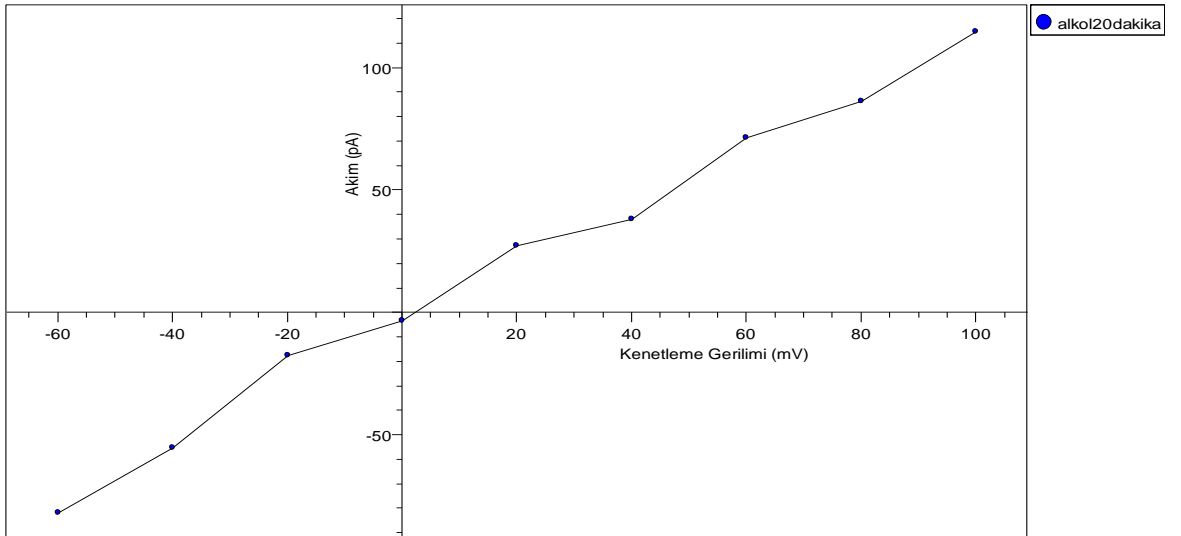
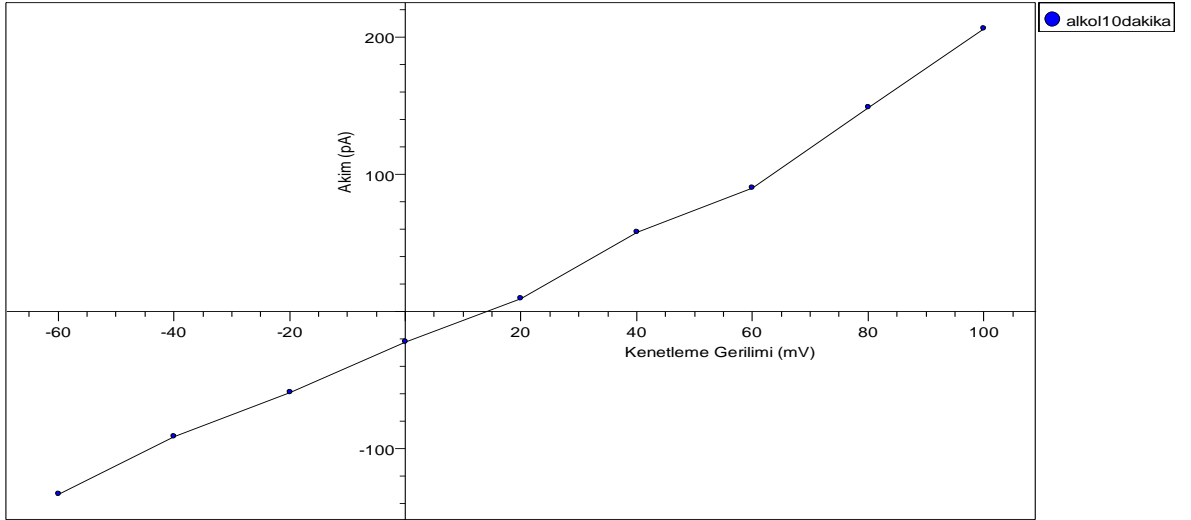
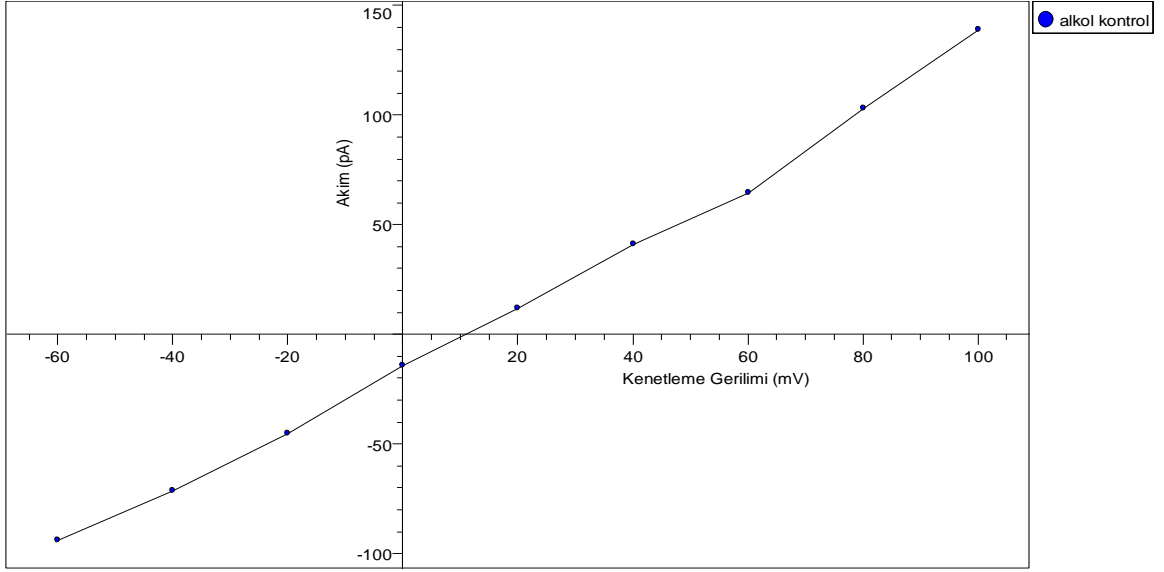
Şekil 4.8. 5 μ M tamoksifen grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika akım voltaj eğrileri.



