

**PANKREAS KARSİNOMA (BxPC-3) HÜCRE
HATTINDA DOXORUBICIN'İN ANTİKANSER
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TURHAN YILMAZ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ-2014**

**PANKREAS KARSİNOMA (BxPC-3) HÜCRE
HATTINDA DOXORUBICIN'İN ANTİKANSER
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TURHAN YILMAZ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Yasemin KAÇAR**

**MERSİN
TEMMUZ – 2014**

Turhan YILMAZ tarafından Prof. Dr. Yasemin KAÇAR danışmanlığında hazırlanan “Pankreas Karsinoma (BxPC-3) Hücre Hattında Doxorubicin’in Antikanser Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Yasemin KAÇAR

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN

Yrd. Doç. Dr. Özlem İZCİ AY



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .16./07./2014 tarih ve .2014.16./487..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü



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

PANKREAS KARSİNOMA (BxPC-3) HÜCRE HATTINDA DOXORUBICIN'İN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Turhan YILMAZ

ÖZ

Bu çalışmada BxPC-3 pankreas karsinoma hücreleri kullanılarak topoizomeraz II inhibitörü olan Doxorubicin'in apoptotik etkisi araştırılmıştır. xCELLigence DP eş zamanlı hücre analizi cihazında yapılan hücre titrasyon deneyleri sonucunda sitotoksikite deneyleri için uygun hücre sayısının 12500, Doxorubicin uygulama saatinin ise 26-28. saatler arası olduğu belirlenmiştir. Doxorubicin (500µM, 50µM, 25µM, 5 µM, 0.5µM) uygulaması sonucu IC₅₀ değeri $8,64 \times 10^{-7} M$ olarak bulunmuştur. xCELLigence DP sisteminde gerçekleştirilen migrasyon deneyleri sonucunda BxPC-3 hücrelerinin besine duyarlı migrasyon göstermediği belirlenmiştir. Doxorubicin dozuna bağlı Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 gen ifadesi düzeylerinin niceliksel ölçümü 1 µM Doxorubicin uygulanarak 3., 6., 12., 24., ve 48. saatlerde qRT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna göre Kaspaz-3 için 6. saatte 4 kat, 12. saatte ise etkinin azalarak yaklaşık 2 kat olduğu, Kaspaz-8 için 6. saatte yaklaşık 9 kat, 12. saatte yaklaşık 5 kat fazla ifade edildiği görülürken, Kaspaz-9 ifadesinde ise anlamlı değişiklik gözlemlenmemiştir. Doxorubicin'in apoptotik etkisinin belirlenmesi için akım sitometride 24 saat Doxorubicin'e maruz bırakılan hücreler ile gerçekleştirilen, FITC AnnexinV testinde hücrelerin %18.5'nin geç apoptotik, %9.3'ünün ise erken apoptotik evrede olduğu belirlenmiştir. PE Aktif Kaspaz-3 testinde kontrol grubu ile ilaç uygulaması yapılan hücreler arasında anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. DNA hücre döngüsü analizi ile Doxorubicin'in anti-mitotik etkisi (G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarındaki) yüzde oranlarına göre tutuklanma durumları karşılaştırılmıştır. İlaç uygulaması yapılan hücrelerin %77.69'unun G1 fazında olduğu belirlenmiştir. Bunun sonucunda topoizomeraz II inhibitörü olan Doxorubicin'in, BxPC-3 hücrelerinde apoptotik etkisi gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: BxPC-3, Pankreas kanseri, Doxorubicin, Apoptoz, Akım sitometri.

Danışman: Prof. Dr. Yasemin KAÇAR, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

THE INVESTIGATION OF DOXORUBICIN'S ANTICANCER EFFETCS ON PANCREAS CARCINOMA (BxPC-3) CELL LINE

Turhan YILMAZ

ABSTRACT

In this study, apoptotic activity of topoisomerase II inhibitor Doxorubicin is used on pancreatic carcinoma cell line BxPC-3. Optimum cell unit per well is determined to be 12500 by xCELLigence DP system. Also Doxorubicin treatment period is determined to be 26-28 hours. The application of dose dependent Doxorubicin (500µM, 50µM, 25µM, 5µM, 0.5µM) results with IC₅₀ value of 8,64x10⁷M. According to migration assay using xCELLigence DP system, BxPC-3 cells have not shown FBS dependent migration. The level of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 gene were measured with Quantitative Real Time PCR at 3, 6, 12, 24, 48 hours. Caspase-3 gene expression level fold increase four times at 6th hours, 2 times at 12th hours comparing to control. Caspase-8 gene expression level fold increase nine times at 6th hours, five times at 12th hours comparing to control. Caspase-9 gene expression level was not observed significant difference. To designate the apoptotic activity of Doxorubicin AnnexinV FITC and Active Caspase-3 PE test are applied by using flow cytometry. The result of AnnexinV FITC test the cells were measured as 18.5% and 9.3% for late apoptosis and early apoptosis respectively. In the results of Active Caspase-3 PE assay was not demonstrated significant difference between control and drug treatment cells. The test of DNA cell cycle analysis used to compare the anti-mitotic effect percentages of cell cycle arrest at G₀/G₁, S, and G₂/M cycles. To the result of DNA cell cycle analysis, it has been shown that the cells were arrested at G₀/G₁ phase as measured 77.69%. As a result, Doxorubicin, a topoisomerase II inhibitor, showed to arrest the cell cycle at G₀/G₁ phase in pancreatic carcinoma cell line BxPC-3.

Key Words: BxPC-3, Pancreas carcinoma, Doxorubicin, Apoptosis, Flow Cytometer.

Advisor: Prof. Dr. Yasemin KAÇAR, Department of Biology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana sonsuz katkılar sağlayan, desteğini her zaman gösteren, beni bugünlere getiren değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'a,

Çalışmama bilgi ve tecrübeleriyle yön veren, yardımlarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e ve bu zorlu çalışma koşullarında gerek bilgisi gerekse çalışma ortamımızın kurulmasında büyük emekleri olan başta Prof. Dr. Ş. Nejat YILMAZ olmak üzere tüm MERKÖK ekibine,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, çalışmalarında bana yer vererek tecrübe kazanmamı sağlayan ve çalışmalarında bulunmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR'a,

Çok kısa süre içerisinde engin tecrübelerini bana aktaran, çalışmalarına yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Derya YETKİN'e,

Çalışmalarım boyunca benden yardımını esirgemeyen ve bu süreçte yanımda olan değerli arkadaşım Uzm. Bio. Gonca AY'a ve çalışmalarımın en son ve kritik dönemlerinde yardım isteğimi geri çevirmeyen dostum Bio. Özgün TARANCI'ya,

Tez sürem boyunca bana yardımcı olan başta Dr. Ender DİNÇER ve Uzm. Engin KAPLAN olmak üzere tüm MEİTAM (Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi) idari ve akademik personeline,

Eğitim hayatım boyunca her zaman arkamda olan ve her anlamda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli annem, babam ve kardeşime,

Son olarakta sonuçlanmayan deneylerin ve ortaya çıkan sorunların getirdiği sınırlı ve agresif haline katlanmak zorunda kalan değerli nişanım Melis Pırıl ÖZKÜÇÜK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP-FBE BB (TY) 2013-4 YL).

Bio. Turhan YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
EKLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. TÜRKİYE ve DÜNYADA KANSER İSTATİSTİKLERİ.....	3
2.2. PANKREAS KANSERİ ve ÖZELLİKLERİ.....	3
2.2.1. Pankreas Kanserinde Tanı.....	5
2.2.2. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri.....	6
2.3. BxPC-3 ve DİĞER PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARININ KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ	7
2.3.1. Adezyon Özelliği	8
2.3.2. Migrasyon ve İnvazyon Özelliği.....	8
2.3.3. Tümörijenite Özelliği.....	9
2.3.4. Genotipik Özellikleri.....	10
2.4. DOXORUBICIN'İN ÖZELLİKLERİ ve ETKİ MEKANİZMASI	11
2.4.1. Doxorubicin'in Yapısı ve İşlevi	11
2.5. APOPTOZ ve MEKANİZMALARI.....	14
2.5.1. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri.....	15
2.5.2. Doxorubicin'in Biyolojik Aktivitesi Apoptoz, Otofaji ve Nekroz.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. BxPC-3 PANKREAS KANSER HÜCRE HATTININ KÜLTÜRE ALINMASI	19
3.1.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi, Kültüre Alınması ve Pasaj İşlemi	19

