

**RHO KİNAZ İNHİBİTÖRÜ FASUDİL'İN
PANKREAS KARSİNOMA HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİSİTE, APOPTOZ VE METASTAZ
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CANER KAPLAN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ – 2015**

**RHO KİNAZ İNHİBİTÖRÜ FASUDİL'İN
PANKREAS KARSİNOMA HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİSİTE, APOPTOZ VE METASTAZ
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

CANER KAPLAN

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN**

**MERSİN
TEMMUZ – 2015**

Caner KAPLAN tarafından Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN danışmanlığı'nda ve Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAVŞAR eş danışmanlığında hazırlanan "Rho Kinaz İnhibitörü Fasudil'in Pankreas Karsinoma Hücrelerinde Sitotoksisite, Apoptoz ve Metastaz İlişkisinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Filiz Özbaş GERÇEKER

Prof. Dr. Yasemin KAÇAR

Yrd. Doç. Dr. Nalan TİFTİK

Yrd. Doç. Dr. Ertan AY

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN

.....
.....
.....
.....
.....

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31/07/2015 tarih ve 2015.20/812 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

RHO KİNAZ İNHİBİTÖRÜ FASUDİLİN PANKREAS KARSİNOMA HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTE, APOPTOZ VE METASTAZ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Caner KAPLAN

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, pankreas kanseri hücre hattı olan BxPC-3 hücre hattına rho kinaz inhibitörü olan fasudil uygulanarak sitotoksosite, apoptoz ve metastaz'a olan etkilerini araştırmaktır. Bu araştırmada, xCELLigence DP eş zamanlı hücre analizi cihazında yapılan hücre deneyleri sonucunda uygun hücre sayısının BxPc-3 hücre hattı için 12500, Fasudil uygulama saatinin ise 25 saat olduğu belirlenmiştir. Toksik doz olan IC₅₀ değeri 7,2835x10⁶ M bulunmuştur. Metastaz araştırması için farklı dozlarda (10mM, 2mM, 0,2mM, 0,02 mM) fasudil kullanılmış fakat BxPc-3 hücrelerinin besine (FBS) duyarlı bir metastaz göstermediği anlaşılmıştır. Kaspaz-3, Kaspaz-8, ve Kaspaz-9 gen ifadesi düzeyinin ölçümleri için 24 ve 48 saat sürelerde total RNA'lar saflaştırılmış, 2µM ve 0,2 µM Fasudil uygulanarak 24 ve 48 saatlerde qRT-PCR yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda kontrole göre 24. ve 48. saatler de 2 µM ve 0,2 µM'da Kaspaz-3 ve Kaspaz-9'da 1,5 kat artış gözlemlenirken Kaspaz-8'de artış ya da azalış gözlemlenememiştir. Ayrıca PE Aktif Kaspaz-3 testinde kontrol grubu ile ilaç uygulaması yapılan hücreler arasında Kaspaz-3'ün (%25,1) aktif olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, BxPc-3, XCELLigence, Fasudil, Metastaz.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN, Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Eş Danışman: Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

**THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF RHO KINASE
INHIBITORS FASUDIL ON THE CYTOTOXICITY, APOPTOSIS AND
METASTASIS ON PANCREAS CARCINOMA CELL LINE
CANER KAPLAN**

ABSTRACT

The aim of this study is investigation of the cytotoxic, apoptotic and metastatic effect of administration of fasudil, effector of rho kinase, onto the BxPC-3 pancreatic carcinoma cell line. Optimum cell unit per well is found as 12500 cells by xCELLigence DP system. Fasudil treatment period is also determined to be 25 hours. Result of the IC₅₀ value of $7,2835 \times 10^{-6}$ M concentration. The applications of time/dose dependent Fasudil (10mM, 2mM, 0,2mM, 0,02 mM) were applied for metastasis. But according to migration assay in xCELLigence DP system, BxPC-3 cells have not shown PBS dependent migration. The levels of caspase-3 and caspase-9 were significantly increase effect by measuring with Quantative Real-Time PCR at 24 and 48 hours with 2µM and 0,02µM fasudil respectively. Caspase-8 were not significant effect of administration in a time-dose dependent manner. The result of Flow Cytometric Active Caspase-3 PE assay was shown significant effect of Caspase-3 (%25.1) activity.

Key Words: Pancreas Cancer, BxPc-3 Cell Line, XCELLigence, Fasudil, Metastasis.

Advisor: Ass. Prof. Dr. Ahmet Ata ÖZCİMEN, Department of Biology Faculty of Science and Arts, University of Mersin

Co-advisor: Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR, Department of Pharmacology Faculty of Medicine, Mersin University

TEŞEKKÜR

Lisans dönemimde ve Tez çalışmamın tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. AHMET ATA ÖZÇİMEN ve eş danışman hocam Prof. Dr. KANSU BÜYÜKAŞAR'a,

Tezimin her aşamasında desteğini ve emeğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. YASEMİN KAÇAR'a,

Çalışmalarında bana yardımcı olan bilgi ve desteğini esirgemeyen Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Arş. Gör. DERYA YETKİN'e,

Ayrıca tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Bio. HİKMET ÇELİK, Uzm. Bio. TURHAN YILMAZ, Uzm. Bio. GONCA AY'a, Bio. TUĞÇE OYAHAN ÖZCAN ve tüm MEİTAM (Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi) idari ve akademik personeline,

Lisans ve Yüksek lisans hayatım boyunca her anlamda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme,

Her zaman en yakınımda olup destek ve katkılarını esirgemeyen sevgili eşim Dilek KAPLAN'a desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezi Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş olup (BAB-FBE-BB (CK) 2010-4 YL), MEİTAM, MERKÖK Doku Kültürü ve Akım Sitometri laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir

Bio. CANER KAPLAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. PANKREASIN MORFOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ.....	2
2.2. PANKREAS KANSERİ.....	3
2.2.1. Pankreas Kanserinde Tanı.....	4
2.3. BxPC-3 PANKREAS HÜCRE HATTININ KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ.....	5
2.4. RHO KİNAZLAR.....	6
2.5. FASUDİL'İN ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMASI.....	8
2.6. APOPTOZ.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. BxPC-3 HÜCRE HATTININ KÜLTÜRE EDİLMESİ.....	16
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar.....	16
3.1.2. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Pasaj İşlemi.....	16
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	17
3.1.4. Hücrelerin Sayılması.....	18

3.2. xCELLigence CİHAZINDA HÜCRE ANALİZLERİNİN YAPILMASI.....	19
3.2.1. E-Plate Tasarımı ve Software Planlaması.....	20
3.2.2. Hücre Titrasyonunun Belirlenmesi.....	20
3.2.3. BxPC-3 Hücre Hattına Fasudil Uygulanması ve Hücrelerin E-plate 16'ya Yüklenmesi.....	21
3.2.4. xCELLigence Cihazında Migrasyon için CIM-Plate Uygulaması.....	22
3.3. KANTİTATİF RT-PCR YÖNTEMİYLE KASPAZ -3, -8, -9 GENLERİNİN ABSOLUTE İFADELERİNİN BELİRLENMESİ.....	25
3.3.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	25
3.3.2. Kantitatif RT-PCR'da Kaspaz- 3, Kaspaz-8, Kaspaz 9 Gen İfadelerinin Absolute Kantitasyonu.....	26
3.4. AKIM SİTOMETRİ ile PE AKTİF KASPAZ-3 TESTİ.....	30
3.4.1. FACS Aria III Akım Sitometri Cihazının Hazırlığı.....	30
3.4.2. PE Aktif Kaspaz-3 Boyama Protokolü.....	30
3.5. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	32
4.1. HÜCRE TİTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	32
4.2. FASUDİL'E BAĞLI SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ.....	33
4.3. xCELLigence DP SİSTEMİ İLE HÜCRE HATTINDA MİGRASYONUN BELİRLENMESİ.....	35
4.4. FASUDİL'İN KASPAZ-3, -8, -9 GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....	36
4.5. PE AKTİF KASPAZ-3 TESTİ İLE APOPİTOZUN GÖSTERİLMESİ.....	41
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Apoptozu Başlatan Hücre İçi ve Hücre Dışı Sinyaller.....	10
Çizelge 2.2. Apoptozu Baskılayan ve İndükleyen Genler.....	10
Çizelge 3.1. E-Plate 16 Düzeni.....	21
Çizelge3.2. Fasudil Uygulaması İçin E-Plate Düzeni.....	22
Çizelge 3.3. Migrasyon Deneyi CIM Plate 16 Düzeni.....	24
Çizelge 3.4. First Strand cDNA Sentezi Karışım-1 Protokolü.....	25
Çizelge 3.5. First Strand cDNA Sentezi Karışım-2 Protokolü.....	26
Çizelge 3.6. cDNA Sentezi Thermal Cycler Programı.....	26
Çizelge 3.7. Kaspaz -3, -8, -9 Gen İfadelerinin İncelenmesinde Kullanılan Master Mix Protokolü.....	27
Çizelge 3.8. Kaspaz-3, -8, -9 Gen İfadelerinin 96 Well Plate Yerleştirilmesi.....	27
Çizelge 4.1. E-Plate 16 Kuyucuklarına Yüklenen Hücre Sayıları.....	32
Çizelge 4.2. E-Plate Kuyucuklarına Yüklenen Hücre Sayısı ve Uygulanan Fasudil Miktarı.....	33
Çizelge 4.3. Total RNA İzolasyon Örneklerinin Kalitesi.....	36
Çizelge 4.4. BxPC-3 Hücrelerinde Referans Gen β -aktin ve Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 Gen İfadeleri.....	36
Çizelge 4.5. Kaspaz-3, -8,-9 Genlerinin 24 ve 48 Saatlik Gen İfade Düzeylerinin Ortalaması.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Pankreası Morfolojisi.....	2
Şekil.2.2. ROCK' un Moleküler Yapısı.....	7
Şekil 2.3. ROCK Fonksiyonlarının Düzenlenmesi.....	8
Şekil 2.4. Fasudilin Açık Formülü.....	8
Şekil 2.5. Apoptozun İç ve Dış Yolak Mekanizması.....	14
Şekil 3.1. Cedex XS Smart Clides.....	18
Şekil 3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Ölçüm Cihazı Ana Ünite ve Kontrol Ünitesi.....	19
Şekil 3.3. E-Plate 16.....	20
Şekil 3.4. CIM Plate 16.....	23
Şekil 3.5. Beta Actin Prob Dizaynı.....	28
Şekil 3.6. Kaspaz-3 Prob Dizaynı.....	28
Şekil 3.7. Kaspaz-8 Prob Dizaynı.....	29
Şekil 3.8. Kaspaz-9 Prob Dizaynı.....	29
Şekil 4.1. BxPC-3 Hücre Hattının Hücre Sayısı ve Zamana Bağlı Proliferasyonu.....	32
Şekil 4.2. Fasudil'in BxPC-3 Hücrelerinde Proliferasyona Etkisi.....	34
Şekil 4.3. Fasudil'in Hesaplanan IC ₅₀ Değeri.....	34
Şekil 4.4. BcPC-3 Hücre Hattında Migrasyon.....	37
Şekil 4.5. Kontrol Grubu BxPC-3 hücrelerinde Kaspaz-3 düzeyi.....	41
Şekil.4.6. Doz ve Zaman Bağımlı 2mM / 48 saat Fasudil Uygulanan BxPC-3 Hücrelerinin Kaspaz-3 düze.....	42

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
ACTB	: Aktin Beta
AIF	: Apoptosis Inducing Factor
APAF-1	: Apoptotic Protease Activating Factor 1
APO-1	: Apoptosis Antigen 1
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bad	: Bcl-2-associated Death Promoter
Bax	: Bcl-2-like Protein 4
C	: Karbon
CAR-3	: Anti genic Determinant Recognized by Monoclonal Antibody AR-3
c-DNA	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
CDK	: Cyclin-Dependent Kinases
CO₂	: Karbondioksit
Cm	: Santimetre
BxPC-3	: Pancreatic Carcinoma Cell Line
CA 19-9	: Cancer Antigen 19-9
CA 125	: Cancer Antigen 125
CA 50	: Cancer Antigen 50
CASPASE	: Cysteine Aspartate Specific Proteases
CT	: Computed Tomography

CEA	: Carcinoembriyonic Antigen
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
d-NTP	: Deoxynucleoside Triphosphate
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ERCP	: Endoskopik Retrograd Kolanjiopankreatografi
FBS	: Fetal Bovine Serum
FACS	: Fluorescence-Activated Cell Sorting
FADD	: Fas Associated Death Domain
GDP	: Guanozin Difosfat
GTP	: Guanozin Trifosfat
GTPaz	: Guanozin Trifosfataz
HCG	: Human Chorionic Gonadotropin
HEP-G2	: Hepatocellular Carcinoma
HRK	: Activator of Apoptosis Harakiri
H₂O	: Su
IGF	: İnsulin-like Growth Factor
IRE	: Serine/Threonine Protein Kinase
IC₅₀	: Logaritmik Concentration
ICE	: Interleukin-1 Converting Enzyme
IL-1	: İnterlökin-1
IL-2	: İnterlökin-2
IRE	: İmmünoreaktif Elastaz-1
MEITAM	: Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Merkezi
MERKÖK	: Mersin Üniversitesi Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Birimi
mL	: Mili Litre
M.Ö.	: Milattan Önce

M.S.	: Milattan Sonra
NGF	: Nerve Growth Factor
TRADD	: TNF-receptor Associated Death Domain
PanIN	: Pancreatic İntraepithelial Neoplasia
PE	: Fikoeritrin
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PP	: Pankreatik Peptit
PH	: Plekstrin Homologu
RASSF 1A	: Ras Association Domain Family 1A
RBB	: Rho Bağlanma Bölgesi
RNA	: Ribonükleik Asit
ROCK	: Rho-Associated Protein Kinase
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
RTCA	: Real Time Cell Analayser
RTK	: Receptor Tyrosine Kinase
SPan-1	: Sialylated Carbonhydrate Antigen-1
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TGF-β	: Transforming Growth Factor-beta
qRT-PCR	: Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
USG	: Ultrasonografi

1. GİRİŞ

Dünya da ve ülkemizde hızla artış göstermekte olan kanser türlerinden pankreas kanseri erken tanı ve tedavi zorluklarından dolayı ölüm oranı en yüksek kanser türlerinden biri olarak kendini göstermektedir. Kanserden ölüm sıralamasında dünyada hem kadın, hem erkeklerde dördüncü sıradadır. Tanı sonrası beş yıllık yaşam süresi %4 civarındadır.

Türkiye’de bütün kanserler arasında pankreas kanserinin görülme sıklığı %4,3, kansere bağlı ölümler içindeki oranı ise %4,1’dir. Cinsiyete bağlı dağılım açısından pankreas kanserinin görülme sıklığı kadınlarda %3,1 iken, kansere bağlı ölümler içindeki oranı %3, erkek bireylerde görülme sıklığı %5,4 ve kansere bağlı ölümler içindeki oranı ise 5,2’dir [Ferlay vd.,2012].