Şekil 4.9. 10 μ M tamoksifen grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika akım voltaj eğrileri



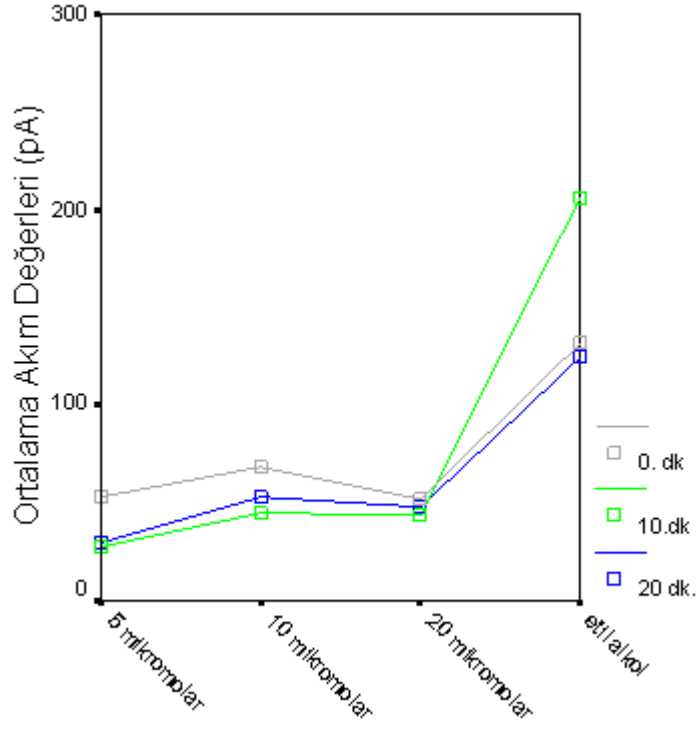
Şekil 4.10. 20 μM tamoksifen grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika akım voltaj eğrileri



Şekil 4.11. Etil alkol grubu için sırasıyla kontrol, 10. dakika ve 20. dakika akım voltaj eğrileri.

Çizelge 4.2. MCF-7 hücrelerinden elde edilen akım değerleri ortalamaları.

Grup \ Akım	Kontrol (pA)	10. dakika (pA)	20. dakika (pA)
5 μ M	53,51 \pm 36,65	27,06 \pm 2,76	29,70 \pm 9,14
10 μ M	68,15 \pm 12,72	44,76 \pm 23,97	52,69 \pm 20,14
20 μ M	52,49 \pm 3,17	44,35 \pm 15,85	48,42 \pm 20,80
Etil Alkol	131,59 \pm 86,37	206,24 \pm 220,54	124,52 \pm 76,75

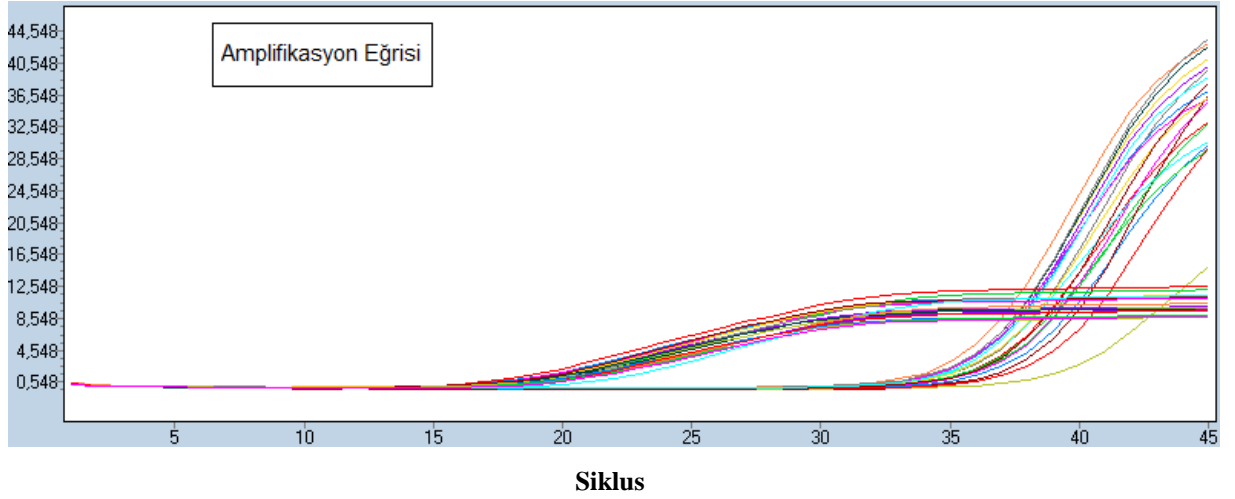


Şekil 4.12. Ortalama akım değerlerinin grafik gösterimi

4.3. HERG1 K⁺ kanalı gen ekspresyon bulguları

Gen ekspresyon analizi için kontrol, etil alkol, 5 µM, 10 µM, 20 µM olmak üzere 5 grup oluşturuldu. MCF-7 hücre hattının 24. ve 48. saat sonunda, tamoksifenin HERG1 K⁺ kanal geninin ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. MCF-7 hücre hattı için çalışılan tüm grupların 24. saatte HERG1 geni için amplifikasyon eğrisi Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