3.1.2. Hücrelerin Sayılması.....	20
3.2. xCELLIGENCE SİSTEMİNDE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ DENEYLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	21
3.2.1. Hücre Titirasyon Deneyinin RTCA Software 1.2.1 Üzerinde Planlanması ve E-Plate Tasarımı	22
3.2.2. Hücre Titirasyonunun Belirlenmesi	22
3.2.3. BxPC-3 Hücre Hattına Doxorubicin Uygulaması ve Hücrelerin E-Plate 16'ya Yüklenmesi	24
3.2.4. xCELLigence DP Sisteminde Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri İçin CIM-Plate Uygulaması.....	25
3.3. KANTİTATİF RT-PCR YÖNTEMİYLE KASPAZ GENLERİNİN (3, 8, 9) İFADELERİNİN BELİRLENMESİ	26
3.3.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	26
3.3.2. Kantitatif RT-PCR'da Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 Gen İfadelerinin Ölçümü	28
3.4. AKİM SİTOMETRİ ile FITC ANNEXIN V TESTİ	29
3.5. AKİM SİTOMETRİ ile PE KASPAZ-3 TESTİ	30
3.6. AKİM SİTOMETRİ ile HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ	32
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	34
4.1. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA xCELLIGENCE DP SİSTEMİ İLE HÜCRE TİTRASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	34
4.2. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA DOXORUBICIN'E BAĞLI SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ.....	35
4.3. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA xCELLIGENCE DP SİSTEMİ ile MİGRASYONUN BELİRLENMESİ.....	37
4.4. DOXORUBICIN'İN KASPAZ GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ	38
4.5. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA DOXORUBICIN'E BAĞLI APOPTOZ SAFHALARININ AKİM SİTOMETRİDE BELİRLENMESİ	42
4.5.1. FITC Annexin V ile Apoptozun Belirlenmesi	42
4.5.2. PE Aktif Kaspaz-3 Testi ile Apoptozun Gösterilmesi	46
4.5.3. Hücre Döngüsü Analizi ile DNA Hasarının Gösterilmesi	47

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR	52
EKLER.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Ekzokrin pankreas kanserine bağlı 5 yıllık hayatta kalma oranı	6
Çizelge 2.2. Nöroendokrin tümörlerde cerrahi operasyon sonrası 5 yıllık hayatta kalma oranı.	6
Çizelge 2.3. Pankreas kanseri hücre hatları	7
Çizelge 2.4. Pankreas adenokarsinoma hücrelerinin tümörijenitesi	10
Çizelge 3.1. Hücre titrasyonu belirlemede kullanılan E-Plate 16 düzeni	23
Çizelge 3.2. Doxorubicin uygulaması için E-Plate 16 düzeni	24
Çizelge 3.3. Migrasyon deneyi için kullanılacak CIM-Plate 16 düzeni	26
Çizelge 3.4. cDNA sentez aşamasında kullanılan karışım-1 içeriği	27
Çizelge 3.5. cDNA sentez aşamasında kullanılan karışım-2 içeriği	28
Çizelge 3.6. cDNA sentez aşamasında kullanılan döngü ve süreleri	28
Çizelge 3.7. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 ifadelerin incelenmesinde kullanılan karışım	29
Çizelge 3.8. FITC AnnexinV Apoptoz testinde kullanılan kontrol ve örneklerin hazırlanması	30
Çizelge 4.1. E-Plate 16 kuyularına yüklenen hücre sayıları	34
Çizelge 4.2. E-Plate 16 kuyucuklarına yüklenen hücre sayısı ve uygulanan Doxorubicin dozları	35
Çizelge 4.3. BxPC-3 hücre hattı RNA izolasyon sonuçları	38
Çizelge 4.4. BxPC-3 hücrelerinde referans gen β -Aktin ve Kaspaz-3 ekspresyonu	39
Çizelge 4.5. BxPC-3 hücrelerinde referans gen β -Aktin ve Kaspaz-8 ekspresyonu	39
Çizelge 4.6. BxPC-3 hücrelerinde referans gen β -Aktin ve Kaspaz-9 ekspresyonu	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doxorubicin'in açık formülü ve DNA içerisine enterkalasyonu	12
Şekil 2.2. Anti-kanser ilacı olan Doxorubicin'in etki mekanizması	13
Şekil 2.3. İç ve dış apoptoz yolları	16
Şekil 3.1. Cedex XS hücre sayım cihazı ve cedex smart slides	21
Şekil 4.1. BxPC-3 hücre hattının hücre sayısı ve zamana bağlı proliferasyonu	34
Şekil 4.2. Doxorubicin'in BxPC-3 hücrelerinde proliferasyona etkisi	36
Şekil 4.3. RTCA Software 1.2.1'de hesaplanan BxPC-3 hücrelerinde Doxorubicin'e ait IC ₅₀ değeri.....	36
Şekil 4.4. BxPC-3 hücrelerinde migrasyonun gösterilmesi	37
Şekil 4.5. BxPC-3 hücrelerinde Doxorubicin'e bağlı Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 gen ifadeleri	40
Şekil 4.6. Kontrol grubu BxPC-3 hücreleri.....	42
Şekil 4.7. Kontrol grubu boyalı BxPC-3 hücreleri.....	43
Şekil 4.8. Doxorubicin maruz bırakılıp boyama yapılmayan BxPC-3 hücreleri	44
Şekil 4.9. Doxorubicin maruz bırakılıp boyama yapılan BxPC-3 hücreler	44
Şekil 4.10. Kontrol grubu ve ilaç uygulaması yapılan BxPC-3 hücrelerinde apoptozun gösterilmesi.....	45
Şekil 4.11. Kontrol grubu BxPC-3 hücrelerinde Kaspaz-3 düzeyleri.....	46
Şekil 4.12. Doxorubicin uygulaması yapılan BxPC-3 hücrelerinde Kaspaz-3 düzeyleri.....	47
Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait hücre döngüsü analiz sonuçları	48
Şekil 4.14. Doxorubicin uygulaması yapılan hücrelere ait hücre döngüsü analiz sonuçları.....	49

EKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
EK-1. Hücrelerin Çözülmesi	63
EK-2. Hücrelerin Subkültürü (Pasajlama)	64
EK-3. Hücrelerin Dondurulması	65
EK-4. Aktif Kaspaz-3 Boyama Protokolü	66
EK-5. FITC AnnexinV Boyama Protokolü.....	67
EK-6. CycleTest™ PLUS DNA Reagent Kit Protokolü	68
EK-7. DNA QC Particles Protokolü	70

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

AJCC: The American Joint Committee on Cancer

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CA 125: Cancer Antigen 125

CA 19-9: Cancer Antigen 19-9

CDKN2A: Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A

CEA: Carcinoembryonic Antigen

CREB3L1: CAMP Responsive Element Binding Protein 3-Like 1

DNA: Deoksribonükleik Asit

GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MR: Manyetik Rezonans Görüntüleme

PI: Propidium Iodide

RNA: Ribonükleik Asit

RTCA: Real Time Cell Analyzer

qRT-PCR: Quantative Real Time Polymerase Chain Reaction

SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4

TP53: Tumor Protein 53

1. GİRİŞ

Kanser, son yıllarda tüm dünyada artış gösteren bir hastalık olmakla beraber, dünya genelinde kansere bağlı ölüm kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre 2012 yılında dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir. [Ferlay vd., 2012].

GLOBOCAN 2012 verilerine göre dünyada bütün kanserler arasında pankreas kanseri görülme sıklığı %4.8 iken, bu vakaların %4.7'si ölüm ile sonuçlanmaktadır. Cinsiyete bağlı dağılım incelendiğinde ise, kadın bireylerde görülme sıklığı %4.6, ölüm oranı ise %4.5'tir. Erkek bireylerde görülme sıklığı %5 ve ölüm oranı ise %4.9'dur.

Türkiye'de bütün kanserler arasında pankreas kanseri görülme sıklığı %4.3, ölüm oranı ise %4.1'dir. Cinsiyete bağlı dağılım açısından kadınlarda pankreas kanseri görülme sıklığı %3.1 iken ölüm oranı %3'tür. Erkek bireylerde görülme sıklığı %5.4 ve ölüm oranı ise %5.2'dir [Ferlay vd., 2012].

Türkiye'de pankreas kanserine bağlı ölümler ise dünya üzerinde pankreas kanserine bağlı ölümün en fazla olduğu ikinci grupta yer almaktadır [Ferlay vd., 2012]. Bu istatistikler göz önüne alındığında kanserin ve özellikle pankreas kanserinin teşhisinin zor olmasına bağlı olarak, mortalite oranı oldukça yüksektir.

Kanserin görülme sıklığına ve mortalitesine bağlı olarak klinikte kullanılan birçok anti-kanser ilacının mekanizmaları tam anlaşılmadığı halde kullanılmaktadır. Doxorubicin, yaklaşık olarak 40 yıldır klinik kullanımda olan bir anti-kanser ilacıdır ancak apoptotik etkisi kanser hücrelerine ve doza bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Uyardığı apoptotik yollarda farklılıklar bulunması nedeniyle ilacın etki mekanizması aktif olarak araştırılmaktadır.

Topoizomeraz II inhibitörlerinden biri olan Doxorubicin; DNA hasarı, süper radikal oluşumu gibi sitotoksik ve apoptotik mekanizmalarla anti-kanser etkisi gösterdiği bilinmektedir. Yakın zamanda Doxorubicin'in anti tümör etkisi intermembran proteolizi mekanizmasıyla CREB3L1 (CAMP Responsive Element Binding) membran proteinin kırılmasıyla başlatılan apoptoz, lipid metabolizması ve viral enfeksiyon cevabı gibi çeşitli hücrel olaylarla gerçekleştiği bildirilmiştir.