Tanı ve teşhisindeki zorluklardan ve hızlı metastaz yapmasından dolayı pankreas kanseriyle mücadelede hala yeni yöntemler, tanı ve tedavi süreci için yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir.

Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) ailesinin ROCK 1 VE ROCK 2 olan iki üyesi vardır. Bu iki üye %65 yapı bakımından, %95 ise kinaz domeininin yapısı bakımından benzerlik gösterir. Her ikisi de N-terminal bölgesinde katalitik kinaz bölgesi, orta kısımda kıvrılmış kıvrım, Rho’nun bağlandığı bir bölge, sistince zengin bölge ve C terminal bölgesinde Plekstrin homoloğu (PH) bir bölge içerir [S. Jianjian vd., 2013].

Fasudil (HA-1077) ve Y-2763 ilk keşfedilen Rho inhibitörleridir ve ROCK inhibitörleri ATP bağlanma alanları ile yarışır [Mueler vd.,2005, Lohn vd., 2009].

Rho kinazların, karaciğer [Man K. vd., 2009], meme [Liu S. vd., 2009] ve prostat kanseri [Avril V. vd., 2000] gibi kanser türlerinde migrasyonda oynadığı rol ile ilgili araştırmalar mevcut olup, pankreas kanseriyle ilgili hala yeterli çalışma bulunmamakta ve araştırılmaya gereksinim duyulmaktadır.

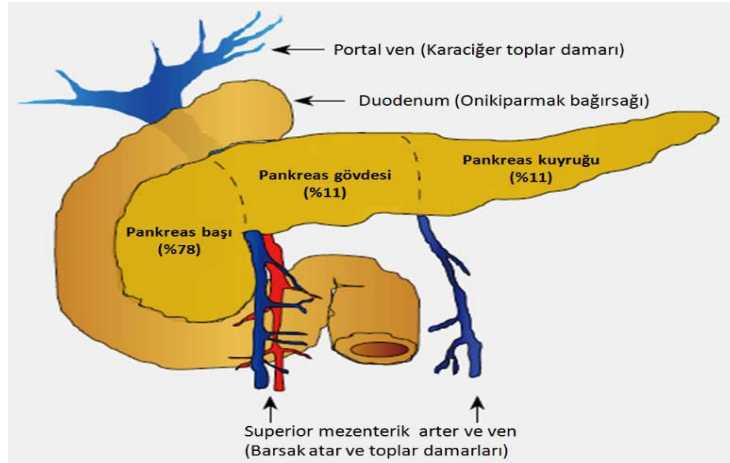
Bütün bu bilgiler ışığı altında bu çalışmada Rho kinaz inhibitörlerinden Fasudil’in (HA-1077) epitelial pankreas adenokarsinoma hücre hattı BxPC-3 hücrelerindeki proliferasyon, metastaz ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. PANKREAS'IN MORFOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Pankreasın ilk tanımı, MÖ.4. yüzyılda Chalkaidon tarafından yapılmıştır. MS.2. yüzyılda ise Ephesuslu Rufus tarafından "pankreas" olarak adlandırılmıştır. Pankreas omentum minus, mide ve kolon transversum'un arkasında, karın arka duvarında bulunduğu için karın açıldığında direkt olarak görülmez. Pankreas, karbonhidrat, protein, yağ metabolizmasında, sindirimde, enerji substratlarının kullanımında ve depolanmasında önemli rol oynayan ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahip bir organdır. Pankreas baş, gövde ve kuyruk kısmı olmak üzere 3 bölümden oluşur (Şekil 2.1.). Erişkin insan pankreası 15 cm uzunluğunda, 70-140 gram ağırlığında bir organdır.

Pankreas hem ekzokrin, hem de endokrin salgı yapan bir bezdir. Organın endokrin salgısı (insülin, glukagon, somatostatin ve PP hücreleri) yaşamın devam etmesi için gerekli olup Langerhans adacıklarından salgılanır.



Şekil 2.1. Pankreasın Morfolojisi.

Pankreas baş gövde ve kuyruk olmak üzere 3 kısımdan oluşur. [01.06.2015 tarihinde <http://www.ahmetdobrucali.com/hastaliklar/pankreas-kanseri/>, adresinden alınmıştır.]

2.2. PANKREAS KANSERİ

Pankreatik ve peri ampuller kanserler bütün gastrointestinal kanserlerin %5' ini oluştururlar. Pankreas kanseri erkeklerde tüm kanserler arasında %3, kadınlarda ise %5 sıklıktadır. Pankreas kanserine bağlı ölümler, kanser ölümleri arasında erkeklerde dördüncü, kadınlarda ise beşinci sırada yer almaktadır [Ellen B, 1995].

Pankreas kanserlerinin geniş bir spektrumu vardır. Bunların içinde en sık olan (%85) adenokarsinom olup, sessiz bir klinik gidiş gösterdiğinden tanı konduğunda genelde pankreas dışında yaygındır [Cubillia AL vd., 1985]. Özellikle, korpus ve kuyruk tümörleri fark edildiğinde metastaz yapmışlardır, ancak pankreas kanserlerinin çoğunluğu pankreas başından kaynaklanır [Chen J vd.,1985].

Pankreas kanserlerinin bir diğer türü de endokrin tümörlerdir. Bunlar adacık hücrelerinden kaynaklanır ve fonksiyonel veya non-fonksiyonel, iyi huylu veya kötü huylu olabilirler. Fonksiyonel tümörler, adacık hücre kökenine göre pankreas hormonlarından bir veya bir kaçını salgılayabilirler. Endokrin tümörlerde malignite kriterleri bölgesel invazyon ve metastazdır [Venkatesh S vd.,1990].

Metastaz potansiyeli gösterenler ise belirgin stromal invazyon, pankreas damarlarında tümör embolisi, glandular ve solid patern gösterenler ve beta hücre kaynaklı olmayanlar ile alfa HCG (human chorionic gonadotropin) pozitif olan tümörlerdir [Rosai J., 1997].

Kanserin yayılmasına veya sıçramasına metastaz adı verilir. Pankreas kanseri sıklıkla lenf damarları ile yayılır ve yayılmış olan pankreas kanserine metastatik pankreas kanseri adı verilir. Pankreas kanseri, öncelikli olarak karın içinde ve karaciğere metastaz gösterirken akciğerlere, kemiklere ve beyine de metastaz yapabilir. Bu tür kanserler, tek başına ışın tedavisi ile tedavi edilmesi veya cerrahi müdahale ile alınması için fazla metastaz yapmıştır. Görüntüleme testleri sadece bir bölgedeki yayılmayı gösterse bile, kanser hücreleri küçük gruplar halinde diğer organlara da sıçramıştır.

2.2.1. Pankreas Kanseri Tanı

Pankreas kanseri tanı ve tedaviye adeta meydan okur. Prognozu son derece kötü olup tanıdan sonra bir yıllık sağ kalım yalnızca %10 dur [Chung YS., 1987]. Tümör belirleyiciler, ultrasonografi (US), bilgisayarlı tomografi (CT), Endoskopik Retrograt Kolanjiopankreatografi (ERCP) ve ince iğne aspirasyon biyopsisi gibi, tanı yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde pankreas kanseri tanısı 6 ila 8 hafta daha erken yapılabilir [Sing SM vd.,1990].

Pankreas kanserinde kullanılan tümör belirleyicilerden bazıları duyarlılık sıralamasına göre Sialylated Carbonhydrate Antigen-1 (SPan-1), Cancer Antigen 19-9 (CA 19-9), Cancer Antigen (CA 50), İmmünoaktif Elastaz-1 (IRE-1), Pancreatic Cancer-Associated Antigen (DU-PAN-2), Cancer Antigen (CA 125), Anti genic Determinant Recognized by Monoclonal Antibody AR-3 (CAR-3), Karsinoembriyonik Antijen (CEA)'dir.

SPan-1 yüksek molekül ağırlıklı bir glikoproteindir. Pankreas kanserli hastaların serumlarında yüksek seviyede, diğer gastrointestinal kanserli hastalarda orta seviyede, normal bireylerde ise düşük SPan-1 seviyesi bulunmaktadır [Chung YS. 1987].

En çok kabul edilen görüşe göre, CA 19-9'un eşik değeri 37 U/ml alındığında pankreas kanserinin tanısı yapılabilir. Bu değer, 120 U/ml ve üzerine çıktığında, pankreas kanserini pankreatitten %68, pankreas dışı maligniteden %57 ve benign hastalıklardan da %72 doğrulukla ayırabilir [Safi F vd, 1990].

Yapılan çalışmalarda pankreas kanserinin erken evresinde serum IRE-1 seviyesinin, geç evresinde ise serum CA 19-9 seviyesinin arttığı görülmüştür. Ayrıca IRE-1 artışı pankreas başı kanserinde gövde ve kuyruk kanserinden daha fazladır. Çünkü pankreas başındaki tümör nedeni ile wirsung kanalı tıkanması pankreasın büyük bir parçasını tahrip eder [Hayakawa T vd., 1988].

İlk kez 1984'de Metzgar ve ark. tarafından "pancreatic cancer-associated antigen" diye bildirilen DUPAN-2 duktal adenokarsinomdan elde edilen hücre dizisine karşı geliştirilen monoklonal antikor ile tanımlanmıştır [Metzgar vd., 1984].

CAR-3 pankreas kanseri tanısında CA 19-9'dan daha az duyarlı fakat pankreas neoplazmi ile kronik pankreatitin ayırımında daha özgüdür. Karaciğer metastazı olan hastalarda, tümörün yayılmamış olduğu hastalara göre daha yüksek CAR-3 seviyesi bulunur. Diğer tümör belirleyicilerin çoğunda olduğu gibi CAR-3'ün de pankreas kanserinin ileri evrelerinde duyarlılığı artar [Bosso D vd. 1991].

2.3. BxPC-3 PANKREAS HÜCRE HATTININ KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

BxPC-3 hücre hattı 61 yaşında pankreas adenokarsinom tanısı konmuş bayan bir hastadan kültüre edilmiştir. Hasta kemoterapi ve radyoterapiye rağmen altı ay içerisinde ölmüştür. Metastaz tespit edilememesine rağmen Michael Bouvet [Bouvet M. Vd., 2002] ve ark. deney fareleri üzerinde yaptığı çalışmada BxPC-3 hücrelerinin metastaz yaptığını göstermiştir. Proliferasyon süresi 48 ile 60 saat arasındadır.

Yapılan bir çalışmada, BxPC-3 hücreleri ile SK-HEP-1 ve HEP-G2 hücrelerinin matrijel [Matrigel, BD Biosciences firması tarafından pazarlanan, bir çeşit fare tümör hücre serisinin salgıladığı jelatin, laminin ve başka proteinleri içeren organik karışımın ticari ve yaygın bilimsel ismidir. Bu karışım içeriği itibariyle, dokularda hücrelerin etrafını saran hücre dışı matrise (Extracellular Matrix, ECM) çok benzediği için, hücre serilerinin laboratuvar koşullarında büyütülmesinde hücrelerin tutunduğu substrat (ortam) olarak kullanılmaktadır] ve kolojen-1 [Kollajen (bazen kolajen veya kollojen olarak da anılır) hareket sisteminin yapı taşlarını, özellikle kemik, kıkırdak, lif ve eklemleri oluşturan protein]'de metastaz yapmaları açısından karşılaştırılmış ve SK-HEP-1'in 24. saatte, HEP-G2'nin 70. saatte ve BxPC-3'ün 48. saatte tabakalar (wound) halinde metastaz yaptığı gösterilmiştir.

Yine aynı çalışmada BxPC-3 hücrelerinin kolojen-1 de, matrijele göre daha metastatik olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın invazyon ile ilgili olan bölümünde ise

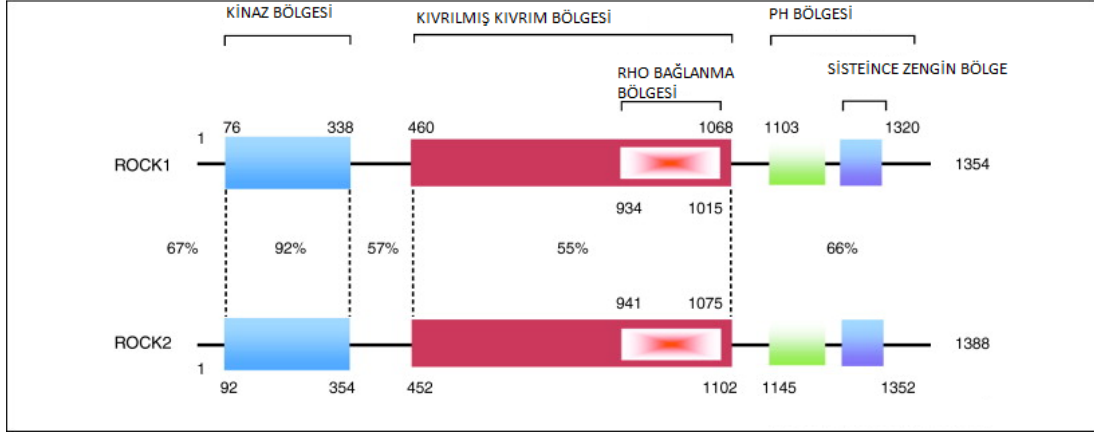
BxPC-3 hücreleri kolojen-1 de 68. saatte, matrijelde 42. saatte invazyon göstermiştir.[http://www.essenbioscience.com/media/uploads/files/Invasion_Example_Report.pdf]

2.4 RHO KİNAZLAR

Küçük G proteinlerinden olan Rho'nun hücre adezyonu, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok hücreyel olayda düzenleyici rolü vardır. Rho'nun çok sayıdaki efektörlerinden en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılanı Rho Kinaz'dır. Rho Kinazın iki izo formu *ROCK α* (*ROCK II*) ve *ROCK β* (*ROCK I*) bulunmaktadır [Leung T. vd., 1995, Isizaki T. vd.1996].

Bir serin-treonin kinaz olan Rho kinaz, monomerik guanozin 5'-trifosfatların Ras süperfamilyasının, Rho alt familyasının bir üyesi olan küçük GTPaz Rho'nun bir alt efektörüdür. Rho ailesinin memelilerde en az 10 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar arasında Rho izoformlarından Rho A, B, C, D, E ve G; Rac izoformlarından Rac 1, Rac2, Rac3, Cdc42 ve TC10 bulunur [Sarı A.N. vd., 2010].