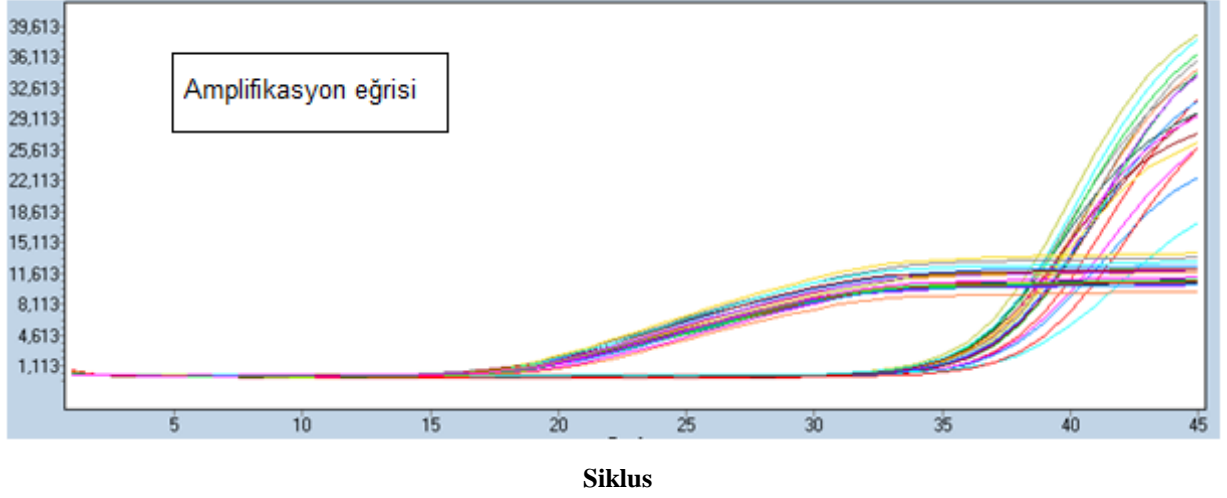
Floresans



Şekil. 4.13. MCF-7 hücre hattında 24 saat sonunda HERG1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

MCF-7 hücre hattında çalışılan tüm grupların 48. saatte HERG1 geni için amplifikasyon eğrisi Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Floresans



Şekil 4.14. MCF-7 hücre hattında 48 saat sonunda HERG1 geni için elde edilen amplifikasyon eğrisi.

Gen ekspresyon çalışmasında 5 grubun ölçümleri ve aynı zamanda da 24. ve 48. saatlerdeki ölçümleri kaydedilmiştir. Tekrarlanan ölçümleri dikkate almadan sadece gruplar arası farklılıklar incelendiğinde 24 saat için HERG1 K⁺ kanal gen ekspresyonunda farklılık tespit edilememiştir (p=0,106). 48. saatteki ölçümlerde ise 20 µM grubu ile 5, 10 µM ve etil alkol grubu karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak HERG1 K⁺ kanal gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Bunlara ait tanımlayıcı istatistikler ve p değerleri de Çizelge 4.2’de yer almaktadır.

Çizelge 4.3. MCF-7 hücre hattında HERG1 K⁺ kanal geni için 24 ve 48 saatteki gen ekspresyon oranı, ortalamalar ve p değerleri.

Gruplar	24.saat	48.saat	P
Kontrol (n=4)	0,247 ± 0,108	0,346 ± 0,078	0,356
Etil alkol (n=4)	0,240 ± 0,029	0,205 ± 0,053	0,412
5 µM (n=4)	0,0527 ± 0,172	0,172 ± 0,114	0,158
10 µM (n=4)	0,439 ± 0,214	0,320 ± 0,064	0,214
20 µM (n=4)	0,467 ± 0,253	0,610 ± 0,148 ^{a,b,c,d}	0,404
P	0,106	0,001	

a: kontrol grubu ile olan farklılıkları, b: etil alkol ile olan farklılıkları, c: 5 µM ile olan farklılıkları, d: 10 µM ile olan farklılıkları göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Son yirmi yılda tümör gelişiminde iyon kanalları ve iyon akımının rolü olduğuna dair çalışmalarda kayda değer bir artış söz konusudur (7). Ancak bu konudaki mevcut bilgiler yeterli olmamakla birlikte oldukça sınırlıdır (114).

K^+ kanallarının meme kanseri hücrelerine etkisi uzun süredir bilinmektedir. Her ne kadar geçici bir hiperpolarizasyon hücre döngüsünün erken G1 evresinin ilerlemesinde gerekli olsa da, kanser hücreleri normal hücrelerden ortalama daha depolarizedir. K^+ akışındaki blokaj depolarizasyona neden olmakta, geçici hiperpolarizasyonun inhibisyonuyla proliferasyona engel olunmaktadır (115).

Hücresel fonksiyon ve hücre proliferasyonu çok sıkı bir biçimde çok sayıda bağımsız mekanizma tarafında kontrol edilmektedir (115).

Spesifik K^+ kanallarının tespit edilmesi, tüm hücre tiplerinin proliferasyon kontrolünü kapsar. Herhangi bir durumda K^+ kanalı, membran potansiyelinin kontrolünde anahtar rol oynadığı için proliferasyon sürecinde önemli olduğu öngörülmektedir (114). Genel olarak K^+ kanal fonksiyonunun inhibisyonu proliferasyonda azalmaya yol açar. 1996'da Wonderlin ve Strobl yaptıkları bir çalışmada 4-aminopiridin, guanidin, tetraetilamoniyum gibi non-spesifik K^+ kanal blokörlerinin; lenfositler, kahverengi yağ hücreleri, melonama, meme kanseri, nöroblastoma, mesane ve kolon hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Hücreler hücre döngüsünün ilerlemesi için K^+ kanalına ihtiyaç duyarlar. Hücre döngüsünde G1 progresyonunun başlaması K^+ kanal aktivitesini gerektirir. Eğer K^+ kanalı inhibe edilirse proliferasyon bozulur. Proliferasyon üzerine etki gösterebilmeleri için çoğu K^+ kanal inhibitörlerinin yüksek dozda olması gerekir. Bir çok inhibitör yüksek konsantrasyonlarda tamamen alakasız proteinler üzerine etki edebilir ve non-spesifik etkiler gözlenebilir. Bunun yanı sıra bazı toksinler dışında spesifik K^+ kanal tipleri için belli birkaç inhibitör bulunmaktadır. Bu inhibitörlerden biride non-steroidal bir antiöstrojen olan tamoksifendir (5). Tamoksifen günümüzde meme kanserinin tedavisinde kullanılan en yaygın ilaçlardan bir tanesidir. Metabolitlerinin östrojen reseptörlerine bağlanmada östrodiol ile yarıştığı ve reseptör blokajı üzerinden antitümöral etki gösterdiği düşünülmekle beraber etki mekanizması

henüz tam detaylarıyla aydınlatılabilmemiş değildir. Öte yandan son yıllarda yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinde özellikle başta Na^+ ve K^+ olmak üzere iyon kanallarının ekspresyon ve aktivitelerinin artmış olduğu ve yeni bir tedavi stratejisi olarak iyon kanal ekspresyonunun ve aktivasyonunun baskılanmasının, tümör hücrelerinde proliferasyonu ve metastaz potansiyelini düşürdüğü rapor edilmiştir.