Doxorubicin tedavisi meme, lösemi, akciğer, karaciğer, prostat, mide, tiroid, uterus ve lenfomalar gibi kanserlerde aktif olarak kullanılmaktadır. Pankreas kanseri tedavisinde çok sınırlı olarak kullanılmakta ve apoptozu uyarırken hangi yolları kullandığı konusunda halen araştırmaya gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca CREB3L1 membran proteininin BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkileri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır [Denard vd., 2011; Denard vd., 2012].

Bu çalışmada BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücre hattında Doxorubicin'in apoptotik etkisi; Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 niceliksel gen ifadesi ölçümü, FITC AnnexinV apoptoz belirleme testi ve DNA hücre döngüsü analizi ile anti-mitotik etki (G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarındaki) gösterilerek incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. TÜRKİYE ve DÜNYADA KANSER İSTATİSTİKLERİ

Kanser son yıllarda tüm dünyada artış gösteren bir hastalık olmakla beraber dünya genelinde kansere bağlı ölüm, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre 2012 yılında dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir. Kanser artış hızının bu şekilde devam etmesi durumunda, dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Gerek kanser vakalarının (%56,8) gerekse kanserden kaynaklanan ölümlerin (%64,9) yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu gösterilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bu artışın 3 temel sebebi ise; yaşlı nüfusta meydana gelen artış, tütün kullanımı ve obezite salgınıdır [Ferlay vd., 2012].

GLOBOCAN 2012 verilerine göre dünyada bütün kanserler arasında pankreas kanseri görülme sıklığı %4.8 iken bu vakaların %4.7'si ölüm ile sonuçlanmaktadır. Cinsiyete bağlı dağılım incelendiğinde, kadın bireylerde görülme sıklığı %4.6, ölüm oranı ise %4.5'tir. Erkek bireylerde görülme sıklığı %5 ve ölüm oranı ise %4.9'dur.

Türkiye'de bütün kanserler arasında pankreas kanseri görülme sıklığı %4.3, ölüm oranı ise %4.1'dir. Cinsiyete bağlı dağılım açısından kadınlarda pankreas kanseri görülme sıklığı %3.1 iken ölüm oranı %3'tür. Erkek bireylerde görülme sıklığı %5.4 ve ölüm oranı ise %5.2'dir [Ferlay vd., 2012].

2.2. PANKREAS KANSERİ ve ÖZELLİKLERİ

Bu istatistikler göz önüne alındığında hastalığın ciddiyeti ve erken tanının önemi açıkça görülmektedir. Pankreas kanseri görülme sıklığı düşük olmasına rağmen, erken tanı konamadığından ölüm oranı yüksek kanserler arasındadır.

Pankreas, iç ve dış salgı üreten karın boşluğunda 2-3. bel omurları hizasında yer alan, çeşitli organlarla ve bağ dokusu kapsülle çevrili ekzokrin ve endokrin çift bez yapıdadır. Pankreas iki farklı parankimal dokuya sahiptir. Birisi Langerhans adacıklarından oluşan islet adacıkları (endokrin) ve diğeri ise seröz asinar hücreler, sentroasinar hücrelerden oluşan asenilerdir (ekzokrin). Endokrin salgıları insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptiddir. Ekzokrin salgıları zimojenik granüller içerisinde salınan sindirim enzimleri olan proteazlar, amilaz, lipazlar ve nükleazlardır. [Freelove ve Walling, 2006]

Pankreas kanseri pankreasın başında, gövdesinde yada kuyruk kısmında olabilmektedir. Meydana gelen pankreas kanserlerinin %70-80 gibi ciddi bir kısmı pankreasın baş kısmındadır. Pankreas kanseri daha çok ekzokrin pankreasta görülmektedir. Bu ekzokrin pankreas kanserlerinin çoğu duktal adenokarsinomlardır ve ayrıntılı genetik profilleri bilinmektedir [Kloppel vd., 1996].

Oluşan duktal adenokarsinomların %96'sı KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) mutasyonları, 75%'i CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A) mutasyon/delesyonları, %55'i TP53 (Tumor Protein p53) mutasyonları, %50'si SMAD4 (Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4) delesyon/mutasyonları, %35'i SWI/SNF (SWItch/Sucrose NonFermentable) mutasyon ve delesyonları ile ilişkilidir [Shain vd., 2012; Jones vd., 2008]. Bu kanserler pankreas kanallarındaki hücrelerde başlamaktadır ve bu kanalların görevi pankreatik sindirim özsuğunu ana pankreas kanalına ve duodenuma taşımaktır. Ekzokrin pankreas tümörlerinin daha nadir görülen türleride bulunmaktadır. Bunlar; kistik tümörler ve asinar-sarkom hücre kanseridir.

Endokrin pankreas tümörleri, çok fazla yaygın olmamakla beraber, bu tümörlerin %95'inin iyi huylu olduğu bilinmektedir [Hochwald vd., 2002; Klimstra, 2007]. Ayrıca bu tümörlerin yaklaşık üçte birinin hormon üretmesi nedeniyle, nöroendokrin tümörler olarakta adlandırılmaktadırlar [Yao vd., 2007]. Buna ek olarak, hücrelerin ürettikleri hormon türüne göre isimlendirilmektedir. Bunlardan başlıcaları; gastrinoma, insülinoma, somatostatinoma, vazoaaktif intestinal peptid

üreten hücrelerde meydana gelen vipoma ve glukagonomadır. Pankreatik nöroendokrin tümörlerin yaklaşık 2/3'ü ise hormon üretmez ve işlevsiz tümörler olarak adlandırılırlar [Metz ve Jensen, 2008].

2.2.1. Pankreas Kanseri Tanı

Pankreas kanseri, sinsi belirtilerle ortaya çıktığı için, tanı konması oldukça zordur. Bazı hastaların pankreas kanserine yakalandığının erken evrelerde belirlenmesi, çeşitli şikayetlerle hekime başvurmaları ve hekimin şüphesi ile buna yönelik araştırmalar yapması sonucu ortaya çıkmaktadır.

Pankreas kanserine yakalanan hastalarda genellikle serum bilirubinleri, alkalin fosfataz, karaciğer transaminazları, CEA, CA 19-9 ve CA 125 gibi tümör belirteçlerinin yükseldiği bilinmektedir. Ayrıca idrarda bilirubin pozitifliği görülmektedir [Duffy vd., 2010; Carpelan-Holmström, 2002].

Laboratuvarda gerçekleştirilen tetkikler ile birlikte ilk başvurulacak inceleme yöntemleri sırasıyla; ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MR)'dir. [Wong ve Lu, 2008; Callery vd., 2009; Varadarajulu ve Wallace, 2004]. MR görüntüleme ise, aynı şekilde tümörün ayırıcı tanısında oldukça önemlidir. Bu yöntemler gerektiğinde ayrı ayrı, gerektiğinde ise birlikte kullanılarak hastaya uygulanacak tedavinin ve tümörün evrelemesinin doğru yapılmasını sağlamaktadır [Schima vd., 2002].

Pankreas kanseri ile ilgili AJCC (The American Joint Committee on Cancer)'nin belirlediği TNM evreleme sistemi bulunmaktadır. Bu evreleme sistemi ile pankreas kanser evreleri tanımlanmaktadır. TNM evreleme sisteminde 3 önemli nokta bulunmaktadır. T: Primer tümör ve/veya tümör büyüklüğü, N: Yakın lenf nodlarına yayılım, M: Diğer organlara metastazı ifade etmektedir.

TNM evreleme sisteminde yukarıda açıklanan harflerin yanına is, X ve 0-4 arası rakamlar getirilerek yayılma durumu ile ilgili daha açık bir bilgi sunulmaktadır. Bu bilgiler ışığında, evrelendirmeye göre pankreas kanseri en fazla 2A evresinde

yakalanmaktadır. 2A evresinden itibaren ise ileri derecede yayılma olduğu kabul edilmektedir [Jemal vd., 2004]. Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.'de evrelere göre hayatta kalma oranı verilmiştir.

Çizelge 2.1. Ekzokrin pankreas kanserine bağlı 5 yıl hayatta kalma oranı.

Evre	Gözlenen Hayatta Kalma (5 yıl)	Metastaz [Greene, 2002; Edge ve Compton, 2010]
Evre 1A	%14	Yok
Evre 1B	%12	Yok
Evre 2A	%7	Yok
Evre 2B	%5	Lenf nodlarına
Evre 3	%3	Kan damalarını ve major sinirlere
Evre 4	%1	Uzak doku ve organlara

Çizelge 2.2. Nöroendokrin tümörlerde cerrahi operasyon sonrası 5 yıl hayatta kalma oranı.