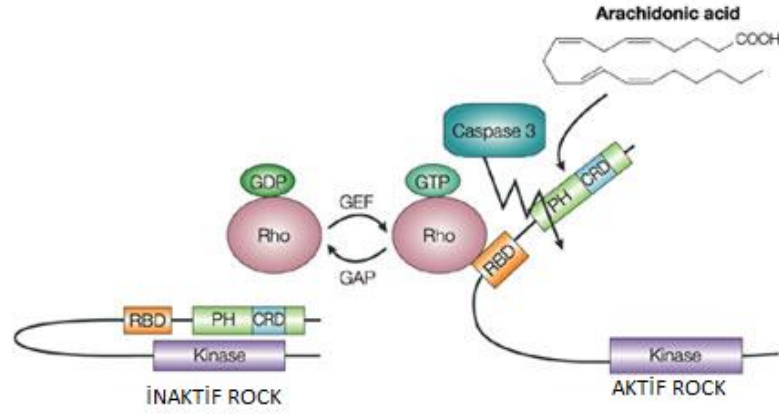
Rho kinaz, N-terminal bölgesinde bulunan katalitik bölge, orta bölümde bulunan kıvrılmış kıvrım (coiled coil) bölge ve C terminal bölgesinde bulunan ve sistince zengin bölümden oluşan plekstrin homologu (PH) bölge olmak üzere 3 ana bölgeden oluşur. Rho hücrede, GTP bağlı aktif form veya GDP bağlı inaktif formda bulunur. Rho proteinleri gen ifadesini ve aktin hücre iskeletini kontrol eden sinyalleşme yollarında etkilidir [Jianjian Shi and Lei Wei, 2007].



Şekil. 2.2. ROCK'un Moleküler Yapısı.[Zhou Qian vd. 2011'den modifiye edilerek kullanılmıştır.]

Rho; kinaz bölgesi, kıvrılmış kıvrım ve pleksitrin homoloğu bölge olmak üzere 3 bölümden oluşur. Kıvrılmış kıvrım bölgesinde Rho'nun bağlandığı bölge bulunurken, PH bölgesinde sisteince zengin bir bölge vardır.

ROCK, 160 kDa molekül ağırlığına sahip, serin/treonin kinaz etkinlikli protein olarak tanımlanmıştır. ROCK otoinhibitör etkiye sahiptir. İnaktif formda ROCK'nin C-terminal Pleksitrin homoloğu (PH) bölgesi ve Rho bağlanma bölgesi (RBB), kinaz bölgesi ile etkileşim içindedir. Enzimin etkinlik gösterebilmesi için C terminal bölgesi ile katalitik bölge arasındaki etkileşimin bozulması gerekmektedir. Bu etkileşim çeşitli substratların enzimin C terminal bölgesine kendilerine özgül bağlanma yerlerine bağlanması ile veya C terminal bölgesinin kesilmesi ile engellenir Şekil 2.3. [Riento vd. 2003][Mutsuki A vd.,1999]. Y27632 ve HA-1077 (fasudil) gibi ROCK inhibitörleri, enzim kinaz bölgesine bağlanarak hem ROCK I'yi hem de ROCK II'yi inhibe ederler. Kaspaz-3 aracılıklı ROCK I aktivasyonu apoptotik uyarana bağlı olmaksızın hemen hemen tüm apoptotik olaylarda membran tomurcuk oluşumundan sorumludur. ROCK, apoptozun işlem fazında gerçekleşen hücre kasılması, membran tomurcuk oluşumu, çekirdek parçalanması ve apoptotik hücrelerin apoptotik cisimciklere bölünmesi gibi morfolojik olayların düzenlenmesinde etkilidir [Linda Van Aelst vd. 1997][Hahmann C vd., 2010].

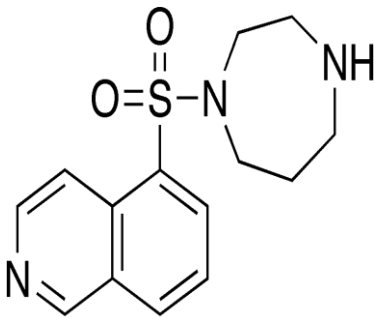


Şekil 2.3. ROCK Fonsiyonlarının Düzenlenmesi. [Riento vd. 2003'ten modifiye edilerek kullanılmıştır.]

GDP bağlı iken inaktif olan rho, GTP bağlanması ile aktif hale gelir ve ROCK üzerindeki rho bağlama bölgesine bağlanarak ROCK'un etkinliğini artırır ve aktifleşmesini sağlar.

2.5. FASUDİL'İN (HA-1077) ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMASI

Fasudil, 10 yıldan uzun bir süredir kanı sulandırmak ve damardan akışını kolaylaştırarak beyne zarar vermesini önlemede kullanılan bir Rho kinaz inhibitörü ve vazodilatördür. İlk keşfedildiğinde serebral vasospasm tedavisinde kullanılmıştır [Sibuya M vd.1993]. Aynı zamanda pulmoner hipertansiyonun tedavisi için efektif olduğu bulunmuştur [Doggrell SA. vd, 2005] [Şekil 2.1.]



Şekil 2.4. Fasudilin Açık Formülü.

Fasudilin Zue F. ve ark. [Zue F vd.,2011] tarafından yapılan bir çalışmada akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) 'ün ekspresyonunu azaltarak migrasyonu ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir.

Han Ying ve ark. [Ying H. vd., 2006] tarafından yapılan bir başka çalışmada ise fare ve insan modellerinde tümör ilerleyişini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Rho inhibitörü Fasudil'in BxPc-3 Hücrelerinde proliferasyonu ve metastazı baskılayacağı düşünülerek seçilmiştir.

2.6. APOPTOZ

Apoptoz, Yunanca bir sözcük olup, “*yaprak dökümü*”, “*ayrı düşme*” ya da “*sonbahar*” gibi anlamlara gelmektedir ve ilk kez Kerr tarafından bir çeşit hücre ölüm şeklini tanımlamak için kullanılmıştır [Kerr J.F.R. 1971]. Yaşayan her hücre yaşam ve ölüm için programlanmıştır. Bu olay genetik bir program için de işler. Yaşlanan, işlevlerini yitiren, gelişmesi bozulan, fazla üretilen ve DNA'sında hasar taşıyan hücreler, güvenli bir şekilde yok edilir [Kerr J.F.R. vd., 1972]. Hücreler ölüme giderken genellikle iki yoldan birini kullanırlar. Hasar verici ajanlarla öldürülürler ya da intihara indüklenirler. Hasar nedeniyle ölen hücreler, mekanik hasarlar veya toksik ajanlar nedeniyle ölürler. Plazma membranları iyon ve su geçişi kontrolünü yitirdiğinden hücreler şişerler. Hücre içerikleri değiştiğinden dolayı çevre dokularda inflamasyon oluşur [Yehielly F. vd., 2000].

Apoptoz dört ardışık basamakta gerçekleşir. Bunlar:

1. Apoptozun ekstraselüler ve intraselüler sinyallerle başlatılma fazı (uyarılma fazı)
2. Kontrol ve düzenleme fazı (işlem fazı)
3. Ortadan kaldırılma fazı (infaz fazı).

Apoptoz'un uyarılmasında Çizelge 2.1.'deki etmenler etkili olup, hücre dışından gelen sinyaller apoptozu dış yolakta başlatırken, hücre içi sinyaller de mitokondrinin içinde bulunduğu iç yolağı harekete geçirmektedir.

Çizelge 2.1. Apoptozu başlatan hücre içi ve hücre dışı sinyaller.

HÜCRE DIŞI SİNYALLER	HÜCRE İÇİ SİNYALLER
YAŞAM SİNYALLERİ	KALSİYUM ARTIŞI
ÖLÜM RESEPTÖRLERİ AKTİVASYONU	HÜCRE İÇİ pH AZALMASI
FAS-FAS LİGAND ARACILI SİNYAL YOLUNUN UYARILMASI	HÜCRE SIKLUS BOZUKLUKLARI
TNF YOLUNUN UYARILMASI	SİTOKİNLER
SİTOTOKSİK T LENFOSİTİ ARACILI UYARIM	TNF
KOLONİ UYARICI FAKTÖR	P53 AKTİF OLMASI
NÖRON BÜYÜME FAKTORÜ	VİRAL-BAKTERİYAL ENFEKSİYONLAR
İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ	ONKOJENLER
IL-2 AZALMASI	
GLUKOKORTİKOIDLER	
DIŞ ETMENLER	

Apoptozun gen düzeyinde baskılanması ve indüklenmesinde ise Çizelge 2.2.'deki genler işlev görmektedir. Bcl-2 ailesi apoptozun hem indüklenmesinde, hemde baskılanmasında etkilidir [Jaatela M. 1999].

Çizelge 2.2. Apoptozu baskılayan ve indükleyen genler.

BASKILAYAN GENLER	İNDÜKLEYEN GENLER
BCL-2 GRUBUNUN BAZILARI (mcl-1,bcl-xl)	BCL-2 GRUBUNUN BAZILARI (bad,bax)
c-abl	c-myc
RAS ONKOGENİ	P53,P21
ÇÖZÜNEBİLİR FAS	FAS
P53	FADD
P20	ICE
	LOH

Programlı hücre ölümünde işlem fazı, apoptozun aktif fazı olarak bilinir. Yaklaşık bir saat süren bu dönem çeşitli morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Membran tomurcuk oluşumu, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması olmak üzere işlem fazı 3 aşamada gerçekleşir [Mills JC.,1999].

Salıverme aşamasında, hücreler ekstraselüler matriks'ten koparak küresel bir şekle sahip olurlar. Hücrede aktin kortikal bölgede halka şeklinde toplanır ve tomurcuk oluşumuna zemin hazırlarlar. Tomurcuklanma aşamasında ise miyozin II aktivasyonu sonucu kortikal aktin halkası büzülür. Aynı anda hücre membranı aktin kenetlenmesinde oluşan güçsüzlük sonucu membran aktin bağlantısı koparak tomurcuk oluşumu gözlenir. Apoptoz süresince oluşan birçok morfolojik ve biyokimyasal değişimler kaspazların aktivasyonu ile gerçekleşir. Sistein proteazlar olarak bilinen kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Kaspazların aktivasyonu iki farklı yolla gerçekleşebilir. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini kullanan dış yol, özgül ölüm sinyallerinden sorumludur. İç yol ise endoplazmik retikulum ve mitokondri aracılıklı sinyalleri içerir [Danial NN vd., 2004].

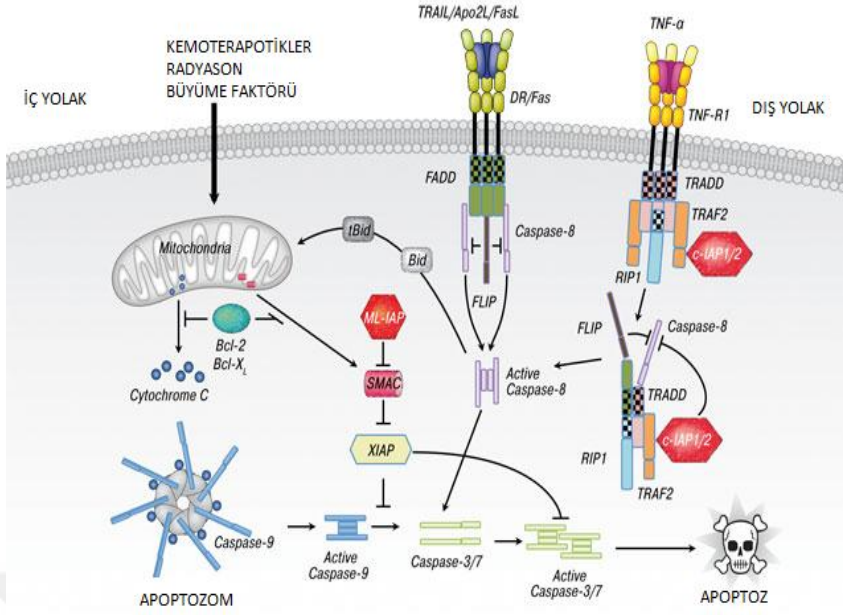
Kaspaz-2, -8, -9 ve 10 başlatıcı kaspazlardandır, Kaspaz-3, -6 ve -7 ise efektör kaspazlardır. Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar. Kaspazlar hücrede yüzden farklı proteini substrat olarak kullanırlar. Kaspaz-3, -6 ve -7 başlatıcı kaspazlardan farklı olarak kısa bir N-terminal peptid (23-28 aminoasitlik) bulundurulur. Substrat ve inhibitör özgülüğünde Kaspaz-3 ve -7 genellikle benzerdir. Kaspaz-6 ve -7, Kaspaz-3 tarafından aktifleştirildiği için bitirici kaspazlar olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca bunların dışında (kaspaz-1, -4 ve -5) pro-inflamatuar sitokinleri aktifleştirerek savunma sisteminde görev alır [Philchenkov A., 2004].

Apoptoz, ölüm reseptörleri adı verilen birbiriyle yapısal olarak akraba olan birkaç reseptör tarafından aktif olarak uyarılır. En iyi bilinen örnekleri TNF- α ve Fas reseptörleridir. Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir

ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz-8'in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan reseptörlerdir. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar reseptörün trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi molekülle etkileşerek prokaspaz-8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz-8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar [Elmore S. 2007]. Aktif kaspaz-8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom-c, bazı başka proteinlerin (SMAC) ve kalsiyumun serbestlemesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu mitokondriyal yolu da aktiflemiş olur. Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaşan Fas ligandı, ya da TNF- α , hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak apoptozu uyarabilir. Fas reseptörünün ligandı aktiflenmiş T lenfositlerde ayrıca dalak, testis, karaciğer ve böbrek hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir [Suda T. vd., 1994]. Çeşitli virüslerle infekte hücrelerde ya da p53 ün aktiflenmesi sonucu Fas reseptörünün ifadesi, o hücrenin sitotoksik T lenfositler tarafından öldürülmesini sağlar. FAS ve TNF- α dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de hücre içinde benzer yollarla ölümü uyarabilir. TRAIL reseptörlerinin FAS reseptöründen farklı olarak karaciğer, nöronlar, miyositler, kolon, bronş epiteli, Leydig hücreleri gibi dokularda yapısal biçimde ifade edildiği ve TRAIL'in de bu dokularda bulunduğu gösterilmiştir [Spierings D.C. vd.,2004].

Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondri iç ve dış zarla çevrili yapıdadır, bu zarlar tıpkı hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Dış zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar. Bu kaçış, ya zarda oluşan geçirgenlik geçiş aralığı aracılığıyla ya da dış zarın patlamasıyla oluşabilir. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan

sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), SMAC ve ENDO G adlı DNAz enzim, sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar [Ow Y-L P. vd., 2008]. Apoptozom, kaspaz-9'u aktive etmek üzere keser, kaspaz-9, diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktive ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesi Bcl-2 ailesi adı verilen bir protein grubu tarafından düzenlenir. Hücrede antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2, Bcl-x, yine aynı ailenin üyeleri olan Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 proteinleri gibi proapoptotik proteinler tarafından baskılanır. Ailenin proapoptotik üyeleri normal koşullarda inaktif durumdadır, bu nedenle mitokondriyal zar geçirgenliği Bcl-2 ve benzerlerinin etkisi sayesinde değişmez. Ancak çeşitli uyarılar (büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, UV ışını Bmf'nin) proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar. Sonuçta, Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır, Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında geçirgenlik geçiş aralığı oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açarlar. Bu da uygulayıcı kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır. Kaspazlar inhibitör apoptoz proteinleri (İAP) denen bir grup protein tarafından baskılanır. Endoplazmik retikulum (ER) da, apoptotik süreci başlatabilen organellerden diğeridir. Protein katlanmasında temel bir işlev yapan ER da bu katlama işlevi bozulduğunda, katlanmamış proteinlerin yol açtığı bir stres ortaya çıkar. Bu stresin aşırı olması ya da uzaması, proteaz ve kinazların doğrudan aktivasyonu ve hücre içi kalsiyumun artışıyla mitokondriyal yolu aktive eden bir etki oluşturur [Xu C. vd., 2005].



Şekil 2.5. Apoptoz'un İç ve Dış Yolak Mekanizması. [Almagro vd. 2012'den Modifiye edilmiştir.]

Dış yolakta; ölüm domaini olan Fas receptörü ligandıyla uyarıldıktan sonra inaktif FADD aktifleşir ve prokaspaz-8 kesilerek aktif kaspaz-8 olarak etkinleştirilir. Aktif kaspaz -8, proaktif kaspaz-3'ü keserek kaspaz-3'ü aktifleştirir ve apoptozu gerçekleştirir. İç yolakta ise; Sitokrom c mitokondriden salıverildikten sonra APAF-1'e bağlanır ve onu etkinleştirir. ATP'nin de bu yapıya katılması ile apoptozom adı verilen kompleks bir yapı oluşur. Bu yapı inaktif olan prokaspaz -9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürür. Kaspaz -9 proaktif olan kaspaz -3'ü aktifleştirir. Aktif kaspaz 3, kompleks halinde bulunan kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz ve inhibitörünü keserek birbirinden ayırır ve böylece serbest haldeki kaspaz ile aktifleşen deoksiribonükleaz, apoptozun göstergesi olan kromatin yoğunlaşmasına ve DNA parçalanmasına neden olur.

p53, DNA gardiyanı da denen ve bu güne dek üzerinde en çok çalışılan tümör süpresör proteinlerden biridir. p 53 sitoplazmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA'da belli genlerin (Bax, Apaf-1, Fas) aktivasyonuna, böylece yapımlarının artmasına belli genlerin (Bcl-2, Bcl-x) de baskılanmasına yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, sürekli yapılan ama

ubikitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yıkılan p53'ün fosforillenmesine, fosforillenme ise ubikitinlemenin bozulmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar [Demaurex N. vd., 2003].

Hücrelerin normal apoptotik süreçten kaçmalarını sağlayan bir özellik kazanmaları hemen bütün kanser hücrelerinde gözlenen bir özelliktir. Tümör hücreleri ya antiapoptotik proteinlerin aşırı yapımıyla ya da proapoptotik proteinlerin yapımlarının ya da etkilerinin azalmasıyla apoptoza dirençli bir nitelik kazanırlar. Örneğin foliküler B hücreli lenfomada kromozomal bir yer değiştirme sonucu Bcl-2 proteininin yapımı artmaktadır. p53 yoluyla başlatılan apoptoz yolundaki proteinlerin yapımları ya da işlevlerindeki bozuklukların insanlardaki kanserlerin neredeyse yarısında etkili olduğu gösterilmiştir [Fadeel B. vd., 2005]

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) kök hücre hazırlık, kök hücre akım sitometri, kök hücre doku kültürü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (BAB- FBF-BB (CK) 2012-4 YL).

3.1. BxPC-3 HÜCRE HATTININ KÜLTÜRE EDİLMESİ

BxPC-3 hücre hattı (ATCC-CRL-1687, Lot:59313331, Manassas, USA) BT Kimya Sanayi ve Ticaret Limitet Şirketi(İstanbul, Türkiye) aracılığı ile LGC standartlarına uygun olarak getirilmiştir.

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

RPMI 1640 hücre besiyeri ortamı

Fötal Bovine Serum

L-Glutamin

Penisilin/Streptomisin

Amfoterisin-B

Tripsin-EDTA

3.1.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Pasaj İşlemi

Besiyeri olarak %10 FBS, %1 Pen/Strep, %1 Amfoterisin-B, %1 L-Glutamin içeren RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücre kültür kabı olarak filtreli kapaklı T25 ve T75 (CellStar, Germany) boyutlarında flasklar kullanıldı. Hücreler optimum koşullar olan %95 nem, 37 °C ve %5 CO₂'li ortam şartlarını sağlayan Esco Cell Culture (CCL-170B-8) inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin çözülmesi esnasında aşağıdaki protokol izlenmiştir.

- 1) Bir beher içine distile su koyup su banyosunda 37°C kadar ısınması beklendi.
- 2) Azot tankında bulunan dondurulmuş hücreler su banyosuna alındı ve 1-2 dakika beklendi.
- 3) Dondurma tüpünün çevresine alkol sıkıldı ve kurulandı.
- 4) Steril bir santrifüj tüpü içerisine 7-9 ml besiyeri koyuldu.
- 5) Dondurma tüpündeki hücre karışımı sıvı tüpe aktarıldı.
- 6) Pipetaj yapıldı ve 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 7) Santrifüj sonrası tüpün üzerindeki süpernatant pastör pipeti ile çekilerek atıldı.
- 8) Tüpün dibinde kalan pellete 3 ml besi yeri eklendi ve nazıkçe pipetaj yapıldı.
- 9) Tüpte oluşan hücre ve besi yeri karışımı kültür kabına aktarıldı.
- 10) Kültür kabına 2 ml besi yeri ilave edildi.
- 11) Hücreler mikroskopta kontrol edildi.
- 12) Kültür kabı 37 °C ve %5'lik CO₂'li etüvle inkübe edildi.

3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler yaklaşık 1 hafta içerisinde 2-3 kez ½ oranında besleme yapılarak kültür kabını kapladı. Hücreler T25 kültür kabını tamamen kapladıktan sonra 1:3-1:6 oranında pasajlanarak yeni kültür kaplarına alındı. Pasajlama işlemi için aşağıdaki yöntem kullanıldı.

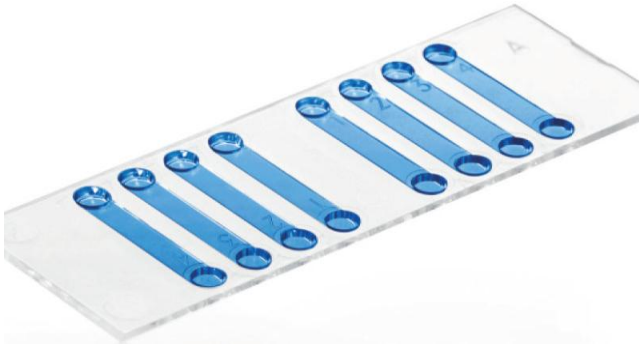
- 1) Hücre yüzeyini kaplayan medium pipetle çekilerek uzaklaştırıldı.
- 2) PBS ile hücreler yıkandı.
- 3) 1-2 ml Tripsin-EDTA eklenerek oda sıcaklığında veya 37°C da inkübe edildi.
- 4) Hücre yüzeyinden kalkan hücreler 15 ml'lik tüpe aktarıldı.
- 5) Tüpün üzerine 5-6 ml RPMI-1640 ilave edildi.
- 6) 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 7) Tüpün üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- 8) Dipte kalan hücrelerin üzerine 6 ml katkılı RPMI-1640 eklendi ve 3 kültür kabına 2'şer ml olarak dağıtıldı.

- 9) T25 kültür kaplarına 3 ml, T75 kültür kaplarına 13 ml RPMI-1640 eklendi.
- 10) Kültür kapları 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.

3.1.3. Hücrelerin Sayılması

Hücelere tripsinizasyon işlemi uygulanarak, tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Kaldırılan hücreler bir tüpe alınarak 500 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek tüpün üzerindeki süpernatant atıldı. Kalan pelletin üzerine 1 ml besi yeri konarak pipetaj yapıldı.

Cedex XS (ROCHE, Mannheim, Germany) cihazı ve cihazın yazılımını taşıyan kontrol ünitesi açıldı. Resüspanse edilen hücrelerden 20 µl alınarak 0,2 ml lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Tüpün içerisine 1:1 oranında distile su ile dilüe edilmiş 20 µl Tripan Blue (ROCHE Mannheim, Germany) eklendi. Karışım pipetajlanarak homojen hale getirildikten sonra cihaza ait olan Smart Slides (ROCHE Mannheim, Germany) adı verilen özel lama 20 µl eklendi (Şekil 3.1.). Lam Cedex cihazına yerleştirilmiş ve hücre sayımı yapılarak not edilmiştir.



Şekil 3.1. Cedex XS Smart Slides.

8 kuyucuklu olan Cedex XS Smart Slides'a örnekler iki farklı yönden yüklene bilmektedir. [bidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Customer-Specific-Slides/Custom-Specific-Flow-Slides-and-Channels adresinden 01.06.2015'te alınmıştır.]

3.2. xCELLigence SİSTEMİNDE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİNİN YAPILMASI

xCELLigence sistemi herhangi bir işaretleme yapılmaksızın hücrelerin doğal hallerinin gerçek zamanlı olarak ölçülmesi için tasarlanmış bir cihaz olup, çalışma prensibi plate'lerinin tabanına yerleştirilen mikroelektrotların elektriksel empedans değerlerini ölçmesi mantığına dayalıdır. Empedansta meydana gelen değişim hücre canlılığı, morfolojisi, sayısı ve hareketi gibi hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif verilere ulaşmamızı sağlar. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı inkübatör içerisine yerleştirilen ve plate'lerin koyulduğu bir ana ünite ile data kablosu yardımı ile ona bağlanan bir kontrol ünitesinden meydana gelir (Şekil 3.2)[Xi B. vd.,2008] Cihaz inkübatöre yerleştirilmeden önce %80 alkol ile kendi temizlik kiti kullanılarak temizlendi ve 45 dakika sterilizasyon için laminar kabinde UV'ye maruz bırakıldı. Sterilizasyon tamamlandıktan sonra ana ünite inkübatöre yerleştirildi ve standardizasyon plate'i kullanılarak standardizasyon yapıldı.



Şekil 3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Ölçüm Cihazı Ana Ünite ve Kontrol Ünitesi.

Ana ünite üç kızaklı veya tek kızaklı olmaktadır. Ayrıca temizlik ekipmanı ve kullanım kitapçığında temizlik ve kullanım bilgileri açıkça tarif edilmiştir.

[[Http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=184](http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=184) 01.06.2015 adresinden alınmıştır.]

3.2.1. E-plate Tasarımı ve Software Planlaması

Yazılımın açılmasından sonra öncelikle E-plate'in yükleneceği kızak belirlendi (cihaz 3 kızaklıdır). "Experiment Notes" sekmesinden deney ile ilgili genel bilgiler girilerek plate tasarlandı. "Layout" sekmesi ile plate'in yerleştirileceği kızak ve plate düzeninin girişi yapıldı. Çalışmada H1 ve H2 kuyucukları kontrol (yalnızca Medium içerir) A1/A2'den G1/G2'ye kadar olan kuyucuklar ise örnekleri içerir. "Schedule" sekmesinden deney aşamaları tasarlandı. Arka plan ölçümü olarak 1 Sweep x 1 Interval' den oluşan ve 19 saniye sürececek şekilde, 30 dakika da bir ölçüm alınmak sureti ile (184 adet ölçüm), manuel olarak istenilen saat aralığında durdurabilmek için 999 saat olarak ayarlandı. Bu planlama ile hücre titrasyon eğrisine ulaşıldı.

3.2.2 Hücre Titrasyonunun Belirlenmesi

Hücre titrasyonunun belirlenmesi için hücrelerin en az %80 konfluent olması gerekmektedir. Hücreler beklenen konfluentlik düzeyine geldiğinde tripsinize edildi ve pellet, 1 ml katkılı besi yeri ile resüspanse edilerek Cedex XS cihazında sayımı yapıldı (Hücrelerin sayılması). Sayımdan sonra E-plate 16'nın (Şekil 3.3.) kontrol kuyucukları da dâhil olmak üzere yaklaşık 100 µl besi yeri eklenerek arka plan ölçümü alındı.



Şekil 3.3. E-Plate 16. Toplamda 16 kuyucuğa sahip olan E-Plate 16, kuyucukların altındaki elektrotlar sayesinde empedans ölçümü yapmaktadır.

[http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=179 adresinden alınmıştır.]

Ölçüm sonrasında hücre sayısı 2×10^5 μ l hücre olacak şekilde ayarlanarak, E-plate 16'nın kuyucuklarına duplike olarak uygulandı. A1 ve A2 kuyucuklarından alınan 100 μ l hücre süspansiyonu G1 ve G2 kuyucuklarına kadar her seferinde $\frac{1}{2}$ seri sulandırma yapılarak seyreltildi. Bu aşamada hava kabarcığı ve aşırı köpürtme yapılmamaya dikkat edildi. Kuyucuklardaki hücre sayısının dağılımı Çizelge 3.1'deki gibidir.

Çizelge 3.1. E-Plate 16 düzeni.(Değerler Hücre sayılarını belirtmektedir.)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	KONTROL
2	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	KONTROL

Hücreler A kuyucuğundan başlanarak $\frac{1}{2}$ oranında seyreltildi ve en son H kuyucuğuna kontrol olarak yalnızca medium kondu.

H1 ve H2 kuyucuklarına yalnızca medium yüklendi ve kontrol olarak kullanıldı. Yükleme işleminin ardından hücrelerin tabana çökmesi için 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Yarım saatlik süre sonunda plate cihazın D1 kızağına yerleştirilerek ölçüm işlemi başlatıldı. 100 saatlik empedans ölçümü alındı.

Ölçüm sonucunda bulunacak olan uygun hücre sayısı diğer deneylerde kullanıldı.