Allen ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada, tamoksifenin ligand-kapılı katyon-seçici kanalları inhibe ettiğini göstermişlerdir (116). Tamoksifenin antitümör etkisi östrojen reseptörlerine bağlanarak gerçekleşmektedir. İnsan meme karsinomasından elde edilen hücre sitozollerinde tamoksifenin östrojen ile reseptöre bağlanma konusunda yarıştığı tespit edilmiştir (106). Fakat tamoksifenin antiöstrojen aktivitesinin yanında, kalmodiline bağlanma, protein kinaz C inhibisyonu, büyüme faktörü üretiminin stimülasyonu ve antioksidan gibi çeşitli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu intraselüler etkilere karşın; tamoksifenin hacimle düzenlenen kanallar ve bir dizi voltaj kapılı Na^+ , Ca^{2+} ve K^+ iyonlarını içeren plazma membran kanal akımlarını bloke ettiği de gösterilmiştir (116).

Tsong ve ark. östrojen ya da tamoksifen ile tedavinin vasküler BKa kanallarının a ve h altbirimlerinin her ikisinde de mRNA ekspresyonunu etkilemediğini saptamışlardır. Kv kanallarının α -altbirim proteinlerinin (Kv1.5) memeli vasküler kas hücrelerinde mRNA ve protein seviyelerinin ekspresyonu saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise tamoksifenin CI kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca voltaj kapılı Na L-tip Ca^{2+} kanallarının ve non selektif katyon kanallarının da inhibisyonu gösterilmiştir (117).

Bu çalışmalardan farklı olarak Coiret ve ark. ise tamoksifenin BK kanallarını aktive ettiğini ve MCF-7 kanser hücrelerinin proliferasyonunu uyardığını rapor etmişlerdir (106).

Hücre proliferasyonu üzerine tamoksifenin etkisi, dinlenme durumundaki K^+ akımı üzerine tamoksifenin etkisi ile korelasyon göstermektedir. Tamoksifenin antitümör etkisinin K^+ kanalları ile etkileşiminde dolaylı olabileceği düşünülmektedir (5).

Tamoksifen; direkt bir şekilde Ca^{2+} kanal aktivitesini inhibe edebilmektedir. Tamoksifenin ER negatif ve progesteron negatif hastalarda yaklaşık % 10 etkili olduğu bilinmektedir. Meme kanser dokusunda tamoksifenin tedavi edici konsantrasyon değeri

mikromolar düzeylerde olabilir. TRPV6 inhibisyonu için IC₅₀ konsantrasyonu oositlerde 7,5 µM olarak bulunmuştur. Bir benzer oranda tümör doku hücrelerinde görülmüştür. İlacın bu etkisi klinik olarak uygun olabilir. Daha spesifik TRPV6 inhibitörleri eksprese TRPV6 meme kanseri tümör hücrelerinin gelişimini düzenlemede kullanılabilir (118).

Bolanz ve ark. yaptıkları bir çalışmada ER⁺ meme kanseri hücre hattı T47D ile MCF-7 ve ER⁻ meme kanseri hücre hattı MDA-MB231'i kullanmışlardır. Bu hücre hatlarında TRPV6'nın ekspresyonunu incelemişler, sonuç olarakta mRNA seviyelerini MCF-7'de düşük T47D, MDA-MB231 hücre hatlarında ise yüksek düzeyde bulmuşlardır (118).

Bu çalışmada tamoksifenin MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla, çok sık kullanılan, dehidrogenaz aktivitesini ölçmeye dayalı kolorimetrik bir yöntem olan MTT metodu kullanılmıştır. Tamoksifenin 0,1µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı ve sitotoksitesi araştırılmıştır. Hücre sayısı 500 000 olarak belirlenmiş ve tamoksifenin MCF-7 hücre hatlarında büyüme etkileri incelenip, yüzde canlılıkları hesaplanmıştır. Buna göre; 24-48 saat inkübasyon süreleri sonunda doza bağımlı sitotoksite gözlenmiştir. Hücre canlılığı ve sitotoksite açısından en etkin doz 20 µM olarak belirlenmiştir. 20 µM'ın IC₅₀ değeri 24 saat için % 30, 48 saat için ise % 31,9 olarak saptanmıştır. Diğer (0,1µM, 1µM) konsantrasyonlarda ise sitotoksik etki hem 24 hem de 48 saat için % 50'nin altında bulunduğu için sitotoksik açıdan bu dozlardaki tamoksifenin antikanser bir ajan olamayacağı sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda tamoksifenin en etkin doz aralığının belirlenmesiyle beraber, bu dozun MCF-7 hücrelerindeki HERG1 K⁺ kanal gen ekspresyonu üzerine olan etkisine bakılmıştır.

Gen ekspresyonu bulguları değerlendirildiğinde tamoksifenin 5 µM'lık düşük doz konsantrasyonunda HERG1 K⁺ kanal gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı, konsantrasyon artışıyla da gen ekspresyonunun indüklendiği saptanmıştır. Ancak, 20 mM konsantrasyon dışında doza bağlı olarak artan gen ekspresyonundaki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

HERG ve EAG gibi bazı K⁺ kanalları sağlıklı dokularda ya hiç eksprese olmamakta ya da sadece düşük seviyede eksprese olmaktadır. Ancak bu kanalların

kanser hücrelerindeki ekspresyonu, fonksiyonu açısından belirgin ve hatta baskın hale gelmektedir (114).

HERG1 K⁺ kanalının mRNA ve protein ekspresyonu yüksek oranda kolon hücre hatlarında tespit edilmiştir. Bu çalışmada ilk defa meme kanseri hücrelerinde HERG1 K⁺ kanallarının ekspresyonu gösterilmiştir.

Pardo ve ark. MCF-7 hücre hattında voltaj bağımlı EAG1 K⁺ kanallarında mRNA ekspresyonunu göstermişlerdir (119). Ouadid-Ahidouch, MCF-7 hücre hatlarında tipik EAG1 akımlarını kaydetmişler ve bu kanalların hücre siklusu ile regüle olduğunu saptamışlardır (83). MCF-7'de fonksiyonel ekspresyon orta ve büyük iletkenliğe sahip Ca²⁺ ile aktive olan K⁺ kanallarında rapor edilmiştir.

Smith ve ark. Burkitt lenfoma hücre hatlarında HERG kanal ekspresyonunu tespit etmişlerdir. Raji ve BL2 hücre hatlarında normal periferik kan lenfositlerine kıyasla HERG1'in ekspresyonunun altı kat arttığı gösterilmiştir (120).