Evre	Gözlenen Hayatta Kalma (5 yıl)
Evre 1	%61
Evre 2	%52
Evre 3	%41
Evre 4	%15

2.2.2. Pankreas Kanserinde Risk Faktörleri

Pankreas kanserine etki ettiği düşünülen, çeşitli genetik ve çevresel faktörler araştırılmıştır. Bazı risk faktörlerinin varlığının, pankreas kanseri görülme sıklığını arttırdığı düşünülmektedir ve bu risk faktörleri üzerine çalışmalar devam etmektedir [Anderson vd., 2009]. Bunlar arasında tütün tüketimi, alkol tüketimi, diyabet, ailesel geçmiş, pankreatik inflamasyon ve obezite yer almaktadır [Boyle vd., 1996; Pericleous vd., 2014; Wang vd., 2003; Pannala vd., 2009; Klapman ve Malafa, 2008; McKay vd., 2008; Lowenfels vd., 1993; Bracci, 2012].

Henüz pankreas kanserine özgü belirteç genler tam olarak belirlenmemiştir. Bu nedenle, pankreas kanserinin genetik faktörlerinin araştırılmasına devam

edilmektedir. Pankreas kanserine yakalanan hastalardan çoğu, bu risk faktörlerini bulundurmamasıyla beraber sadece bu risk faktörlerinin hastalığı geliştirmede de bilinmektedir [Tramacere vd., 2010].

2.3. BxPC-3 ve DİĞER PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARININ KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

Pankreas kanseri ile ilgili moleküler bilgilerin toplanabilmesi ve tedaviye yönelik stratejilerin gelişmesi için, pankreas hücre hatları geliştirilmiştir. Donör hastalardan elde edilen bu hücre hatları genellikle birbirine göre farklı fenotipik ve genotipik özellikler taşımaktadır. Donör hastaların tamamı Kafkas kökenli ve yaşları 26-65 arasında değişmektedir [Deer vd., 2010].

Çizelge 2.3. Pankreas kanseri hücre hatları.

Hücre Hattı	Yaş	Cinsiyet	Köken*	Metastaz	Proliferasyon**	Farklılaşma
AsPC-1	62	Bayan	Ascites	Evet	38-40 saat	Zayıf
BxPC-3	61	Bayan	Primer Tümör	Hayır	48-60 saat	Ortaya yakın
Capan-1	40	Bay	Karaciğer Metastazı	Evet	- ***	İyi
Capan-2	56	Bay	Primer Tümör	Hayır	96 saat	İyi
CFPAC-1	26	Bay	Karaciğer Metastazı	Evet	31 saat	İyi
HPAC	64	Bayan	Primer Tümör	- ***	41 saat	Orta
HPAFII	44	Bay	Ascites	Evet	42 saat	İyi
Hs 766T	46	Bay	Lenf Nodu Metastazı	Evet	6-7 gün	- ***
MIA PaCa-2	65	Bay	Primer Tümör	- ***	40 saat	Zayıf
PANC-1	56	Bayan	Primer Tümör	Evet	52 saat	Zayıf
SU.86.86	57	Bayan	Karaciğer Metastazı	Evet	77 saat	Ortaya yakın

* Histolojik açıdan HS 766T ve MIA PaCa-2 hücre hatları karsinoma, diğer tüm hücre hatları adenokarsinoma olarak tanımlanmaktadır. **Hücre hattının katlanma süresi. ***Henüz tanımlanmamış.

2.3.1. Adezyon Özelliği

Pankreas kanserlerinin yüksek metastatik potansiyellerinin ortaya çıkmasında, hücre adezyonu ve tümörün büyümesi oldukça önemlidir. Hücrelerin yapışmasına hücre yüzey molekülleri ve hücre dışı matriks bileşenlerinin etkileşimi aracılık etmektedir. Pankreas kanserinde çalışmaların çoğu, sitokin veya anti kanser ilaçları ile yapışkan özelliklerinin değişmesi üzerine odaklanmıştır. Hücre yapışmasına aracılık eden ve çoğunlukla çalışılan ekstraselüler matriks elemanları; fibronektin, bazal membran ve bağ dokularında bulunan glikoproteinler, kollajen 1 ve 4, doku ve bazal membran stromaları, laminin [McIntyre vd., 1981] ve kollajenik olmayan ana glikoproteinler [Givant-Horwitz vd., 2004] çalışılmaktadır.

Yapılan çalışmalarda BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücre hatlarının tip 1 kollajene afinite gösterdiği görülmüştür [Greco vd., 2005; Arao vd., 2000; Sawai vd., 2001]. Laminin üzerine ekilen BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücre hatlarının PANC-1 ile eşit bağlanma gösterdiği ifade edilirken, farklı iki çalışmada BxPC-3'ün bağlanmaya daha istekli olduğu rapor edilmiştir [Greco vd., 2005; Arao vd., 2000; Lohr vd., 1996].

2.3.2. Migrasyon ve İnvazyon Özelliği

Hücre adezyonu, metastaz ve invazyon olaylarında anahtar görevi görmekle birlikte, hücre migrasyonu da pankreas kanserinin yayılmasında önemli bir role sahiptir [Marchesi vd., 2004]. Hastalığın erken safhalarında kanserin yayılması, tümör hücrelerinin kan damarlarına erişmek üzere periton boşluğuna göçü ile gerçekleşmektedir [Kleeff vd., 2000]. Hücre migrasyonu Boyden Chamber, Wound-Healing Assay, xCELLigence cihazında CIM-Plate 16 gibi deney düzenekleri ile kemotaksik bir ajana bağlı olarak izlenebilmektedir. Wound-Healing deneyi ile BxPC-3 hücrelerinin tabakalar halinde göç ettiği gözlemlenmiştir [Stahle vd., 2003].

İnvazyon malign hücrelerin benzersiz özelliğidir ve metastaza yol açan bir dizi olaylar serisinin anahtar adımıdır [Takada vd., 2002]. Pankreas kanser

hücrelerinin bir diğer önemli fenotipik özelliği ise invazif olmasıdır. Tanı koyulan hastaların neredeyse tamamında metastaz gerçekleşmektedir. Pankreas kanseri hastalarının %80'inde lokal lenf düğümlerine, peripankreatik dokulara metastaz olduğu görülmektedir [Farrel vd., 1997].

Migrasyon deneyleri ile hücre hareketi izlenirken, invazyon deneylerinde ise hücrelerin özel bir matrikse hareketi izlenmektedir. Çeşitli pankreas hücrelerinde gerçekleştirilen invazyon deneylerinde Capan-1 ve MIAPaCa-2'nin benzer invazif davranışlar gösterdiği rapor edilirken buna karşılık BxPC-3, MIAPaCa-2 ile karşılaştırıldığında BxPC-3'ün matrijel, kollajen ve lamininde daha invazif olduğu bildirilmiştir [Funahashi vd., 2003]. Farklı çalışmacılar ise BxPC-3 için matrijelde benzer sonuçlar elde etmiştir [Greco vd., 2005; Takada vd., 2002; Nio vd., 1997].

2.3.3. Tümörijenite Özelliği

Tümörijenite bir hücre hattının in vivo olarak tümör oluşturma yetenek veya eğilimini tanımlamaktadır. Tümör hacmi, tümör kütlesi, geliştirme yada büyütme frekansı tümörijenitenin nedenlerini tahmin etmek için kullanılır. Bu parametreler genellikle, pankreas kanser hücre süspansiyonunun bağışıklığı baskılanmış farelerin subkutan dokularına enjekte edildikten sonra tümör oluşumuna izin verdiğinde ölçülebilmektedir. Tümörün hacmi ve/veya ağırlığı ise otopsi sonrası ölçülebilmektedir [Nakamura vd., 2007] Bknz. Çizelge 2.4. Çalışmada seçilen BxPC-3 hücre hattı tümörijenite göstermektedir.

Çizelge 2.4. Pankreas adenokarsinoma hücrelerinin tümörijenitesi.

Enjekte Edilen Hücre Sayısı	Bağlı Etki (Tümör Hacmi, mm ³)	Zaman (Gün)	Referans
1x10 ⁶	BxPC-3 (~2000) > PANC-1 (~500)	54	[Aubert vd., 2003]
1x10 ⁶	PANC-1 (~570) > BxPC-3 (~155)	42	[Fukasawa ve Korc, 2004]
1x10 ⁶	BxPC-3 (~2000) > AsPC-1 (~1450) > PANC-1 (~750) > MIA PaCa-2 (~525)	21	[Miknyoczki vd., 1999]
3x10 ⁶	AsPC-1 (~2250) > HPAC (~1300)	24	[Tong vd., 2002]

(Tüm çalışmalarda fareler pankreas adenokarsinoma hücrelerini subkutan enjeksiyon yoluyla almıştır. Hücre hatları için rapor edilmiş tümör hacmi mm³ olarak parantez içerisinde verilmiştir [Deer vd., 2010].)