3.2.3 BxPC-3 Hücre Hattına Fasudil Uygulanması ve Hücrelerin E-plate 16' ya Yüklmesi

Titrasyonun ardından belirlenen uygun hücre sayısı seçilerek ilaç uygulanması için kullanıldı. Kuyucuklardaki sabit hücre sayılarına farklı dozlardaki Fasudil konsantrasyonları uygulandı. Fasudilin Sitotoksik indeksi (IC_{50}) belirlendi. Titrasyon deneyindeki aşamalara ek olarak bu aşamada bütün kuyucuklara 90 μ l katkılı besiyeri eklenerek arka plan ölçümü alındı, hücreler 100 μ l katkılı besiyeri ile kuyucuklara yüklendi. Belirlenen inkübasyon süresi sonunda (yaklaşık 20-30 saat)

farklı ilaç dozları, kuyucuğun son hacmi 200 µl olacak şekilde belirli derişimlerde 10 µl ilaç kuyucuklara tutunan hücrelerin kalkmaması için pipetaj yapılmadan, hava kabarcığı bırakılmadan dikkatlice üstten bırakıldı. G1 ve G2 kuyucuklarına ilaç yüklemesi yapılmazken, H1 - H2 kuyucuklarına ise yalnızca medium ve Fasudilin en yüksek dozu yüklendi ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Plate'in dizaynı Çizelge 3.2.'deki gibidir.

Çizelge 3.2. Fasudil Uygulaması İçin E-plate 16 Düzeni

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (İLAÇ YOK)	BESİYERİ FASUDİL
2	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (FASUDİL)	HÜCRE (İLAÇ YOK)	BESİYERİ FASUDİL

A1 ve A2 kuyucuğundan F1 ve F2 kuyucuğuna kadar fasudil uygulanmış hücre konuldu. G1 ve G2 kuyucuğuna yalnızca hücre, H1 ve H2 kuyucuğuna ise fasudil ve besiyeri eklendi.

3.2.4 xCELLigence Cihazında Migrasyon İçin CIM-Plate Uygulaması

Hücreler deneye başlanmadan bir gün önce pasajlandı. Hücreler bir gece serumsuz (FBS içermeyen) besi yerinde bırakıldı. %80 konfluent seviyesine ulaştıktan sonra besiyeri alınarak PBS ile iki kez yıkama yapılarak tripsinize edildi. Daha sonra hücreler DPBS ile santrifuj edilmiş ve elde edilen pellet serumsuz besi yeri ile süspanse edilerek kuyucuklara aktarıldı. Kontrol olarak kullanılacak olan hücrelere besi yeri eklendi.

CIM-Plate 16 birbirinden ayrılabilen 3 parçadan oluşmaktadır (Şekil 3.4.). En alt kısımda bulunan kuyucuklara A1'den G1'e kadar 160 µl serumlu besi yeri baloncuk oluşturmadan duplike olarak yüklendi. H1 ve H2 kuyucuklarına ise 160 µl serumsuz besi yeri eklendi. İşlemin sonrasında üst parça yerleştirildi. Üst parçadaki A1'den G1'e kadar olan bütün kuyucuklara 25-50 µl serumsuz besi yeri duplike bir şekilde yüklenirken kontrol kuyucuğu olan H1 ve H2 ye 25-50 µl serumlu besi yeri eklendi. Cihazın D1 kızağına yerleştirilen Plate, 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 1 saatin sonunda deney Çizelge 3. 3'deki gibi tasarlandı ve software başlatılarak ölçüm alındı.



Şekil 3.4. CIM Plate 16.

CIM Plate-16, üç kısımdan oluşur. Yatayda 8 olmak üzere dublike toplamda 16 kuyucuktan oluşmaktadır. En altta migratif bir ajanın yüklendiği alt tabla, orta kısımda örneklerin yüklendiği plak ve üst kapak mevcuttur.

[http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=182 01.06.2015 adresinden alınmıştır.]

Çizelge3.3 Migrasyon Deneyi CIM Plate 16 Tasarımı

	1	2
A	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri
B	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri
C	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri
D	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri
E	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri
F	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri
G	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri
H	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre	100 µl Serumsuz besiyeri +hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri

üst kuyucuk
alt kuyucuk

Plate'in A kuyucuğundan H kuyucuğuna kadar üst kısmına serumsuz besiyeri ve hücre, alt kuyucuğuna ise serumlu besiyeri kondu ve aç olan hücrelerin besine doğru hareketi ölçüldü.

3.3. KANTİTATİF RT-PCR YÖNTEMİYLE KASPAZ -3,-8,-9 GENLERİNİN ABSOLUT İFADELERİNİN BELİRLENMESİ

3.3.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

T25 kültür kabı içerisinde üretilen hücreler konfluent duruma ulaştıktan sonra katkılı besi yeri uzaklaştırılarak kültür kaplarına 0,2 mM ve 2 mM olmak üzere Fasudil içeren katkılı besiyeri uygulandı ve 24 ve 48 saatlik ilaç uygulamasından sonra hücreler tripsinize edildi. Tripsinizasyon sonrasında elde edilen hücreler DPBS ile santrifüj edildi ve pellet alındı.

Alınan hücreler ROCHE High RNA Isolation Kit (ROCHE Mannheim, Germany Lot: 11 828 665 001) kullanılarak önerilen protokole göre RNA izolasyonu yapıldı. RNA örnekleri Capital Bio. NanoQ Mikro-Volume Spektrofotometre cihazı ile ölçülmüş ve cDNA sentezi için -80 °C da saklandı. cDNA sentezi için 260/280 nm absorbans oranı 1,8-2,2 aralığında olan RNA örnekleri seçilerek her örnekten 1 µl (2-9 µl) arası total RNA olacak şekilde alınarak cDNA sentezi için karışım hazırlandı.

-80° C'dan çıkarılan RNA'lar ROCHE Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit'i (ROCHE Mannheim, Germany) kullanılarak önerilen protokole göre cDNA sentezi yapıldı. Deneyde iki karışım hazırlandı (Çizelge 3.4 ve 3.5).

Çizelge 3.4. First Strand cDNA Sentezi Karışım-1 Protokolü.

KARIŞIM-1	
Total RNA	2-9 µl
Random Primer	2 µl
dH2O	X µl
Toplam	13 µl

Örnekler iki karışım ortasında 65 °C da 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve bu esnada ikinci karışım hazırlandı.

Çizelge 3.5. First Strand cDNA Sentezi Karışım-2 Protokolü.

KARIŞIM-2	
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4µl
Protector RNase İnhibitor Buffer	0,5µl
dNTP Mix	2µl
Transcriptor Reverse Transcriptase Enzyme	0,5µl
Toplam	7 µl

TOPLAM KARIŞIM = Karışım-1 + Karışım-2 = 13µl + 7 µl = 20 µl

Total karışım, PCR tüplerinde dikkatlice pipetaj edildikten sonra Thermal Cycler Cihazına yerleştirildi. Kullanılan cDNA sentezi thermal cycler programı aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.6. cDNA Sentezi Thermal Cycler Programı

PROGRAM	
25°C	10 DAKİKA
50°C	60 DAKİKA
80°C	5 DAKİKA

Thermal Cycler'dan alınan örnekler Gen ifadesi çalışmasına kadar -20 °C'da saklandı.

3.3.2. Kantitatif RT-PCR'da Kaspaz- 3, Kaspaz-8, Kaspaz 9 Gen İfadesi Absolut Kantitasyonu

cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra örnekler -20°C'de saklandı. Kaspaz - 3,-8, -9 genlerinin çalışılmasında referans gen olarak β-aktin housekeeping geni kullanıldı. Karışım çizelge 3.7.'deki protokol uygulanarak, 96 Well Plate'e Çizelge 3.8.'deki gibi yüklendi ve gen ifadesi Fit Point methodu ile Absolute kantitasyon yöntemine göre hesaplandı.

Çizelge 3.7. Kaspaz -3, -8, -9 Gen İfadelerinin İncelenmesinde Kullanılan Master Mix protokolü.

96 well Plate Yüklenen Karışım	
Master Mix (ROCHE Mannheim,Germany)	10µl
dH2O	2µl
Forward Primer	1µl
Reverse Primer	1µl
Prob	1µl
cDNA	5µ
Toplam	20µl

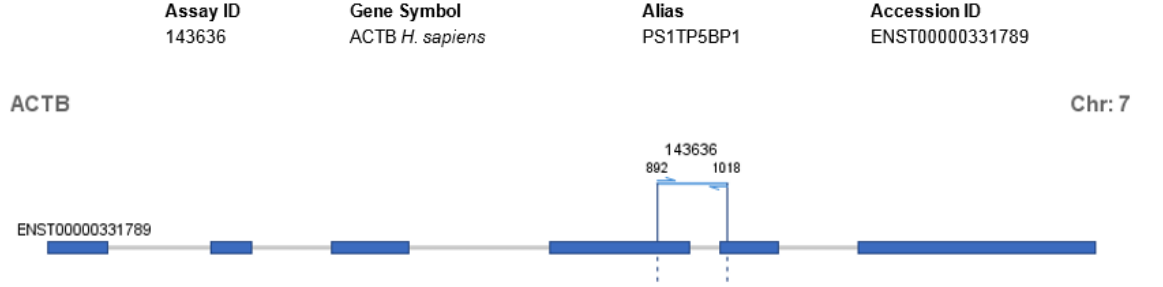
Çizelge 3.8. Kaspaz -3, -8, -9 Gen İfadelerinin 96 Well Plate Yerleştirilmesi.

	24 SAAT			48 SAAT			
	1	2	3	4	5	6	
β-ACTİN	C*	0,2 M	2 M	C*	0,2 M	2 M	NK*
β-ACTİN	C*	0,2 M	2 M	C*	0,2 M	2 M	SU
KASPAZ-3	C*	0,2 M	2 M	C*	0,2 M	2 M	NK*
KASPAZ-3	C*	0,2 M	2M	C*	0,2 M	2M	SU
KASPAZ-8	C*	0,2 M	2M	C*	0,2 M	2M	NK*
KASPAZ-8	C*	0,2 M	2M	C*	0,2 M	2M	SU
KASPAZ-9	C*	0,2 M	2M	C*	0,2 M	2M	NK*
KASPAZ-9	C*	0,2 M	2M	C*	0,2 M	2M	SU

** C'ler kontrolü, NK'lar negatif kontrolü göstermektedir.

Çalışma 2 M ve 0,2 M ilaç uygulanmış örnekler için dublike yapıldı. Kontrol den sonraki ilk iki kuyucuğa beta aktin konuldu, diğer kuyucuklara ikişerli olarak kaspaz-3,-8,ve kaspaz-9 konuldu. Çalışmada plate'in 56 kuyucuğu kullanıldı.

Şekil 3.5. Beta Actin prob dizaynı.



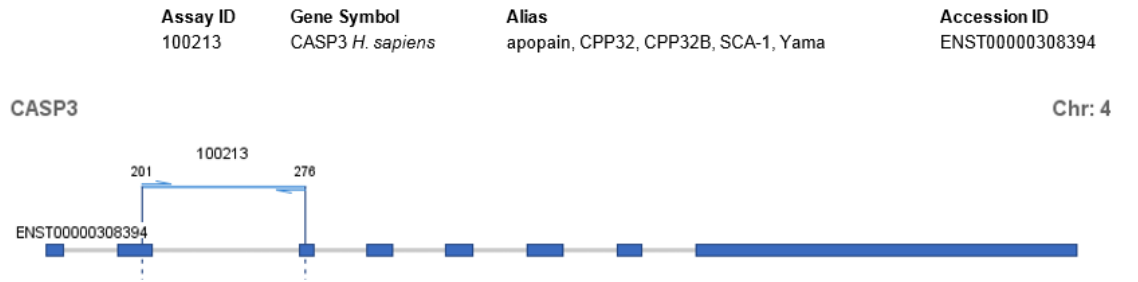
Amplifikasyon uzunluğu: 127 bç

Transkripsiyon uzunluğu: 1917 bç

Tanım: Beta Actin [Source: HGNC symbol; Acc:132]

Gen sembol: ACTB

Şekil 3.6. Kaspaz 3 prob dizaynı.



Amplifikasyon uzunluğu: 76 bç

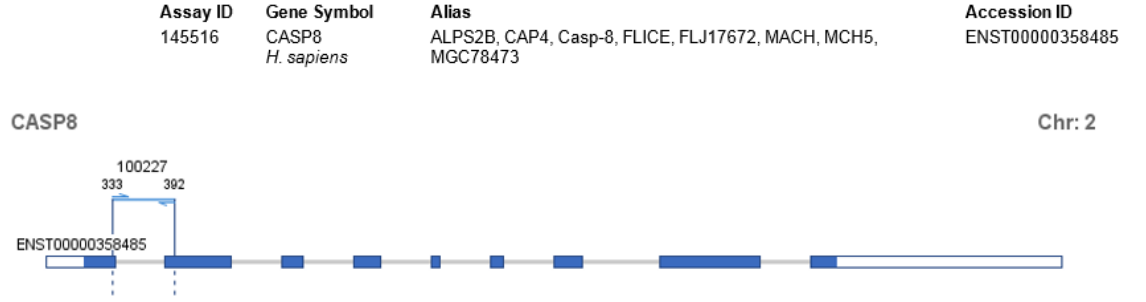
Transkripsiyon uzunluğu: 2673 bç

Tanım: Kaspaz-3 (apoptosis-related cysteine peptidase) [Source: HGNC symbol;

Acc:1504]

Gen sembol: CASP3

Şekil 3.7. Kaspaz 8 prob dizaynı.



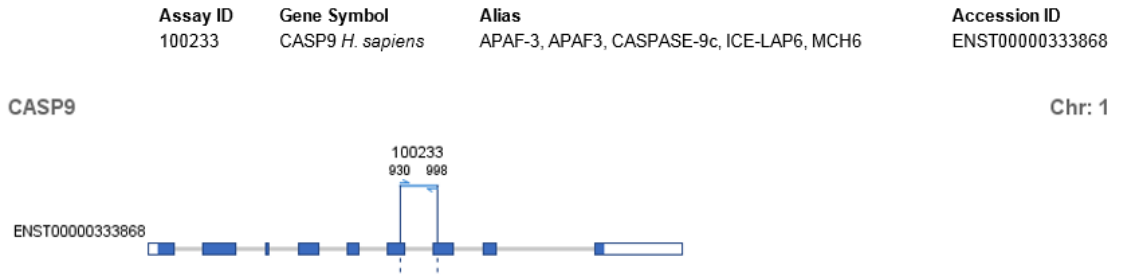
Amplifikasyon uzunluğu: 59 bç

Transkripsiyon uzunluğu:2930 bç

Tanım: Kaspaz-8 [Source: HGNC symbol; Acc:1509]

Gen sembol: CASP8

Şekil 3.8. Kaspaz 9 prob dizaynı.



Amplifikasyon uzunluğu: 69 bç

Transkripsiyon uzunluğu:2019 bç

Tanım: Kaspaz-9 [Source: HGNC symbol; Acc:1509]

Gen sembol: CASP9

3.4. AKIM SİTOMETRİ ile PE AKTİF KASPAZ-3 TESTİ

Bu test Kaspaz-3 varlığında apoptozun gösterilmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu test protokolü için öncelikle cihaz hazırlığı ve PE Aktif Kaspaz-3 boyama protokolü gerçekleştirildi.