Elektrofizyolojik bulgular değerlendirildiğinde, MCF-7 hücrelerinde K⁺ akımları açısından tamoksifenin farklı dozlarının ve uygulama süresinin önemli bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir. Ancak MCF-7 hücrelerinde tamoksifen uygulanması K⁺ akımlarında bir azalmaya yol açmıştır. Bu azalmalar % 7,5 ile % 49 gibi geniş bir aralığa dağılmış olsa da sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Bu sonucun uygulanan dozlarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. K⁺ kanal akımları her doz grubu için üç hücreden kayıtlanmıştır. Bu sayı güç analizi ile belirlenmiştir.

Sonuçlara bakıldığında zaman uygulanan doz ile K⁺ akım değeri arasındaki ilişkinin ters olduğu gözlenmiştir. Yani doz azaldıkça K⁺ akımlarının blokajı da artmıştır. Bu durum çelişkili bir sonuç gibi görülsede tamoksifenin çözülmesi için kullanılan etil alkolle ilişkili gibi görülmektedir. Çalışma sırasında etil alkolün hücrelere etkisinin olup olmadığının saptanması için ayrıca bir alkol grubu çalışılmıştır ve bu grupta K⁺ akımlarının provake olduğu görülmüştür. Kullanılan etil alkol miktarı en düşük doz grubu olan 5 µM'lık grupta en düşük orandadır. Bu nedenle bu grupta alkol etkisiyle K⁺ akımlarında büyük bir artış beklenmemektedir. Yüksek doz gruplarında ise alkol miktarı daha çok olduğu için alkol etkisiyle K⁺ akımlarının büyük oranda arttığı tahmin edilmektedir. Buna göre 5 µM'lık doz grubunda tamoksifenin baskılayıcı etkisinin daha fazla, yüksek doz grubunda ise daha az olduğu düşünülmüştür. Yapılan literatür taraması sonucunda, farklı çalışmalarda etil alkolün K⁺ kanalları üzerine etkileri olduğu

bildirilmiştir. Pietrzykowski ve ark.'ı yapmış oldukları bir çalışmada etil alkolün BK kanal akımlarını arttırdığı bildirilirken, Lefebvre ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise etil alkolün farklı K⁺ kanalları üzerinde zıt etkileri olduğu bildirilmiştir (121, 122). Bu bulgular da çalışmada elde ettiğimiz sonuçları etil alkolün etkileyebileceği düşüncesini arttırmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen elektrofizyolojik ve gen ekspresyon verileri birbirini destekler nitelikte olup birlikte değerlendirildiğinde tamoksifenin düşük doz konsantrasyonunda (5µM) K⁺ kanal aktivitesinin azalması ve gen ekspresyonunun düşmesi tamoksifenin HERG1 K⁺ kanalları üzerine bloke edici etkisini düşündürmekle birlikte verilerin istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasından dolayı bu çalışmada tamoksifenin HERG1 K⁺ kanalları üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmaktadır.

Çalışmanın gen ekspresyonu bulguları değerlendirildiğinde tamoksifenin 5 µM'lık düşük doz konsantrasyonunda HERG1 K⁺ gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı, konsantrasyon artışıyla da gen ekspresyonunun indüklendiği saptanmıştır. Bu düzeyde düşük bir konsantrasyonda ekspresyonun baskılanması meme kanserinin başlangıç ve ilerleme safhalarında önemli rol oynadığı düşünülen HERG 1 geninin kontrolü üzerinde proliferasyonun kontrol edilebileceği ümidini doğurmaktadır. Öte yandan iyon kanallarının metastaz oluşumunda da rol oynadığı düşünülürse meme kanseri ve diğer östrojenle ilişkili kanser tiplerinde düşük doz tamoksifen uygulamasının metastaz riskini de azaltabileceği söylenebilir. Ayrıca HERG1 gibi iyon kanal proteinlerinin tümör hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edilirken sağlıklı hücrelerde ya hiç ya da çok az düzeyde sentezleniyor olması bu proteinle üzerinden ilaç hedeflenebileceği fikrini düşündürmektedir. Bu yolla uygulanan ilaçların sadece tümör hücrelerinde bulunan proteinlerle bir şekilde etkileşimi olacak biçimde spesifik dizaynı sağlanırsa uygulanan ilacın sadece tümör hücrelerine nüfuz edip sağlıklı hücrelere etki etmemesi sağlanabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bir çok K^+ kanalının tümör hücrelerinde ekspresyonunun arttığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu anlamda K^+ kanal ekspresyonunun kanserle olan bu ilişkisi iyon kanallarına spesifik blokörlerin kullanılması sonucu, gerçekleşen inhibisyon ile kanserin gelişiminin ve ilerlemesinin durdurulması amaçlanmaktadır. Kanserlin erken teşhisi için yeni girişimlere ve yeni verilere ihtiyaç vardır. HERG1 K^+ kanalı hücre döngüsü ve ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. HERG1 K^+ kanallarının aşırı ekspresyonu çeşitli kanser tiplerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Yapılan bu çalışmada MCF-7 hücrelerine antikanser bir ajan olan tamoksifenin farklı konsantrasyonları uygulanarak, HERG1 K^+ kanal gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Elektrofizyolojik çalışmalardan elde edilen verilere göre 20 μ M tamoksifen konsantrasyonunda en az inhibisyon gözlenmiştir. Gen ekspresyon çalışmaları da bu durumu destekler niteliktedir. Artan tamoksifen konsantrasyonu ile birlikte HERG1 K^+ kanal gen ekspresyonunda da artış saptanmıştır. Diğer gruplara (5 μ M, 10 μ M) göre en fazla artış tamoksifenin 20 μ M konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Bundan sonra yapılması planlan çalışmada gen ekspresyon düzeyinde olması muhtemel artış ya da azalışı gözlemlemek amacıyla tamoksifenin yüksek dozlarının uygulanması ile daha belirgin sonuçlar elde edilebilir.