2.3.4. Genotipik Özellikleri

BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücrelerinde en çok rastlanan mutasyonlar KRAS, TP53, CDKN2A/p16 ve SMAD4/DPC4 mutasyonlarıdır. KRAS geninin protein ürünü normal doku sinyal iletiminde temel olarak görev almaktadır ve KRAS geninde meydana gelen mutasyonlar birçok kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Ras ailesinin diğer üyeleri gibi KRAS proteini bir GTPase'dir ve birçok sinyal yolağının başlatılmasında rol almaktadır. Bu proteinde meydana gelen mutasyonların sonucunda akciğer adenokarsinomu, müsinöz adenoma, kolorektal karsinom ve pankreasın duktal karsinomları meydana gelmektedir. TP53 (Tumor Protein 53) ise insanda TP53 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Çok hücreli organizmalarda hücre döngüsünün kontrolünü sağlayıp, tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle kanser meydana gelmesini önlemede önemli bir proteindir. p53 genomda meydana gelecek mutasyonları engellemeye çalışan bir protein olduğundan genom koruyucusu olarak adlandırılmaktadır. CDKN2A/p16 insan CDKN2A geni tarafından kodlanan tümör baskılayıcı proteindir. p16, hücrelerin G₁ fazından S fazına geçişini yavaşlatarak hücre döngüsünün düzenlenmesini sağlamakta önemli role sahiptir. Ayrıca CDKN2A/p16 geninin tümör hücrelerinde genellikle mutasyon/delesyonlara uğradığı bilinmektedir. SMAD4 geni tarafından kodlanan 552 aminoasitten oluşup SMAD4 proteini hücrel sinyal iletimine katılmaktadır. SMAD4 kanserlerde çoğunlukla mutasyona uğramıştır

ve TGF- β sinyal iletim yolağının düzenlenmesinde rol oynayarak tümör baskılayıcı olarak görev almaktadır. Ayrıca negatif olarak epitel hücrelerinin büyümesini ve hücre dışı matriksi düzenlemektedir. SMAD4 değişiklikleri multiploid kolorektal kanser ve pankreas kanserinde bulunmuştur. Ayrıca pankreas kanserlerinin %50'sinden fazlasında inaktif durumdadır [Sun vd., 2001; Loukopoulos vd., 2004].

2.4. DOXORUBICIN'İN ÖZELLİKLERİ ve ETKİ MEKANİZMASI

Klinik olarak kullanılan birçok anti-kanser ilacının etki mekanizmaları tam anlaşılmadığı halde kullanılmaktadır. Doxorubicin çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında lösemiler, nöroblastoma, yumuşak doku ve kemik sarkomları, göğüs, yumurtalık, tiroid, mesane, akciğer, lenfoma ve gastrik kanserler bulunmaktadır. Doxorubicin uzun süredir kullanımda olmakla birlikte kanser tipine, doza ve/veya liganda bağlı olarak etki gösterdiği apoptotik yollar bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle klinik kullanımda olmakla beraber, etki mekanizması aktif olarak çalışılmaktadır [Taylor vd., 2011].

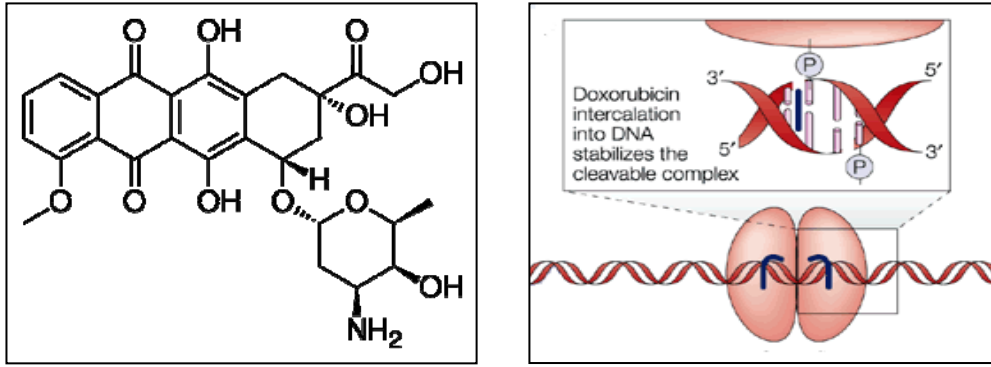
2.4.1. Doxorubicin'in Yapısı ve İşlevi

Doxorubicin kullanımda olan Streptomyces'lerden türetilmiş, antrasiklinler grubu bir antibiyotiktir. Doxorubicin ya da hidroksidaunorubisin (ticarî adıyla Adriamisin) kanser kemoterapisinde yaklaşık 40 yıldır kullanılan bir ilaçtır. Doğal bir ürün olan daunomisin ile yakından ilişkilidir [Minotti vd., 2004].

Doxorubicin ve onun ana metaboliti olan doxorubicinol plazma proteinlerine bağlanarak kanda taşınmaktadır. Doxorubicin hücre içerisine pasif difüzyon ile alınmaktadır. Hücre içerisinde 10 ila 500 kat arasında değişen oranlarda hücre içerisinde sitozolde birikmektedir. Çekirdek içi Doxorubicin konsantrasyonu 50 kat daha fazladır. Doxorubicin her beş baz çiftinde bir DNA ipliğine enterkale olmaktadır [Tacar vd., 2013].

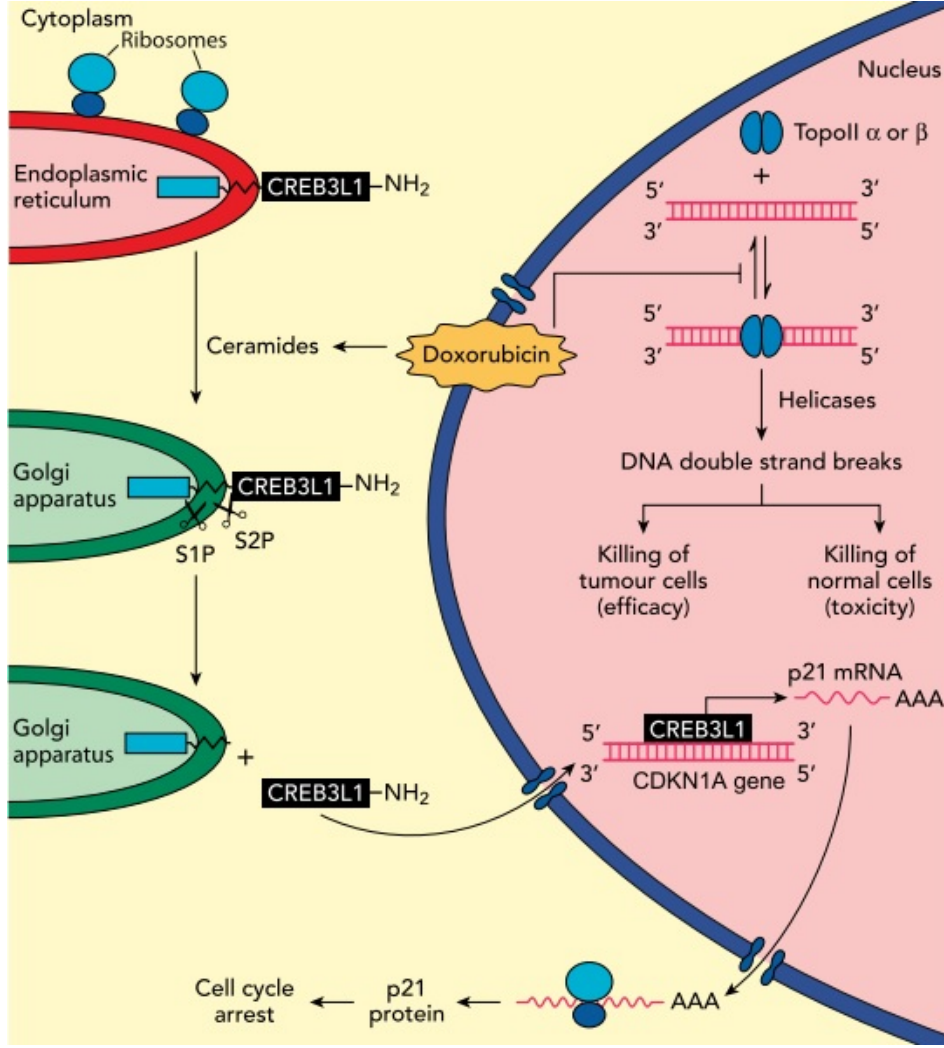
Antrasiklin grubu ilaçların anti-kanser etkisini nasıl gerçekleştirdiği ile ilgili birkaç mekanizma öne sürülmüştür. Bu ilaçların DNA enterkalasyonu yaptığı, topoizomeraz II inhibisyonuna neden olduğu ve serbest radikal üretimi yolu ile DNA hasarı oluşturdukları bulunmuştur [Gewirtz, 1999].

Doxorubicin diğer tüm antrasiklinler gibi DNA içine enterkalasyon yaparak DNA replikasyonunu engellemektedir [Gewirtz, 1999]. Aynı zamanda bir topoizomeraz II inhibitörü olan Doxorubicin DNA replikasyonu sırasında topoizomerazın DNA'yı kesmesinin ardından meydana gelen topoizomeraz-DNA kompleksini stabilize ederek, DNA çift sarmalının tekrar birleşmesini engeller ve DNA sentezini durdurur. Doxorubicin'in anti-kanser etkisi, replikasyonu durdurma ve DNA hasarı oluşturma olarak belirlenmiştir. Ancak etki mekanizması karmaşık olması nedeniyle araştırmalar sürmektedir (Bknz. Şekil 2.1.).