3.4.1. FACS Aria III Akım Sitometri Cihazının Hazırlığı

BD FACSAria-III cihazında örnekler okutulmadan önce cihaz BD firmasının belirlediği prosedüre uygun olarak hazırlandı. İlk olarak cihazın etanol tankına 5 litre %70'lik etanol eklendi. FACS Flow tankına örnekler okutulmasında gerekli olan sistem sıvısı, FlowSheath eklendi. Daha sonra atık tankının cihaz ile bağlantıları kesilerek, içerisindeki atık sıvı tıbbi atık kabına boşaltıldı. Tankın dibini kaplayacak kadar FACSClean solüsyonu eklendi ve bağlantı sağlandı. Bu aşamalar tamamlandıktan sonra cihaz çalıştırıldı. Kontrol ünitesinden FACSDiva yazılımı başlatılarak, PE Aktif Kaspaz-3 için uygun olan prosedüre göre hazırlandı. Örnekler FACS Tube denilen 5 ml'lik propilen tüplere aktarıldı. Tüpler cihazın yükleme kısmına yerleştirilerek yaklaşık 1 dakika süren ve incelenen olay sayısı 10.000 olana kadar okutulacak şekilde deney düzeneği kuruldu ve deney gerçekleştirildi. Deney esnasında FACSDiva üzerinden grafikler ve deney süreci takip edildi.

3.4.2. PE Aktif Kaspaz-3 Boyama Protokolü

Öncelikle elde edilen hücreler iki kez soğuk DPBS ile yıkanarak 5 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edildi. Daha sonra kitin içinde bulunan Cytofix/Cytoperm solüsyonu ile belirtilen oranda (1×10^6 /0.5 ml) resüspanse edilerek 20 dakika boyunca buzun üzerinde inkübasyona bırakıldı. Bu aşamayı tamamladıktan sonra hücreler 300xg'de tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant atılarak 1×10^6 /0,5 ml Perm/wash Buffer (1x) ile yıkandı. İki kez tekrarlanan bu aşamadan sonra hücreler yine 300xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Yine supernatant atılmış ve 1×10^6 /0,1 ml olacak şekilde Perm/wash Buffer (1x) ve 1×10^6 /20 µl olacak şekilde antikor eklendi. Örnekler oda ısısında 30 dakika inkübasyona

bırakıldı. İnkübasyon süresinin tamamlanmasından sonra örneklere 1 ml Perm/wash (1x) eklenerek 5 dakika 300xg'de santrifüj işlemi uygulandı. Arkasından süpernatant atılarak örneklerin üzerine 500 µl Perm/Wash Buffer (1x) eklendikten sonra tüpler akım sitometri cihazında FACS Diva software programında analiz edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmalardaki, sitotoksosite xCELLigence sistemindeki IC₅₀ cell index analiz programında istatistiksel olarak, Caspase-3, -8, -9 gen ifadesi β-actin housekeeping genine göre normalize edilerek LC480 cihazında yer alan Fit Point analizi ile absolute olarak kantitasyon gerçekleştirilmiştir. Fit point analizi yükleme yapılan kontrol grubunun oluşturduğu satandart eğriyi baz alarak diğer örneklerin bu eğri ile olan ilişkisine dayanan bir method olup, eğrilerin kalitesi ayarlanabilmektedir. Yeni matematik modeli referans alınan gene göre seçilen hedef genin relatif ölçümünü tanımlamaktadır. Hedef genin relatif ekspresyon oranı (ratio R) kontrole karşı bilinmeyen örneğin CP deviasyonu ve E' ye istinaden hesaplanmasıdır [Pfaffle M. 2001].

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

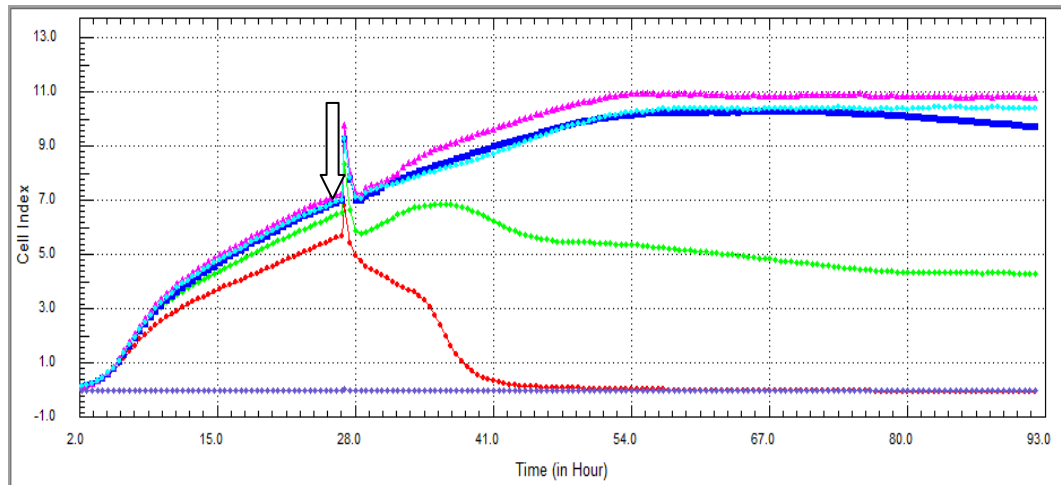
4.1. HÜCRE TİTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Hücre titrasyonu deneyinde BxPC-3 hücreleri 100 saat izlenmiş olup E-Plate kuyucuklarına yüklenen hücre sayıları Çizelge 4.1.'deki gibidir. (3.2.21 Hücre Titrasyonunun Belirlenmesi)

Çizelge 4.1. E-Plate 16 Kuyucuklarına Yüklenen Hücre sayıları

	A	B	C	D	E	F	G	H
1 HÜCRE SAYISI	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	KONTROL
2 HÜCRE SAYISI	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	KONTROL

Cihazdan alınan sonuçlara dayanarak BxPC-3 hücre hattı için kullanılacak uygun hücre sayısı 12500 ve Fasudil uygulama saati ise xCELLigence cihazından alınan sonuca göre 25-28. saatler arası olarak belirlendi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. BxPC-3 Hücre Hattının Hücre Sayısı ve Zamana Bağlı Proliferasyonu.

Bu saat aralığının seçiminde hücrelerin büyüme fazının uzunluğu ve hücrelerin ölüm fazına geçiş sürelerinin tespit edilmesi iki önemli kriter olmuştur.

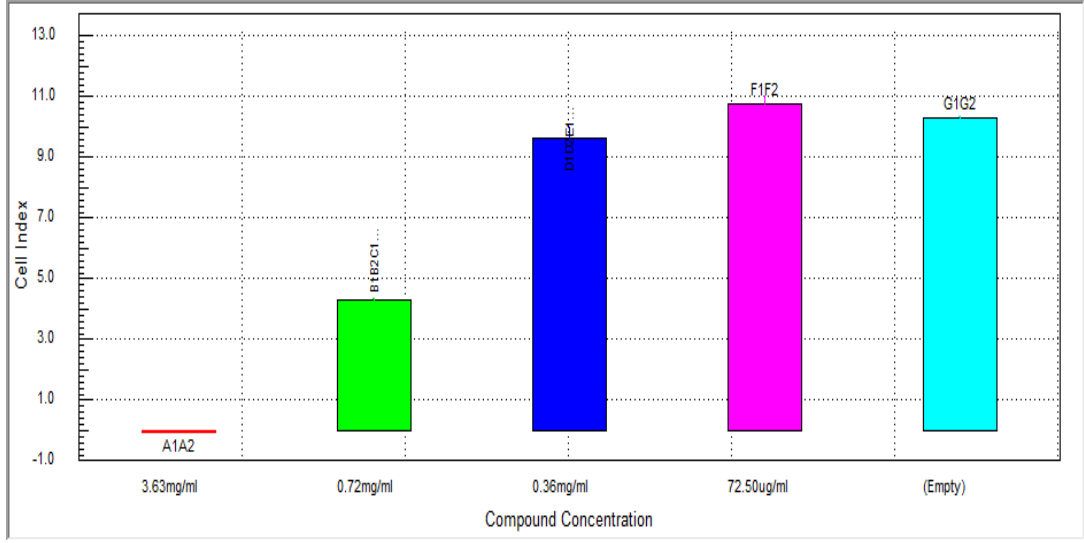
4.2. FASUDİL'E BAĞLI SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

Titrasyon deneylerinden sonra E-plate düzeni çizelge 4.2.'deki gibi yapıldı.

Çizelge 4.2. E-Plate kuyucuklarına yüklenen hücre sayısı ve uygulanan Fasudil miktarı.

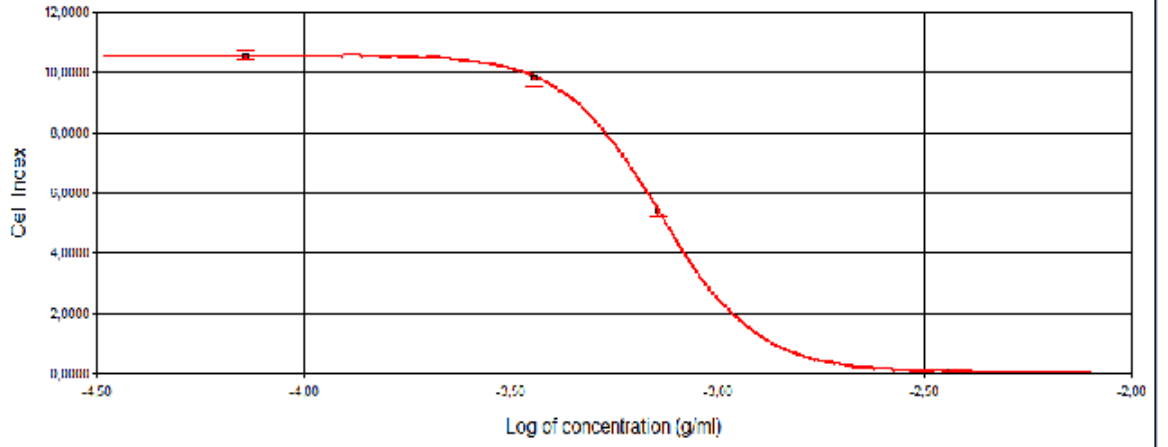
	A	B	C	D	E	F	G	H
1 HÜCRE SAYISI	12500 (10Mm)	12500 (2mM)	12500 (2mM)	12500 (0,2 mM)	12500 (0,2 mM)	12500 (0,02 mM)	HÜCRE (ilaç yok)	MEDİUM+FASUDİL
2 HÜCRE SAYISI	12501 (10Mm)	12500 (2mM)	12500 (2mM)	12500 (0,2 mM)	12500 (0,2 mM)	12500 (0,02 mM)	HÜCRE (ilaç yok)	MEDİUM+FASUDİL

Deneyin 25. saatinde deney duraklatılarak E-plate'e laminar kabin içerisinde Fasudil'in farklı konsantrasyonları Çizelge 4.2.'deki gibi yüklendi. Deney devam ettirildi ve 180. saatte sonlandırıldı. Fasudil'in farklı dozlarının kullanılması sonucu elde edilen sitotoksosite sonucu Şekil 4.2.'deki gibidir. RTCA software programına göre IC_{50} değeri $7,2835 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı. Yapılacak olan diğer çalışmalarda Fasudil için kullanılacak uygun doz miktarının 2 mM olduğuna karar verilmiştir. Literatürde Fasudil ile yapılan sitotoksik etkinin gözlemlenmesinde benzer doz aralıkları kullanılmıştır [Yang vd., 2010].



Şekil 4.2. Fasudilin BxPC-3 Hücresinde Proliferasyona Etkisi.

72,5 µg (10M) konsantrasyonun etkisi hariç, konsantrasyon arttıkça hücreler üzerindeki sitotoksosite arttı. 3,63 µg (0,02 M) konsantrasyonu hücreler üzerinde letal etki meydana getirdi.

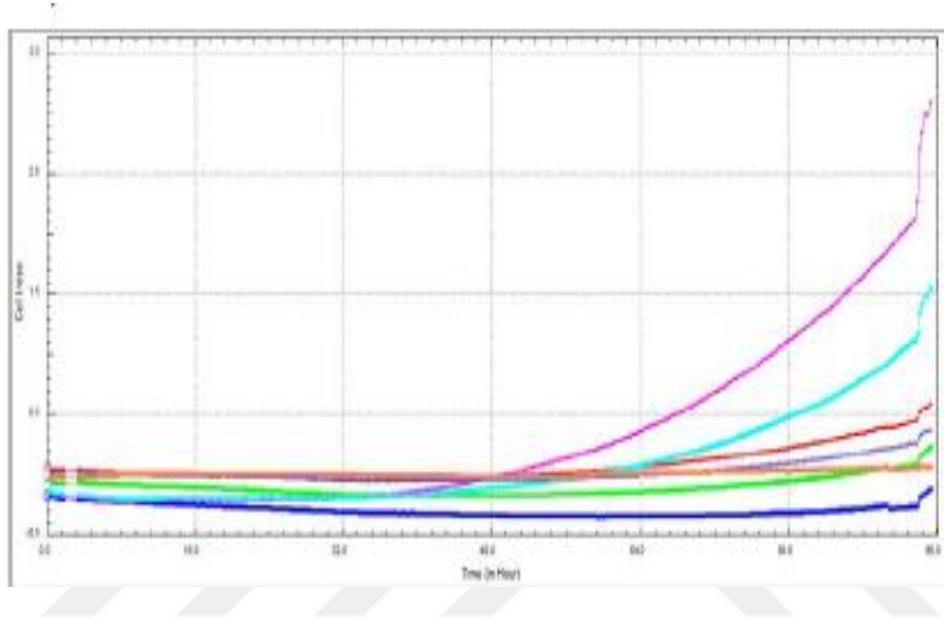


Şekil 4.3. Fasudil'in Hesaplanan IC₅₀ Değeri.

10 M konsantrasyonda sitotoksosite artmış, 0,02 M konsantrasyonda ise sitotoksosite azalmıştır.

4.3. xCELLigence DP SİSTEMİ İLE MİGRASYONUN BELİRLENMESİ

Migrasyon deneyinde kurulan deney düzeneğinde amaç, aç kalan hücrelerin %10 FBS içeren besiyerine hareketidir. Ancak yapılan çalışmada bu hareket gözlemlenemedi, hücreler metastatik aktivite göstermedi. (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. BcPC-3 Hücre Hattında Migrasyon.

Yapılan migrasyon deneyinin sonucunda hücrelerin plağın tabanına doğru hareket etmediği gözlemlendi.