Bunun yanında tamoksifen ile östrojen arasındaki ilişki ekspresyon seviyesini etkileyebilen faktörlerden biridir ve ER genlerinde meydana gelebilecek herhangi bir değişim kanserin gelişim ve ilerlemesinden sorumlu tutulmaktadır. ER⁺ veya ER⁻ MCF-7 hücre hatları kullanılarak tamoksifenin HERG1 K^+ üzerine etkisinin araştırılması ile daha hassas sonuçlar elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Emerk K.** Hücre büyümesi, farklılaşması ve kanser. İnsan Biyokimyası. *Ankara: Palme yayıncılık*; **2002**; 569-77.
2. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** Molecular Biology of the Cell, 3th Ed., Garland Publishing, New York, **1994**; 1255-95.
3. **Ferlay J, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.** GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet], **2010**; from <http://globocan.iarc.fr/>.
4. **Thompson D, Easton D.** Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, **2002**; 94:1358-65.
5. **Fermini B.** Ion Channels. *Top Med Chem*, **2008**; 3: 1–25.
6. **Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y.** Ion channels and the hallmarks of cancer. *Cell Press*, **2010**; 107-21.
7. **Schönherr R.** Clinical Relevance of Ion Channels for Diagnosis and Therapy of Cancer. *J. Membrane Bio*, **2005**; 205:175-84.
8. **Kunzelmann K.** Ion Channels and Cancer. *J. Membrane Biol*, **2005**; 205:159-73.
9. **Raschi E, Vasina V, Poluzzi E, De Ponti F.** The hERG K⁺ channel: target and antitarget strategies in drug development. *Pharmacol Res*, **2008**; 57(3):181-95.
10. **Asher V, Sowter H, Shaw R, Bali A, Khan R.** Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, **2010**; 8:113.
11. **Felipe A, Vicente R, Villalonga N, Roura-Ferrer M, Martí'nez-Ma'rmol R, Sole' L, Ferreres JC, Condom E.** Potassium Channels: New Targets in Cancer Therapy. *Cancer Detection and Prevention*, **2006**; 30:375-85.
12. **Ponce-Balbuena D, López-Izquierdo A, Ferrer T, Rodríguez-Menchaca AA, Aréchiga-Figueroa IA, Sánchez-Chapula JA.** Tamoxifen inhibits inward rectifier K⁺ 2.x family of inward rectifier channels by interfering with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-channel interactions. *J Pharmacol Exp Ther*. **2009**; 331(2):563-73.
13. **Ruddon RW.** Cancer Biology. Fourth edition, **2007**; 4-12.
14. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** Cancer Statistics, *Ca Cancer J Clin*, **2013**; 63:11-30.
15. **Shackney SE, Silverman JF.** Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv.Anat.Pathol*, **2003**; 10(5):278-90.
16. **Bellenir Karen.** Breast Cancer Sourcebook. Third ed. United States: Omnigraphics, Inc; **2009**; 3-27.
17. **Polyak K.** Breast cancer: Origins and evolution. *J. Clin. Invest*, **2007**; 117 (11): 3155-63.
18. **Fisher B.** Malignancies of the Breast. In: Cameron RB (eds), *Practical Oncology*. Appleton & Lange, Connecticut. **1994**; 417-34.

19. **Spratt JS, Donegan WL, Sigdestad CP.** Epidemiology and etiology. In Donegan WL and Spratt JS (ed), *Cancer of the breast*. Philadelphia, Saunders, **1995**; 116 -41.
20. **Spears M, Bartlett J.** The potential role of estrogen receptors and the SRC family as targets for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **2009**; 13(6): 665-74.
21. **Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC.** Early breast cancer. *Lancet*, **2009**; 373(9673): 1463-79.
22. GLOBOCAN 2008 (IARC) Section of Cancer Information, World Health Organization.
23. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21166/pdf>. (Erişim Tarihi: 25.02.2013)
24. **Hortobagyi GN, Esserman L, Buchholz TA.** Neoplasms of the Breast. In Holland Frei E. *Cancer Medicine. 7th ed.* **2006**; 1584-1643.
25. **Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK.** Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. **2003**; *J Natl Cancer Inst* 95(17): 1276-99.
26. <http://www.saglik.gov.tr/TR/Beige> (Erişim Tarihi: 20.02.2013).
27. Cancer Research UK, **2009**.
28. **Haagensen CD.** Diseases of Breast. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders; **1986**.
29. **Singletary SE, Connolly JL.** Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging *Manual. CA Cancer J Clin.* **2006**; 6(1):37-47.
30. **AJCC.** AJCC Cancer Staging Atlas. New York:Springer; **2006**.
31. **Key TJ, Verkasalo PK, Banks E.** Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*, **2001**; 2(3): 133-40.
32. **Kilfoy BA, Zhang Y, Shu XO, Gao YT, Ji BT, Yang G, Li HL, Rothman N, Chow WH, Zheng W.** Family history of malignancies and risk of breast cancer:prospective data from the Shanghai women's health study. *Cancer Causes Control*, **2008**; 19(10): 1139-45.
33. **Aydın S, Akça T.** Tüm yönleriyle meme kanseri. Erken evre meme kanserinde tedavi seçenekleri. Nobel Kitabevi, **2011**; 1-225.
34. **Clamp A, Danson S, Clemons M.** Hormonal and genetic factors for breast cancer risk. *Surg J R Coil Surg Edinb Irel*, **2003**; 23-31.
35. **Martin AM, Weber BL.** Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*, **2000**; 92:1126-35.
36. **Vogel VG.** Breast Cancer prevention: A Rewiev of current Evidence. *CA Cancer L Clin*, **2000**; 50:156-70.
37. **Darendeliler E, Ağaoğlu FY.** Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi. Topuz E, Aydiner A, Dinęer M.(Eds): *Meme kanseri 1. Baskı*. İstanbul Nobel Tıp Kitapevleri, **2003**;13-33.
38. **Sakallı E.** Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Ökse Otu Ekstraktlarının Apoptotik Etkisinin Araştırılması. Isparta S.D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, **2011**.