Kristal yapılarının analizinde görüldüğü üzere, molekülün düzlemsel kromofor kısmı DNA'daki iki baz çifti arasına enterkale olur, onun altı üyeli daunosamin şekeri DNA'nın küçük oyuğuna yerleşir ve enterkalasyon yerinin iki tarafındaki baz çiftleri ile etkileşir.

Yakın zamana kadar öne sürülen bu etki mekanizmalarından başka Denard ve arkadaşları tarafından intermembran proteolizi adlı yeni bir mekanizma tanımlanmıştır. Yeni mekanizma ile Doxorubicin'in seramid sentezine bağlı CREB3L1 adlı transkripsiyon faktörünün aktivasyonu yoluyla, p21 protein sentezini artırarak, hücre döngüsünü duraksamaya uğrattığı öne sürülmektedir [Denard vd., 2011; Denard vd., 2012].



Şekil 2.2. Anti-kanser ilacı olan Doxorubicin'in etki mekanizması [Denard vd., 2012]

Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi Doxorubicin'in latent transkripsiyon faktörü olan CREB3L1'in endoplazmik retikulumdan golgi aygıtına translokasyonuna öncülük eden hücre içerisindeki seramid (üst sol) üretimini arttırdığı ileri sürülmüştür [Denard vd., 2012]. Daha sonra iki proteaz (S1P ve S2P) CREB3L1 proteinini keser ve CREB3L1'in amino-terminal parçası CREB3L1'in transkripsiyon faktörü gibi etki ettiği nukleusa geç ederek CDKN1A lokusunu (orta sağ) ve ek genleri aktif hale getirir. Bu diğer proteinlerle birlikte p21 proteininin artan ifadesine neden olarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir. Denard ve arkadaşları Doxorubicin'i birçok hücre hattına uygulayarak ilacın seramid olarak adlandırılan ve CREB3L1'in ayrılmasını başlatan lipid moleküllerini arttırdığını göstermişlerdir. Bu

olayı takiben yine CREB3L1'in amino-terminal parçasının çekirdeğe translokasyonu ile bazı genlerin ekspresyonunu arttırdığı ve özellikle CREB3L1'in aşırı ekspresyonunun tümör hücrelerini Doxorubicin'e daha duyarlı hale getirdiği öne sürülmektedir [Denard vd., 2012].

Temel olarak öne sürülen yeni mekanizma, zara bağlı bir proteinin kırılması sonucu serbest kalan çözünür mesajcı molekül aracılığıyla çeşitli hücresel olayların başlatılmasını açıklamaktadır. Bu yolla başlatılabilecek olan hücresel olaylar arasında; apoptoz, lipid metabolizması ve viral enfeksiyon cevabı bulunmaktadır [Lal ve Caplan, 2011].

Diğer antrasiklinlerde olduğu gibi Doxorubicin'in kullanımı yüksek kalp hasarı riski oluşturmaktadır. Akut yan etkileri arasında mide bulantısı, kusma ve kalp düzensizliğine neden olan Doxorubicin bazı hastalarda el-ayak sendromu meydana getirebilmektedir ve bu nedenle kırmızı şeytan veya kırmızı ölüm takma adları ile anılmaktadır [Groopman, 2007].

2.5. APOPTOZ ve MEKANİZMALARI

Apoptoz; normal olarak gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak için bir homeostatik mekanizma olarak karşımıza çıkabileceği gibi, aynı zamanda hastalık ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde ya da immün reaksiyonlar gibi bir savunma mekanizması olarak da oluşabilir [Norbury ve Hickson, 2001].

Apoptoz, aşağıda belirtilen hücresel faaliyetlerde rol oynamaktadır:
Apoptoz normal hücre ölümü, normal gelişim, immün sistem fonksiyonu, hormon bağımlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal olarak uyarılmış hücre ölümüdür [Elmore, 2007].

Nekroz ise bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun ya da organın aktif olarak başka bir uyarı almadan geri dönüşümsüz şekilde hasar görmesi sonucu görülen patolojik ölümdür.

Hücrenin apoptoz veya nekroza gidip gitmeyeceği uyarıcı tipi ve/veya uyarıcı derecesi ile belirlenir. Sıcaklık, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar düşük dozlarda apoptozu indükleyebilir fakat bu benzer uyaranlar yüksek dozlarda nekroza neden olabilir. Sonuç olarak apoptoz, kaspazlar olarak adlandırılan bir grup sistein proteazların aktivasyonunu ve hücrelerdeki başlangıç uyarılarına bağlı, kompleks ve koordine edilmiş kaskat olaylarını kapsayan, çoğunlukla enerji bağımlı bir süreçtir [Elmore, 2007].

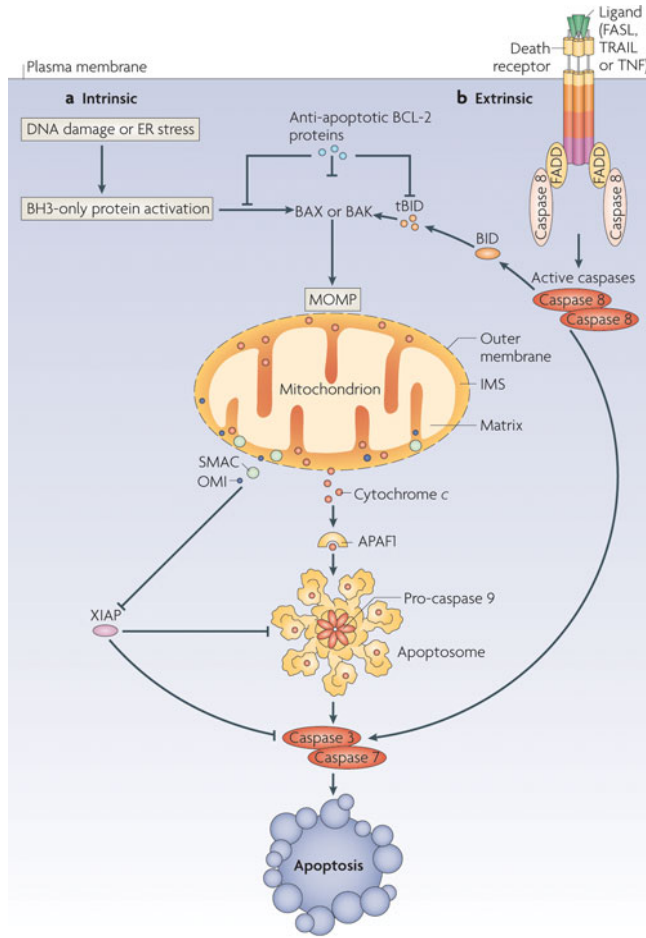
2.5.1. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri

Apoptotik hücrelerde önce hücre morfolojisinde bir değişim gözlenir. Daha sonra DNA fragmentasyonu ve protein çapraz bağlanması gibi olaylar gerçekleşir. Apoptoz sürecine giren hücredeki ilk değişim hücre membranındaki asimetri kaybı ile başlar. Bu asimetri kaybı zarın iç kısmındaki fosfatidilserinlerin dış zara geçmesidir. Bu değişim AnnexinV testi ile net bir şekilde gösterilebilmektedir. Apoptozun ileri safhalarında terminal kaspazların aktivasyonu sonucu, DNA parçalayıcı endonükleazların aktivasyonu ile gerçekleşmektedir [Tacar vd., 2013].

Apoptoz süresince kaspaz aktivasyonunda; dış (ekstrasellüler) tetikleyiciyi takip eden ölüm reseptörünün çapraz bağlanması ve iç (intraseellüler) sinyalleri takip eden mitokondriden apoptojenik faktörlerin serbest bırakılması ile endoplazmik retikulum stres-indüklenmiş apoptoz ve kaspaz-bağımsız apoptoz önemli yollardır [Vermeulen vd., 2005] (Bknz. Şekil 2.3.).