Literatürde BxPC-3 hücre hattı için bazı kaynaklarda metastatik bazı kaynaklarda ise metastatik olmadığı belirtilmiş ve kesin bir kanıya varılamamıştır [Bünger vd. 2012, Suemizu H.vd., 2005]. Çalışmanın besine ek olarak bir uyarıcı ile (örneğin, TGF gibi) tekrarlanması faydalı olacaktır.

Diğer bir olasılık ise CIM Plate-16'nın por büyüklüğü 8µm'dır. BxPC-3 hücrelerinin bir arada göç ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup, pordan geçemeyecek kadar büyük yığınlar oluşturmuş olabilir [Stahle vd, 2003].

4.4. FASUDİL'İN KASPAZ-3, -8, -9 GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Hücreler konfluent duruma geldiklerinde 2 mM ve 0,2 mM Fasudil uygulandı. 12 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra kültür kabından hücreler kaldırılarak santrifüj edildi ve ardından DPBS ile homojenize edilerek total RNA izolasyonu yapıldı ve RNA kalitesinin değerlendirilmesi için 260/280 oranı NanoQ cihazında ölçüldü ve çizelge 4.3'teki sonuçlar alındı (260/280 oranı 1,8 den büyük olan RNA'lar kaliteli olarak kabul edildi).

Çizelge 4.3. Total RNA İzolasyon Örneklerinin Kalitesi

Fasudil 0,2 mM	Örnek	230nm	260nm	280nm	260/280	260/230	Konsantrasyon
Kontrol	RNA	1,56	3,96	2	1,98	2,53	158,55
24 saat	RNA	2,77	5,16	2,65	1,94	1,86	206,42
48 saat	RNA	3,04	7,59	3,77	2,03	2,5	291,12
Fasudil 2 mM	Örnek	230nm	260nm	280nm	260/280	260/230	Konsantrasyon
Kontrol	RNA	2,9	7,27	3,57	2,03	2,5	291,12
24 saat	RNA	3,29	7,4	3,7	1,99	2,24	296,01
48 saat	RNA	4,87	11,84	5,93	1,99	2,43	473,87

Kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 gen ifadelerinin ölçümünde referans olarak β -aktin geni kullanıldı, çalışma 2 tekrar olarak yapıldı ve sonuçlar çizelge 4.4'teki gibi elde edildi.

Çizelge 4.4. BxPC-3 Hücrelerinde Referans Gen β -aktin ve Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 Ekspresyonu.

	24 SAATLİK ÖLÇÜM				Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
KONTROL	BETA 1	11,61	CASP3 1	20,76	9,2	0	1
0,2 M	BETA 2	11,62	CASP3 2	21,33	9,7	0,56	0,68
2M	BETA 3	11,62	CASP3 3	20,84	9,2	0,07	0,95
	24 SAATLİK ÖLÇÜM						
KONTROL	BETA 1	11,3	CASP3 1	20,51	9,2	0	1
0,2 M	BETA 2	11,74	CASP3 2	20,92	9,2	-0,03	1,02
2M	BETA 3	11,8	CASP3 3	20,53	8,7	-0,5	1,39
	24 SAATLİK ÖLÇÜM						
KONTROL	BETA 1	11,61	CASP8 1	24,27	13	0	1
0,2 M	BETA 2	11,62	CASP8 2	24,81	13	0,53	0,69
2M	BETA 3	11,62	CASP8 3	24,49	13	0,21	0,86
	24 SAATLİK ÖLÇÜM						
KONTROL	BETA 1	11,3	CASP8 1	23,83	13	0	1
0,2 M	BETA 2	11,74	CASP8 2	24,66	13	0,39	0,76
2M	BETA 3	11,8	CASP8 3	24,48	13	0,15	0,9
	24 SAATLİK ÖLÇÜM						
KONTROL	BETA 1	11,61	CASP9 1	21,36	9,8	0	1
0,2 M	BETA 2	11,62	CASP9 2	21,53	9,9	0,16	0,9
2M	BETA 3	11,62	CASP9 3	20,9	9,3	-0,5	1,39
	24 SAATLİK ÖLÇÜM						
KONTROL	BETA 1	11,3	CASP9 1	21,57	10	0	1
0,2 M	BETA 2	11,74	CASP9 2	21,4	9,7	-0,6	1,53
2M	BETA 3	11,8	CASP9 3	20,94	9,1	-1,1	2,19

Çizelge4.4.'ün Devamı.

48 SAATLİK ÖLÇÜM				Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
BETA 4	11,54	CASP3 4	21,31	9,8	0	1
BETA 5	11,73	CASP3 5	21,42	9,7	-0,08	1,06
BETA 6	12,58	CASP3 6	21,56	9	-0,79	1,73
48 SAATLİK ÖLÇÜM						
BETA 4	11,57	CASP3 4	20,99	9,4	0	1
BETA 5	11,61	CASP3 5	20,95	9,3	-0,08	1,06
BETA 6	12,31	CASP3 6	21,74	9,4	0,01	0,99
48 SAATLİK ÖLÇÜM						
BETA 4	11,54	CASP8 4	24,32	13	0	1
BETA 5	11,73	CASP8 5	24,5	13	-0,01	1,01
BETA 6	12,58	CASP8 6	25,41	13	0,05	0,97
48 SAATLİK ÖLÇÜM						
BETA 4	11,57	CASP8 4	24,53	13	0	1
BETA 5	11,61	CASP8 5	24,36	13	-0,21	1,16
BETA 6	12,31	CASP8 6	25,36	13	0,09	0,94
48 SAATLİK ÖLÇÜM						
BETA 4	11,54	CASP9 4	20,94	9,4	0	1
BETA 5	11,73	CASP9 5	21,29	9,6	0,16	0,9
BETA 6	12,58	CASP9 6	22,42	9,8	0,44	0,74
48 SAATLİK ÖLÇÜM						
BETA 4	11,57	CASP9 4	20,8	9,2	0	1
BETA 5	11,61	CASP9 5	20,83	9,2	-0,01	1,01
BETA 6	12,31	CASP9 6	21,88	9,6	0,34	0,79

Çizelge 4.5. Kaspaz-3, -8, -9 Genlerinin 24 ve 48 Saatlik Ekspresyon Sonuçlarının Ortalaması.

	ORTALAMA	SD	ORTALAMA	SD
CAS-3	24 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	48 SAAT
	0,849657	±0,169657	1,057018	±0,00298
	1,173691	±0,223691	1,361083	±0,36892
CAS-8	24 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	48 SAAT
	0,727842	±0,037842	1,081822	±0,07182
	0,882894	±0,022894	0,95273	±0,05727
CAS-9	24 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	48 SAAT
	1,210642	±0,310642	0,95099	±0,05099
	1,786848	±0,396848	0,763588	±0,02641

48 saat 2 M'lık fasudil maruziyetinde kontrole göre Kaspaz-3'te yaklaşık 1,5 kat artış, Kaspaz-9'da 24 saat ve 0,2 M'lık maruziyette yaklaşık 1,5 kat, 2 M'lık maruziyette yaklaşık 2 kat artış gözlemlenirken, Kaspaz-8 de anlamlı bir artış ya da azalış gözlemlenememiştir. Bu sonuç, Fasudil'in pankreas adenokarsinom hücrelerinde apoptozu iç yolak üzerinden aktive ettiğini düşündürmektedir.

Takabe ve ark. göre, Fasudilin apoptotik etkisi iç yolak üzerinden kaspaz-9 ve kaspaz-3 aracılığı ile gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Fasudil'in p53, Bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9 yolağı üzerinden apoptozu indüklediği bilinmektedir [Takeba vd, 2012]. Bcl-2'nin temel görevi hücreyi hayatta kalmaya teşvik etmek ve sitoplazmada bulunan Bax'ın apoptozunu engellemektir. Bax'ın ekspresyonu yüksek olduğu zaman sitoplazmadan mitokondrial membrana ilerleyerek Bcl-2 ile birleşmektedir.. Bcl-2 inaktif olduğunda mitokondrial zarın geçirgenliği değişir ve bu da mitokondrial hasara neden olur ve apoptoz artar. Fasudil, Bcl-2 ekspresyonunu arttırırken, Bax ekspresyon seviyesini azaltarak apoptoz mekanizmasında görev almaktadır [Tan vd, 2013]

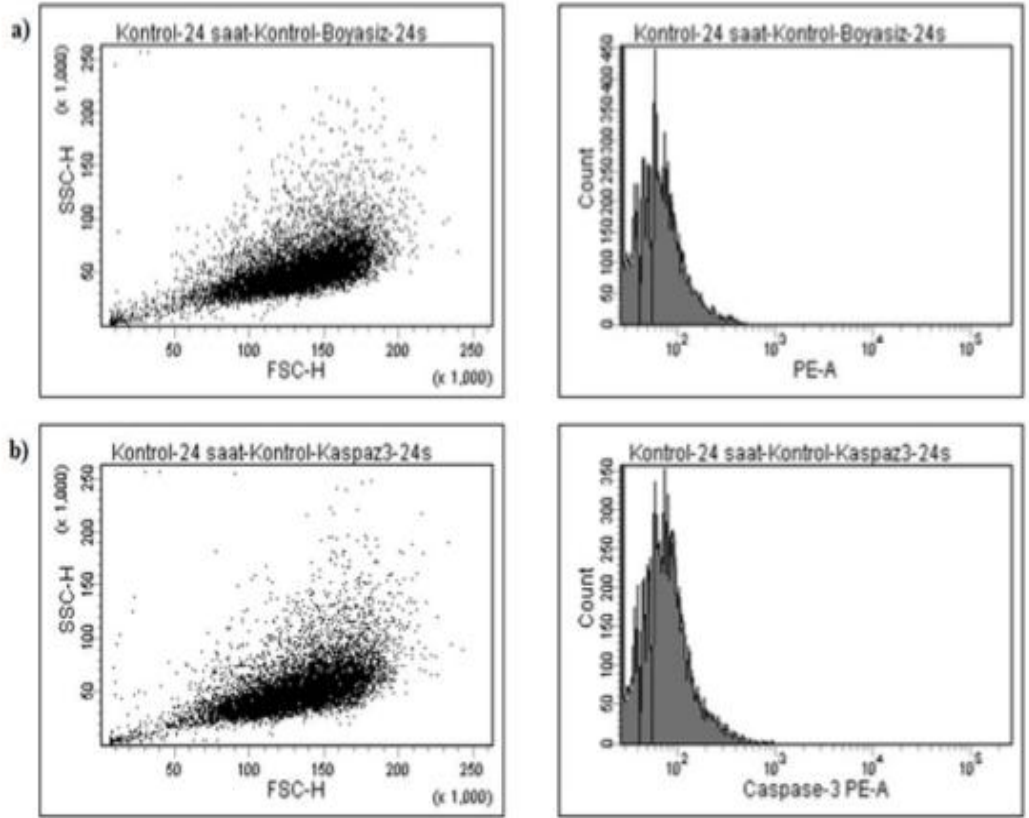
Diğer bir çalışmada, Rho Kinaz inhibitörü Fasudil apolipoprotein-E'de abdominal aortik anorizmi indükleyen anjiyotensin-II'nin yetersiz olduğu farelerde apoptozu ve proteolizi engelleyerek anjiyotensin II'nin etkisini azalttığı bulunmuştur [Wang vd, 2005].

Yin limei ve ark. tarafından yapılan çalışmada da fasudilin VEGF'yi engelleyerek anjiyogenezi indüklediği ve fasudil ve hidroksifasudilin kaspaz-3 yolağını etkilediği gösterilmiştir [Yin,2007].

Kaspaz -3, -8, -9 gen ifadeleri dışında yine apoptoz mekanizmasında yer alan kaspaz-6, kaspaz-7, kaspaz-2 ve kaspaz-10 gen ifadelerinin de incelenerek sürece ne gibi bir etkisinin olduğu anlaşılmalı çalışılmalıdır.

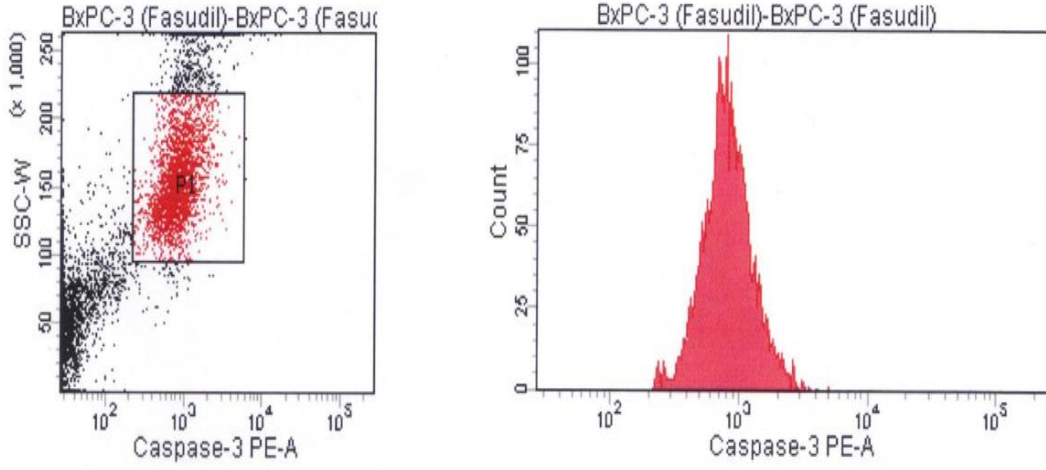
4.5. PE AKTİF KASPAZ-3 TESTİ İLE APOPTOZUN GÖSTERİLMESİ

PE Aktif Kaspaz-3 testi ile protein düzeyinde Aktif Kaspaz-3'ün gösterilmesi akım sitometri yöntemiyle gerçekleştirildi. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 48 saat uygulanan 2mM doz Fasudil ile BxPC-3 pankreas adenokarsinom hücrelerinde Kaspaz-3'ün aktif olduğu tespit edildi.



Şekil 4.5. Kontrol grubu BxPC-3 hücrelerinde Kaspaz-3 düzeyi.

- 24 saatlik boyanmamış hücre grubunun kontrol alındığı düzenektir.
- 24 saatlik kaspaz-3 taranan kontrol grubudur. Her iki grupta aktif olarak kaspaz-3 varlığının olmadığı görülmektedir.



Tube: BxPC-3 (Fasudil)

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P2	0	0.0	0.0
P1	2,510	25.1	25.1

Şekil.4.6. Doz ve zaman bağımlı 2mM / 48 saat Fasudil uygulanan BxPC-3 hücrelerinin Kaspaz-3 düzeyi %25.1 olarak ölçülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Rho kinaz inhibitörlerinden Fasudilin sitotoksisite, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 gen ifadeleri üzerinden apoptozla ilişkisi ve metastaz üzerindeki etkisi anlaşılmasına çalışılmıştır.