39. **Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC.** Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst*, **2000**; 92:328-32.
40. **Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J.** Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. **2002**; 17;288(3):321-33.
41. **Sugimura T.** Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, **2000**; 21:387-95.
42. **Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, Moore D, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH, Sellers TA, Folsom AR.** Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **1998**; 90:1724-29.
43. **Henderson C.** Risk Factors for Breast Cancer Development. *CANCER Supplement*, **1993**; 71 (6):2127-39.
44. **Singletary KW, Gapstur SM.** Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*, **2001**; 286:2143-51.
45. **Poschl G, Seitz HK.** Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*. **2004**; 39:155-65.
46. **Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID, Rosen EM.** Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, **2000**; 60:5635-39.
47. **Sellers TA, Vierkant RA, Cerhan JR, Gapstur SM, Vachon CM, Olson JE, Pankratz VS, Kushi LH, Folsom AR.** Interaction of dietary folate intake, alcohol and risk of hormone receptor-defined breast cancer in a prospective study of postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2002**; 11:1104-07.
48. **Baron JA, La VC, Levi F.** The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. *Am J Obstet Gynecol*, **1990**; 162:502-14.
49. **Jensen J, Christiansen C.** Effects of smoking on serum lipoproteins and bone mineral content during postmenopausal hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol*, **1988**; 159: 820-25.
50. **Morris JJ, Seifter E.** The role of aromatic hydrocarbons in the genesis of breast cancer. *Med Hypotheses*, **1992**; 38:177-84.
51. **Schupak KD.** Vademecum, Breast Diseases Treatment-Radiation, *Landesbioscience*, Georgetown, TEXAS U.S.A., **2000**; 153-65.
52. **Bilimoria MM, Morrow M.** The Woman at Increased Risk for Breast Cancer: Evaluation and Management Strategies. *CA Cancer J Clin*, **1995**; 45:263-78.
53. www.breastcancercare.org.uk (Erişim Tarihi: 17.02.2013).
54. **şimşek G.** Memenin Duktal Karsinomlarında BRCA-1, BRCA-2 ve COX-2 İmmun Belirleyicilerinin Tümör Diferansiyasyonu ve Diğer Prognostik Parametrelerle İlişkisi. Celal Bayar Üniv. Tıp Fakültesi. Patoloji ABD. Uzmanlık Tezi, **2007**.
55. **Easton D, Ford D, Peto J.** Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv*, **1993**; 18:95-113.
56. **Oesterreich S, Fuqua SA.** Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr. Relat Cancer*, **1999**; 6:405-19.

57. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **1994**; 266:66-71.
58. Ready KJ, Arun BK. Genetic Predisposition to Breast Cancer and Genetic Counseling and Testing. Hunt KK, Robb GL, Strom EA, Ueno NT (ed), Breast Cancer. 2nd Edition, *Anderson Cancer Center, Houston, Texas*, **2008**; 58-79.
59. Bertwistle D, Ashworth A. Functions of the *BRCA 1* and *BRCA2* genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **1998**; 8:14-20.
60. Tavassoli FA, Devilee P. Word health organization classification of tumours, pathology and Genetics of tumours of the breast and female genital organs. *Lyon, IARC Pres*, **2003**; 341-43.
61. <http://www.personal.psu.edu/afr3/blogs/siowfa12/2012/10/passing-down-cancer-through-the-generations.html> (Erişim Tarihi: 14.02.2013).
62. Kerr P, Ashworth A. New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Curr Biol*, **2001**; 11:668-R676.
63. Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*, **1998**; 2:317-28.
64. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*, **1997**; 88: 265-75.
65. Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgardsdottir R, Gudlaugsdottir S, Sigurdsson S, Steinarsdottir M, Jonasson JG, K namthawat-Jonsson, Eyfjord JE. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res*, **1998**; 58: 859-62.
66. Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA, Olsson H, Ingvarsson S, Karhu R, Tanner M, Isola J, Barkardottir RB, Borg A, Kallioniemi OP. Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res*, **1997**; 57: 1222-27.
67. Venkitaraman AR. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, **2002**; 108:171-82.
68. Xu B, Kim S, Kastan MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol*, **2001**; 21: 3445-50.
69. Yarden RI, Brody LC. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1999**; 96: 4983-88.
70. O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, **2010**; 31(6): 961-67.
71. Tassone P, Tagliaferri P, Perricelli A, Blotta S, Quaresima B, Martelli ML, Goel A, Barbieri V, Costanzo F, Boland CR, Venuta S. BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *Br. J Cancer*, **2003**; 88:1285-91.

72. Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, Haber DA. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*, **1999**; 97: 575-86.
73. Fan S, R Yuan, YX Ma, Q Meng, ID Goldberg, EM Rosen. Mutant BRCA1 genes antagonize phenotype of wild-type BRCA1. *Oncogene*, **2001**; 20: 8215-35.
74. Burke W, Daly M, Garber J, Botkin J, Kahn MJ, Lynch P, McTiernan A, Offit K, Perlman J, Petersen G, Thomson E, Varricchio C. Recommendations for followup care of individuals with an inherited predisposition to cancer II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA*, **1997**; 277: 997-1003.
75. Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, Argonza RH, Morrow JE, Hull J, Dann JL, King MC. BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet*, **1997**; 60: 1031-40.
76. Ford D. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *Am. J. Hum. Genet*, **1998**; 62:676-89.
77. Malkin D. Germline p53 mutations and heritable cancer. *Annu.Rev Genet*, **1994**; 28: 443-65.
78. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, Van Den HB, Frants RR, Coulon V, Goldstein AM, Van Reen MM, Easton DF, Eeles RA, Hodgson S, Mulvihill JJ, Murday VA, Tucker MA, Mariman EC, Starink TM, Ponder BA, Ropers HH, Kremer H, Longy M, Eng C. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet*, **1996**; 13:114-6.
79. Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP, Eng C. Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat.Genet*, **2002**; 32:355-57.
80. Morrell D, Cromartie E, Swift M. Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J Natl Cancer Inst*, **1986**; 77:89-92.
81. Stühmer W, Alves F, Hartung F, Zientkowska M, Pardo LA. Potassium channels as tumour markers. *FEBS Letters*, **2006**; 580:2850-52.
82. Fiske JL, VP, Brown ML, Duncan RL, Robert A. Sikes RA. Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **2006**; 25:493-500.
83. Firth AL, Remillard CV, Platoshyn O, Fantozzi I, Eun A. Ko EA, Yuan JXY. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulm Circ*, **2011**; 1(1): 48-71.
84. Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A. K⁺ Channel Expression in Human Breast Cancer Cells: Involvement in Cell Cycle Regulation and Carcinogenesis. *J Membrane Biol*, **2008**; 221:1-6.
85. Conforti L, Millhorn DE. Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia. *J Physiol*, **1997**; 502:293-305.
86. Fraser SP, Grimes JA, Diss JK, Stewart D, Dolly JO, Djamgoz MB. Predominant expression of Kv1.3 voltage-gated K⁺ channel subunit in rat prostate cancer cell lines: electrophysiological, pharmacological and molecular characterisation. *Pflugers Arch*, **2003**; 446:559-71.