Apoptoz süresince kaspazlar önemli yer tutmaktadır. Kaspazlar, birçok hücrede inaktif proenzim formunda yaygın bir şekilde bulunur ve bir kez aktive olduklarında bir proteaz kaskatının başlamasına izin veren diğer prokaspazları aktive edebilirler. Bir kaspazın diğer kaspazı aktive edebildiği bu proteolitik kaskat,

apoptotik sinyal yolunu arttırır ve böylece hızlı hücre ölümüne neden olur. Farklı kaspazlar komşu aminoasitin tanınmasında farklı spesifiteye sahip olmasına rağmen, bunlar proteolitik aktiviteye sahiptirler ve proteinleri aspartik asit birimlerine parçalayabilirler. Kaspazlar aktive olduklarında hücre ölümüne karşı geri dönüşümsüz bir zorunluluk ortaya çıkar. Tanımlanmış olan 10 büyük kaspaz; başlatıcılar (kaspaz- 2,-8,-9,-10), efektörler ya da karar vericiler (kaspaz-3,-6,-7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,-4,-5) olarak kategorize edilmiştir [Cohen, 1997; Rai vd., 2005]. Kaspaz 11'i de içeren diğer tanımlanmış kaspazların apoptoz düzenleyicisi ve septik şok süresince sitokin olgunlaştırıcı olarak, kaspaz- 12'nin endoplazmik spesifik apoptozis ve amyloid- β tarafından sitotoksitate aracısı, kaspaz- 13'ün bir bovin gen olduğu ve kaspaz-14'ün embriyonik dokularda oldukça yüksek düzeyde eksprese olduğu fakat erişkin dokularda ifade edilmediği belirtilmiştir [Hu vd., 1998; Kang vd., 2002].



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Şekil 2.3. İç ve dış apoptoz yolları [Tait ve Green, 2010].

Ca⁺² ve Mg⁺² bağımlı endonükleazlar DNA'yı 180-200 baz çiftlik DNA fragmanlarına parçalar, bu parçalar ultraviyole ışığı altında agaroz jel elektroforezi ile görüntülenebilir [Bortner vd., 1995].

Başka bir biyokimyasal özellik ise komşu dokuları minimal tehlikeye atan, hızlı fagositoze izin veren, komşu hücreler tarafından apoptotik hücrelerin fagositik olarak tanınmasına yol açan ve hücre lipid tabakasının fosfatidilserin ile normal olarak karşı karşıya gelme hareketi ile başarılı hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonudur [Bratton vd., 1997].

2.5.2. Doxorubicin'in Biyolojik Aktivitesi Apoptoz, Otofaji ve Nekroz

Doxorubicin DNA'yla ilişkili enzimlere bağlanabildiği DNA baz çiftleri arasına enterkale olduğu ve çok çeşitli moleküllerle etkileşerek sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. Birçok moleküler sinyalin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Bunlar arasında AMPK (AMP Activated Protein Kinase Inducing Apoptosis) yolağını aktifleştirerek, AMPK yolağı üzerinden Bcl-2/Bax apoptoz yolağıyla farklı kaspazlar aracılığıyla programlı hücre ölümünü başlatır. Doxorubicin sağlıklı dokularda da apoptoz ve nekroz uyurabilme kapasitesine sahiptir [Tacar vd., 2013].

Doxorubicin topoizomerez I ve II ile etkileşime girebilmekte; bunun sonucunda hücre bölünmesi engellenmekte ve DNA hasarı meydana gelmektedir. Kırılan DNA ipliklerinin tamir edilememesi apoptotik yolları tetiklemektedir. Ayrıca hücre döngüsünün G₁ ve G₂ fazlarındaki duraklama da apoptozu uyarmaktadır. Doxorubicin'in baz çiftleri arasına enterkale olması hem DNA hem RNA polimeraz inhibisyonuna neden olarak, DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu durdurmaktadır [Tacar vd., 2013].

Doxorubicin basit difüzyon ile hücreye girer girmez sitoplazmadaki proteozoma bağlanır. Doxorubicin proteozom kompleksi (proteozomun 20S alt ünitesine bağlanır) çekirdek por kompleksinden çekirdek içine taşınır. Doxorubicin

daha yüksek afinite duyduğu nükleer RNA'ya bağlanma eğilimi gösterir ve proteozomlardan ayrılır. Bunun dışında Doxorubicin serbest radikal oluşumu ile şu DNA hasarlarını oluşturur; makromolekül sentez inhibisyonu, DNA çift sarmalının çözülmesinin inhibisyonu ve alkilasyon (metilasyon) artışını tetiklemektedir. Doxorubicin'in genomik DNA'nın yanı sıra mitokondriyal DNA'da enterkalasyon gösterdiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bütün bu etkiler sonucunda Doxorubicin otofajiye veya nekroza neden olduğu düşünülmektedir. Doxorubicin'e bağlı hücre ölümünün tipi, Doxorubicin'in optimum konsantrasyonunun belirlenmesi, kanser hücrelerini efektif olarak öldürmek ve toksik etkiyi en aza indirmek için önemlidir [Tacar vd., 2013].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) kök hücre hazırlık, kök hücre akım sitometri, kök hücre doku kültürü, kanser moleküler tanı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu yüksek lisans tezi Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP-FBE BB (TY) 2013-4 YL).

3.1. BxPC-3 PANKREAS KANSER HÜCRE HATTININ KÜLTÜRE ALINMASI

BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücre hattı (ATCC-CRL-1687, Lot:59313331, Manassas, USA) bt Kimya Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi (İstanbul, Türkiye) aracılığıyla Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata Özçimen'in yürütücülüğünü yaptığı BAP-FBE BB (CK) 2012-4 YL numaralı "Rho-Kinaz inhibitörü fasudilin (HA-1077) pankreas karsinoma hücrelerinde (BxPC-3), sitotoksisite, apoptoz ve metastaz ilişkisinin araştırılması" adlı araştırma projesi kapsamında LGC standartlarına uygun olarak getirilmiştir.

3.1.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi, Kültüre Alınması ve Pasaj İşlemi

Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi EK.1.'de verilen "Hücrelerin Çözülmesi" protokolüne göre yapılmıştır. Besiyeri olarak %10 FBS, %1 Pen/Strep, %1 Amfoterisin, %2.5 L-Glutamin içeren katkılı RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücre kültür şişesi olarak filtre kapaklı T25 ve T75 (CellStar) boyutlarında şişeler kullanılmıştır. Dondurulmuş hücreler yıkama işlemi sonrasında 3 ml katkılı RPMI 1640 ile süspanse edilerek T25 kültür kabına aktarılmıştır ve üzerine 2 ml aynı besiyerinden (T25 kültür kabı için toplam hacim 5 ml) eklenmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ ayarlanan Esco Cell Culture (CCL-170B-8) inkübatöründe üretilmiştir. Hücreler yaklaşık 1 hafta içerisinde T25 kültür kabını tamamen kaplamıştır. Bu süre içerisinde haftada 2-3 kez besleme yapılmıştır. T25 kültür kabı için 5 ml, T75 kültür kabı için 15 ml katkılı RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücreler T25 kültür kabının tüm yüzeyini kapladıktan sonra (5-7

gün) yeni kültür kaplarına 1:3-1:6 oranında pasajlama yapılmıştır. Pasajlama işlemi için öncelikle hücre yüzeyini kaplayan medium uzaklaştırılmıştır. Dullbecco's PBS ile hücreler yüzeysel olarak yıkanmıştır ve sonrasında 1-2 ml Tripsin-EDTA (Lonza) solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında veya 37°C'de hücreler inkübe edilmiştir. Bu süre içerisinde hücreler kültür kabının yüzeyinden kalkmıştır. Kalkan hücreler Tripsin EDTA solüsyonu ile birlikte kültür kabından alınarak 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır ve üzerine 5-6 ml RPMI 1640 eklenerek, salınlı rotorla 500 g'de 5 dakika boyunca santirüj (Hettich Universal) işlemi yapılmıştır. Santrifügasyon sonrasında pellet olarak elde edilen hücrelerin üzerinden süpernatant uzaklaştırılarak hücreler resüspanse edilmiştir. Resüspanse edilen hücrelerin üzerine 6 ml katkı RPMI 1640 eklenerek 3 kültür kabına 2'şer ml olarak paylaştırılmıştır. Bu işlemi takiben her kültür kabının üzerine 3 ml (T75 kültür kabı için 13 ml) katkı RPMI 1640 eklenmiştir. Bu işlem sonrasında hücreler tekrar 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilmiştir.

3.1.2. Hücrelerin Sayılması

Cedex XS (Roche, Mannheim, Germany) cihazı ve cihazın yazılımını taşıyan kontrol ünitesi açılarak ön hazırlıklar tamamlanmıştır. Kontrol ünitesi üzerinden "Cedex XS" uygulaması başlatıldığında cihaz hücrelerin sayılması için hazır hale gelmektedir. Hazırlıklar tamamlandığında kültür kabını kaplayan hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Tripsinizasyon işleminden sonra hücreler 5 dakika 500 g'de yapılan santrifügasyon ile pellet olarak elde edilmiştir. Elde edilen pelletin üzerindeki süpernatant atıldıktan sonra hücreler 1 ml besiyeri ile resüspanse edilmiştir.

Resüspanse edilen hücrelerden 20 µl alınarak 0.2 ml'lik eppendorf içerisine aktarılmıştır. Bu hücrelerin üzerine ise canlı hücrelerin içerisine girerek ölü ve canlı hücre ayrımını sağlayan 1:1 oranında steril distile su ile dilüe edilmiş 20 µl Tripan Mavisi (Roche, Mannheim, Germany) eklenmiştir. Elde edilen karışım pipetaj işlemi ile homojen hale getirildikten sonra cihazın özel lamı olan Smart Slides (Roche, Mannheim, Germany) haznesine bu karışımdan 20-40 µl eklenmiştir.