Bu çalışma ile;

- 1) xCELLİgence DP sisteminde sitotoksisite deneylerinde BxPC-3 hücre hattı için uygun olan hücre sayısı 12500 ve ilaç uygulama saati 25 saat olarak belirlenmiştir.
- 2) Fasudil 10mM, 2mM, 0,2mM ve 0,02 mM'lık doz uygulamalarında IC₅₀ Değeri $7,2835 \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiştir.
- 3)) xCELLİgence DP sisteminde CIM Plate-16 ile yapılan migrasyon deneyinde hücrelerin migrasyon yapmadığı görüldü. Migrasyon deneyi kemoatraktan bir ajan ile uzun saat aralıklarında gözlemlenerek tekrarlanmalıdır.
- 4) Fasudil dozlarına bağlı olarak kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 gen ifadesi düzeylerine bakıldığında kaspaz-3'de ve Kaspaz-9'da 0,2 M ve 2 M konsantrasyonlarda 1,5 kat ve üzeri artış tespit edilmiştir.
- 5) PE Aktif Kaspaz-3 testinde kontrol grubunda Aktif Kaspaz-3 gözlenmezken ilaç uygulaması yapılmış olan hücrelerde Kaspaz-3 aktivitesi gözlemlenmiştir.

Fasudil'in kaspaz-6, kaspaz-7, kaspaz-10 ve kaspaz-2 genleri üzerindeki etkisine de ek olarak bakılmalı, migrasyon için kemoatraktan bir ajan ile 48 saatin üzerindeki zaman aralıklarında test edilmeli veya por genişliği daha büyük olan bir plate ile migrasyon çalışılarak hücrelerin metastatik özelliğinin olup olmadığı netliğe kavuşturulmalıdır. Ayrıca Kaspaz -3, -8, -9 gen aktivitelerine daha kısa zaman aralıkların da (6. ve 12. Saatler) fasudilin farklı dozları da kullanılarak bakılmalı ve çalışma in-vivo aşamada devam ettirilmelidir.



KAYNAKLAR

Ahmet Dobrucalı. <http://www.ahmetdobrucali.com/hastaliklar/pankreas-kanseri/>, 01.06.2015.

Bosso D, Panozzo MP, Fabris C, et al. Does surum CAR-3 play a role in pancreatic cancer diagnosis *Oncology* 1991; 48:22-5.

Bouvet Michael, Wang Jinwei , Nardin Stephanie R., Nassirpour Rounak, Yang Meng, Baranov Eugene, Jiang Ping, Moossa A. R., and Hoffman Robert M.. “Real-Time Optical Imaging of Primary Tumor Growth and Multiple Metastatic Events in a Pancreatic Cancer Orthotopic Model” *Cancer Research* 62, 1534–1540, 2002.

Bünger S., Barow M., Thorns C., Freitag-Wolf S., Danner S., Tiede S., Pries R., Görg S., Bruch H-P., Roblic U.J., Kruse C., Herman JK. “Pancreatic Carcinoma Cell Lines Reflect Frequency and Variability of Cancer Stem Cell Markers in Clinical Tissue” *Eur Surg Res* 2012; 49: 88–98.

Chen J., Baihun SI., morfological study of 391 cases of exocrine pancreatic tumors with Special referance to the classification of exocrine pancreatic carsinoma.” *J. Pathol* 1985; 146: 17-29.

Chung YS, Ho JL, Kim YS, Tanaka H, Nakata B, el al.” The detection of human pancreatic cancer-associated antigen in the serum of cancer patients.” *Cancer* 1987; 60: 1636-43.

CIM- Plate 16. http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=182. 01.06.2015

Cubilia AL.,Fitzgerald PJ., “Cancer of the endocrin pancreas. The pathologic aspects.” *Cancer* 1985; 35: 2-18.

Danial NN., Korsmeyer SJ.” Cell death: critical control points.” Cell 2004;116:205-219.

De Almagro M.C, Vucic. D. “The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical Regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy.”
De partment of Early Discovery Biochemistry, Genentech, Inc.,
South San Francisco, CA, 94080, USA. Exp Oncol 2012 34, 3, 200–211

Demaurex N., Distelhorst C.: Apoptosis-the calcium connection. Science 300: 65, 2003.

Doggrell SA (2005). "Rho-kinase inhibitors show promise in pulmonary hypertension." Expert Opin Investig Drugs 14 (9): 1157–115.

Elmore S., Apoptosis: a review of programmed cell death.-Toxicol Pathol 2007; 35(4): 495- 516.

Ellen BG. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. Surg Clinics of North America, 75: 819-841, 1995.

E-Plate 16. http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=179. 01.06.2015.

Essen Bioscience http://www.essenbioscience.com/media/uploads/files/Invasion_Exemplar_Report.pdf

Fadeel B., Orrenius S.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. J Internal Med 258: 479-517; 2005.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., ' F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide; IARC Cancer Base No. 11 ' International Agency for Research on Cancer <http://globocan.iarc.fr> (2012)

Hahmann C, Schroeter T (2010). "Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity". *Cell Mol Life Sci* 67 (2): 171–7.

Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, et al." Sensitive serum markers for detecting pancreatic cancer." *Cancer* 1988; 61: 1827-31.

Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S, "The small GTPbinding protein Rho binds to and activates a 160 kDaSer/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase." *EMBO J* 1996; 15: 1885-93.

Jaatela M., Escaping cell death, survival proteins in cancer. *Exp. Cell Research*, 248 (1), 30-43, 1999.

Kerr J.F.R., Shrinkage Necrosis. A distinct modal of cell death. *Journal of Pathology*, 105,13, 1971.

Kerr J.F.R., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26,239-257, 1972.

Kirsi Riento and Ridley Anne J.. "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 446-456 (June 2003)
doi:10.1038/nrm1128

- Kwan Man, T.P. Kevin, Xu Aimin, Cheng Qiao, Mau Lo Chung, Wei Xiao Jiang, Shun Sun Bai, X.H. Lim Zophia, Cheung Jerry S. , Wu Ed X. , Sun Chris K.W. , Poon Ronnie T.P. and Tat Fan Sheung . “Suppression of Liver Tumor Growth and Metastasis by Adiponectin in Nude Mice through Inhibition of Tumor Angiogenesis and Downregulation of Rho Kinase/IFN-Inducible Protein 10/Matrix Metalloproteinase 9 Signaling.” Clin Cancer Res 2009 ; 16(3); 967–77
- Leung T, Manser E, Tan L, Lim L, “A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocated the kinas to peripheral membranes.” J Biol Chem 1995;270:29051-4.
- Lijuan Tan, Nana Pan, Lingfan Yu, Renchao Yu, Bin Yang.” The effect of fasudil at different doses on acute myocardial infarction in rats.” Acta Cardiol sin;2013;29:524-530.
- Liu S, Goldstein Robert H. , Scepansky Ellen M. , Rosenblatt Michael. “Inhibition of Rho Associated Kinase Signaling Prevents Breast Cancer Metastasis to Human Bone” Cancer Res 2009;69(22):8742–51.
- Löhn M, Plettenburg O., Ivashchenko Y., Kannt A., Hofmeister A., Kadereit D., Scafer M., Linz W., Kohlman M., Herbert JM., Janiak P., O’Connor SE., Ruetten H. Pharmacological characterization of SAR407899, a novel rho-kinase inhibitor.’Hypertension 2009;54(3);676-83.
- Metzgar RS, Rodriguez N, Finn OJ, et al.” Detection of a pancreatic cancer-associated antigen (Dupan-2 antigen) in serum and ascites of patients with adenocarcinoma.” Proc Natl Acad Sci 1984; 81: 5242-46.
- Mills JC., Stone NL., Pittman RN. “Extranuclear apoptosis: The role of the Cytoplasm in the Execution Phase.” J Cell Biol. 1999;146:703-7.

- Mueler BK., Mack H., Teusch N. ‘Rho-kinase a promising drug target for neurological disorders.Nat. Rev.Drug Discov. 2005;4;387-398.
- Mutsuki Amano, Kazuyasu Chihara, Nao Nakamura, Takako Kaneko, Yoshiharu Matsuura and Kozo Kaibuchi.” The COOH Terminus of Rho-kinase negatively regulates Rho kinase activity.” J Biol Chem 1999 Nov 5;274(45):32418-24.
- Ow Y-L P., Green R.D., Hao Z., Mak T.W.: Cytochrome c: functions beyond respiration. Nature Reviews Molecular Cell Biology Vol 9 :532-542 July; 2008.
- Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. J Cell Mol Med 2004; 8, 432-44.
- Pfaffle M. “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR” Nucleic Acids Research, 2001, Vol. 29, No 9.
- Rosai J. “ Ackerman’s surgical pathology 8th ed.” St. Luis, 1997: 975-999.
- Sarı A.Nihal, Fırat Seyhan Şahan, Tunçtan Bahar. Mersin Üniversitesi sağlık Bilim Dergisi3(2);2010.
- Safi F, Ruscher R, Beger HG. “The clinical relevance of the tumor marker CA 19-9 in the diagnosing and monitoring of pancreatic carcinoma.” Bull Cancer 1990; 77:83-91.
- Sedex XS Smart Slides. [Http://www.bidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Customer-Specific-Slides/Custom-Specific-Flow-Slides-and-Channels](http://www.bidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Customer-Specific-Slides/Custom-Specific-Flow-Slides-and-Channels). 01.06.2015

Shi Jianjian and Wei Lei. Rho kinase in the regulation of cell death and survival.

Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2007; 55(2): 61–75. doi: 10.1007/s00005-007-0009-7.

Shi J, Wu Xiangbing, Surma Michelle, Vemula Sasidhar, Zhang Lumin, Yang Yu, Kapur Reuben and Wei Lei. “Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. “ Cell Death and Disease (2013) 4, e483; doi:10.1038/cddis.2013.10 & 2013 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/13.

Shibuya M, Suzuki Y, "Treatment of cerebral vasospasm by a protein kinase inhibitor AT 877". *No to Shinkei* (in Japanese)1993; 45 (9): 819–24.

Sing SM, Longmire WP, Reber HA.” Surgical palliation for pancreatic cancer: The UCLA experience.” *Ann Surg* 1990; 212:132-39.

Somlyoa Avril V., Bradshawb Dawn, Ramosa Susan, Murphyb Cheryl, Myersb Charles E., Somlyo Andrew P.. “Rho-Kinase Inhibitor Retards Migration and in Vivo Dissemination of Human Prostate Cancer Cells” *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 269, Issue 3, 24 March 2000, Pages 652–659.

Spierings D.C., de Vries E.G., Vellenga E. “ Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52(6): 821-831; 2004.

Stahle, M., Veit, C., Bachfischer, U., K., Skripczynski, B., Hall, A., Gierschik, P., Giehl, K., “Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK.” *J CELL Sci.*, 116, 3835-3846, (2003).

Suda T. Nagata S.: Purification and characterisation of the Fasligand that Induces Apoptosis J. Exp. Med. 179: 873-879, (1994).

Suemizu H., Hamada Kenji., Makoto Monnai, Kenji Kawai, Chiyoko Nishime, Chika Kito, Noriyuki Miyazaki, Yasuyuki Ohnishi, Masato Nakamura. "Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD/Shi-scid IL2R γ null (NOG) mice" INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 32: 153-159, 2008.

Van Aelet Linda and D'Souza-Schorey Crislyn," Rho GTPases and signal network." Genes Dev. 1997 11: 2295-2322

Venkatesh S., Ordonez NG., Ajani J. "islet cell carcinoma of the pancreas. A study of the 98 patients." Cancer 1990: 65: 354-357.

Yang Z., Zahn .Y., Wang S., Shi W. "Effect of Fasudil on growth, adhesion, invasion and migration of 95D lung carcinoma cells in vitro." Can J. Phsiol Pharmacol 2010;88(9):874-9.

Yehielly F. ve Deiss L.P., Apoptosis and cancer, Basic Science of Cancer (Ed. Kruh, G.D. ve Tew K.D.)'da Chapter 11, Current Medicine inc, Philadelpphia, 2000.

Yin Limei, Morishige Kenichirou, Takahashi Toshifumi." Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor induced angiogenesis in vitro and in-vivo". Mol Cancer Ther 2007;6:1517-1525

Ying Han, Biroc Sandra L., Li Wei-wei, Aliche Bruno, Xuan Jian-Ai, Pagila Rene, Ohashi Yasuhiro, Okada Toshiya, Kamata Yoichi and Dinte Harald. "The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models." Mol Cancer Ther September 2006; 2158.

Yuko Takeba, Naoki Matsumoto, Minoru Watanabe, Sachiko Takenoshita-Nakaya, Yuki Ohta, Toshio Kumai, Masayuki Takagi, Satoshi Koizumi, Takeshi Asakura, Takehito Otsubo.” The Rho kinase inhibitor fasudil is involved in P53- mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells” *Cancer chemotherapy and pharmacology* June 2012; volume 69, issue 6, pp 1545-1555.

Wang Yi-Xin, McNulty Baby Martin, da Cunha Valdeci, Vincelette Jon, Lu Xiangru , Feng Qingping, Halks-Miller Meredith, Mahmoudi Mithra, Schroeder Miriam, Subramanyam Babu, Tseng Jih-Lie, Deng Gary D., Schirm Sabine, Johns Anthony, Kauser Katalin, Dole William P. and Light David R.. “Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, Attenuates Angiotensin II–Induced Abdominal Aortic Aneurysm in Apolipoprotein E–Deficient Mice by Inhibiting Apoptosis and Proteolysis” *Circulation*. 2005;111:2219-2226; originally published online April 25,2005;doi: 10.1161/01. CIR.0000163544 .17221. BE.

xCelligence DP System. [Http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=184](http://www.aceabio.com/product_info.aspx?id=184)
01.06.2015.

Xi B., Yu Naichen, Wang Xiaobo, Xu Xiao and Abassi Yama. “The application of cell-based label-free technology in drug discovery.” *Biotechnol J*. 3:484-495.

Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J.C.: Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115 (10): 2656; 2005.

Zhou Qian , Gensch Christoph , Liao James K. “Rho-associated coiled-coil-forming kinase (ROCKs): potential target for the treatment of atherosclerosis and vascular disease.” Trends pharmacological science volume 32, issue 3, pages 125-180. March 2011.

Zhu Fang , Zhang Zhe , Wu Gang , Li Zhenyu , Zhang Ruiguang , Ren Jinghua , Li Nong.“Rho kinase inhibitor fasudil suppresses migration and invasion though down-regulating the expression of VEGF in lung cancer cell line A549.” Medical Oncology June 2011, Volume 28, Issue 2, pp 565-571.



ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: CANER KAPLAN

Doğum Tarihi: 29.03.1985

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	SAYISAL	HAZIM KULAK ANADOLU LİSESİ	1995-2003
Lisans	BİYOLOJİ	MERSİN ÜNİVERSİTESİ	2004-2010
Yüksek Lisans	FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSU BİYOLOJİ	MERSİN ÜNİVERSİTESİ	2010-2015