87. **Lampert A, MullerMM, Berchtold S, Lang KS, PalmadaM, DobrovinskayaO, Lang F.** Effect of dexamethasone on voltage-gated K⁺ channels in Jurkat T-lymphocytes. *Pflugers Arch*, **2003**; 447:168-74.
88. **Preussat K, Beetz C, Schrey M, Kraft R, Wolff S, Kalff R, Patt S.** Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas. *Neurosci Lett.* **2003**; 346:33-36.
89. **Abdul M, Santo A, Hoosein N.** Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer Res*, **2003**; 23:3347-51.
90. **Farias LM.** Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res*, **2004**; 64(19):6996-7001.
91. **Perry M, Sanguinetti M, Mitcheson J.** Revealing the structural basis of action of hERG potassium channel activators and blockers. *J Physiol*, **2010**; 3157-67.
92. **Sanguinetti MC.** HERG1 channelopathies. *Eur J Physiol*, **2010**; 460:265-276.
93. **Raschi E, Vasina V, Poluzzi E, De Ponti F.** The hERG K⁺ channel: target and antitarget strategies in drug development. *Pharmacological Research*, **2008**; 57:181-95.
94. <http://wavefunction.fieldofscience.com/2012/05/protein-makes-poison-dancing-fruit.html> (Erişim tarihi: 20.01.2013)
95. **Roy J, Vantol B, Cowley EA, Blay J, Plinsdell P.** Pharmacological separation of hEAG and hERG K⁺ channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Oncology Reports*, **2008**; 19: 1511-16.
96. **Ding XW, Yang WB, Gao S, Wang W, Li Z, Hu WM, Li JJ, Luo HS.** Prognostic Significance of hERG1 Expression in Gastric Cancer. *Dig Dis Sci*, **2010**; 55:1004-10.
97. **Wang H, Zhang Y, Cao L, Han H, Wang J, Yang B, Nattel S, Wang Z.** HERG K⁺ channel: A regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res*, **2002**; 62:4843-48.
98. **Neher E, Sakmann B.** Single-Channel Currents Recorded From Membrane Of Denervated Frog Muscle Fibres. *Nature*, **1976**; 260:799-802.
99. **Neher E.** Ion Channels in Communicayion Between and Within Cells. *Neuron*, **1992**; 11(5): 1672-79.
100. **Ashley RH.** Ion Channels A Pratical Approach. Oxford University Press, New York, **1995**; 1-18.
101. **Molleman A.** Patch Clamping, An Introductory Guide toPath Clamp Electrophysiology. Wiley, John Wiley and Sons Ltd, Great Britain, **2003**.
102. **Bökesoy TA, Onur R.** Elektrofizyoloji Teknikleri ve Farmakolojide Kullanılışı. TFD, Ankara, **1996**; 25-30.
103. **Cristofanilli M, Newman Lisa, Hortobagyi FGN.** Atlas of clinical oncology breast cancer. Breast cancer risk and management chemoprevention, surgery and surveillance. American cancer society, **2000**; 19-40.
104. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9262?lang=en®ion=TR> (Erişim tarihi: 20.11.2012)
105. **Cole MP, Jones CTA, Todd IDH.** A New Anti-oestrogenic Agent in Late Breast Cancer: An Early Clinical Appraisal of ICI46474. *Br J Cancer*, 1971; 25(2): 270-75.

- 106.Coiret G, Borowiec AS, Mariot P, Ouadid-Ahidouch H, Matifat F.** The Antiestrogen Tamoxifen Activates BK Channels and Stimulates Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mol Pharmacol.* **2007**;71:843–51.
- 107.Brodie AMH, Vincent, Njar VCO.** Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment. *Steroids.* **2000**; 65:171–79.
- 108.Deroo, BJ, Korach, KS.** Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest,* **2006**; 116(3): 561-70.
- 109.Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M.** Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol Cell Biol,* **2004**; 24(17): 7681-94.
- 110.Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).** Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet ,* **2005**; 365 (9472): 1687-1717.
- 111.Mosman T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods.* **1983**; 65:55-63.
- 112.Durmaz R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, **2001**.
- 113.Bustin SA.** Quantification of mRNA using real time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology,* **2002**; 29:23-39.
- 114.Wang Z.** Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Eur J Physiol,* **2004**; 448: 274–86.
- 115.Pardo LA.** Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiology,* **2004**; 19:285-92.
- 116.Allen MC, Newland C, Valverde MA, Hardy SP.** Inhibition of ligand-gated cation-selective channels by tamoxifen. *European Journal of Pharmacology,* **1998**; 354: 261–69.
- 117.Dick GM, Rossow CF, Sergey S, Horowitz B, Sanders KM.** Tamoxifen Activates Smooth Muscle BK Channels through the Regulatory β 1 Subunit. *J. Biol. Chem,* **2001**; 276:34594-99.
- 118.Bolanz KA, Kovacs GG, Landowski CP, Hediger MA.** Tamoxifen Inhibits TRPV6 Activity via Estrogen Receptor–Independent Pathways in TRPV6-Expressing MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res,* **2009**; 7(12):2000-10.
- 119.Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, Stuhmer W.** Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *EMBO J,* **1999**; 18:5540-47.
- 120.Smith GAM, Tsui, HW, Newell EW, Jiang X, Zhu XP, Tsui FWL, Schlichter LC.** Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells. *J. Biol.Chem.* **2002**; 277:18528–534.
- 121.Pietrzykowski AZ, Martin GE, Puig SI, Knott TK, Lemos JR, Treistman SN.** Alcohol Tolerance in Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels of CNS Terminals Is Intrinsic and Includes Two Components: Decreased Ethanol Potentiation and Decreased Channel Density. *J Neurosci,* **2004**; 24(38):8322-32.
- 122.Lefebvre T, Gonzalez BJ, Vaudry D, Desrues L, Falluel-Morel A, Aubert N, Fournier A, Tonon MC, Vaudry H, Castel H.** Paradoxical Effect of Ethanol on Potassium Channel Currents and Cell Survival in Cerebellar Granule Neurons. *J Neurochem,* **2009**; 110(3):976-89.

ÖZGEÇMİŞ

1 Temmuz 1981 yılında Niğde’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Niğde’de, liseyi Adana’da tamamladı. 1999-2003 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimini tamamladı. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atandı.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine devam etmektedir.