Şekil 3.1. Cedex XS hücre sayım cihazı ve cedex smart slides

Bu işlemi takiben lam Cedex XS hücre sayım cihazına yerleştirilmiş ve yazılım üzerinden ölçüm komutu verilerek sayım gerçekleştirilmiştir (Bknz. Şekil 3.1.)

3.2. xCELLIGENCE SİSTEMİNDE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ DENEYLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Hücrel olaylar xCELLigence sistemi ile doğal halleriyle işaretleme yapılmasına gerek olmadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Sistem, E-Plate 16 olarak adlandırılan ve zeminine yerleştirilmiş mikroelektrotlar sayesinde elektriksel empedansı ölçmektedir. Empedansta meydana gelen değişim hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgiler vermektedir. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı iki üniteden meydana gelmektedir. Bu ünitelerden birincisi inkübatör içerisine yerleştirilen ve hücrelerin içerisine ekildiği E-Plate üzerindeki değişiklikleri algılayan ana ünite. Bu ünite 3 plate'in yerleşeceği 3 kızağa sahiptir. Bunlar D1, D2 ve D3 olarak tasarlanmıştır. Diğer ünite ise datanın gösterilmesini ve analiz edilmesini sağlayan kontrol ünitesidir. Kontrol ünitesine yüklenen "RTCA Software 1.2.1" ile analizler planlanmakta ve kontrol edilmektedir. Bu bilgiler ışığında cihaz inkübatör içerisine yerleştirilmeden önce kendisine ait temizleme kitleri kullanılarak %80'lik etanol ile temizlenmiştir. Sterilizasyon aşamasının ikinci basamağında ise laminar kabin içerisinde 30-45 dakika boyunca UV ışığa maruz bırakılmıştır. Sterilizasyon işleminin tamamlanması ile birlikte cihaz inkübatör içerisine yerleştirilmiş ve data

kablosu ile inkübatör dışı kontrol ünitesi ile bağlantısı kurulmuştur. Bağlantı işleminin ardından kontrol ünitesi çalıştırılarak yazılım üzerinden önerilen protokole göre standardizasyon plate kullanılarak cihazın standardizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Hücre Titrasyon Deneyinin RTCA Software 1.2.1 Üzerinde Planlanması ve E-Plate Tasarımı

Hücre titrasyon deneyinin planlanabilmesi için kontrol ünitesi üzerindeki "RTCA Software 1.2" başlatılmıştır. Yazılım açıldığında ekrana ilk olarak hangi kızakların kullanılmak istediğini soran bir ifade gelmektedir. Burada kullanılacak kızak veya kızaklar seçildikten sonra "Experiment Notes" sekmesinden deney ile ilgili genel bilgiler girilerek plate tasarımı gerçekleştirilmiştir. "Layout" sekmesinden plate'in yerleştiği kızak seçilmiştir (D1, D2 ve/veya D3). "Layout" sekmesi kullanılacak kızığın aktif olarak görüldüğü ve plate düzeninin giriş yapıldığı bölümdür. Bu çalışmada A1/A2'den G1/G2'ye kadar olan kuyucuklara örnekler, H1 ve H2 kuyucukları ise hücre içermeyen kontrol için kullanılmıştır. "Schedule" sekmesi üzerinden deney aşamalarının girişi yapılmıştır. Bu aşamalardan birincisi arka plan ölçümünün alındığı 1 Sweep x 1 Interval'den oluşan ve toplamda 19 saniye sürecek olan aşamadır. İkinci aşama ise, hücrelerde meydana gelecek değişimlerin kaydedileceği aşamadır. Bu aşamada ölçüm alınacak süre aralığı 30 dakika, planlanan maksimum deney süresi ise manuel durdurmayı sağlamak üzere 999 saat olarak ayarlanmıştır. Bu ölçümlerin sonucunda optimum büyüme eğrisi gösteren hücre sayısı-inkübasyon süresi belirlenmiştir. Planlama aşaması tamamlandığında hücre titrasyonunun belirlenmesine deneysel olarak geçilmiştir.

3.2.2. Hücre Titrasyonunun Belirlenmesi

Önerilen protokole göre kültür kabı en az %80 konfluent duruma ulaştığında hücreler çalışmada kullanılabilir. Bu nedenle hücre titrasyonu belirlenebilmesi için kültür kabının %80-100 konfluent duruma ulaşması beklenmiştir. Hücreler istenen düzeye ulaştığında kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırılarak hücrelere tripsinizasyon uygulanmıştır. Tripsinizasyon aşaması sonrasında pellet olarak elde edilen hücreler

1 ml katkılı besiyeri kullanılarak resüspanse edilmiştir. Resüspanse edilen hücreler Cedex XS cihazında sayılmıştır (Bknz. Hücrelerin Sayılması). Hücrelerin sayımı gerçekleştirildikten hemen sonra E-Plate 16'nın kontrol kuyucukları dahil tüm kuyucuklarına yüzeyi kaplayacak kadar (yaklaşık 100 µl) katkılı besiyeri eklenerek arka plan ölçümü alınmıştır. Ölçüm sonrasında hücre sayısı $2 \times 10^5 / 200 \mu l$ olacak şekilde ayarlanarak, E-Plate 16'nın A1 ve A2 kuyucuklarına duplike olarak uygulanmıştır ve kuyucuklardaki hücre sayılarının dağılımı Çizelge 3.1.'de verilmiştir. A1 ve A2 kuyucuklarından 100 µl hücre süspansiyonu alınarak G1 ve G2 kuyucuklarına kadar her defasında $\frac{1}{2}$ olacak şekilde seri sulandırma yapılmıştır. Bu aşamada dikkatli bir şekilde pipetaj yapılarak hava kabarcığı ve köpürme olmamasına dikkat edilmiştir. Seri sulandırma sonrasında A1 ve A2 kuyucuklarındaki hücre sayısı G1 ve G2 kuyucuklarına kadar her kuyucukta yarı yarıya düşmüştür.

Çizelge 3.1. Hücre titrasyonu belirlemede kullanılan E-Plate 16 düzeni

	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

H1 ve H2 kuyucuklarına ise hücre yüklenmemiş ve kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre yükleme işleminin ardından plate laminar kabin içerisinde 30 dakika boyunca hücrelerin kuyucuk zeminlerine çökmesini sağlamak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında plate cihazın D1 kızağına yerleştirilerek kontrol ünitesi üzerindeki yazılım aracılığıyla empedans ölçümü alınmaya başlamıştır. Empedans ölçümü yaklaşık 100 saatlik süreyle alınmıştır. Bunun sonucunda optimum büyüme eğrisi gösteren hücre sayısı-inkübasyon süresi daha sonraki deneylerde kullanılmıştır.

3.2.3. BxPC-3 Hücre Hattına Doxorubicin Uygulaması ve Hücrelerin E-Plate 16'ya Yüklenmesi

Hücre titrasyonunun belirlenmesi aşamasında elde edilecek uygun hücre sayısı seçilerek, ilaç uygulaması için kullanılmıştır. Kuyucuklarda hücre sayısı sabit tutularak değişen Doxorubicin konsantrasyonuna karşı proliferasyon katsayısı karşılaştırılmıştır. Doxorubicin sitotoksitesi (IC₅₀) belirlenmiştir. Hücre titrasyon deneyindeki aşamalar burada da uygulanmıştır. Fark olarak hücre sayımı gerçekleştirildikten sonra E-Plate 16'nın kontrol kuyucukları dahil tüm kuyucuklara 90 µl katkılı besiyeri eklenerek arkaplan ölçümü alınmıştır. Hücreler 100 µl katkılı besiyeri ile kuyucuklara yüklenmiştir. Belirlenen inkübasyon süresi sonunda (20-30 saat) farklı ilaç dozları son hacmi 10 µl olacak şekilde ayarlanıp ve her bir kuyucuğa dikkatlice pipetle üstten bırakılmıştır (Hücreler tutunduktan sonra pipetaj yapılmaz). Bu aşamada hava kabarcığı ve köpürme olmamasına dikkat edilmiştir. Deneyin planlaması "Hücre Titrasyon Deneyinin RTCA Software 1.2.1 Üzerinde Planlanması" başlığında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Plate tasarımında A1/A2'den F1/F2'ye kadar olan tüm kuyucuklar örnekleri içerir şekilde ayarlanmıştır. G1-G2 kuyucukları ilaç uygulaması yapılmaksızın sadece hücre kontrolü olarak kullanılırken H1-H2 kuyucukları ise hücre bulandırmayan ve uygulanacak en yüksek Doxorubicin dozu içeren kontrol olarak belirlenmiştir (Bknz. Şekil 3.3.).

Çizelge 3.2. Doxorubicin uygulaması için E-Plate 16 düzeni

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (İlaç yok)	Besiyeri *(Doxorubicin)
2	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (Doxorubicin)	Hücre (İlaç yok)	Besiyeri (Doxorubicin)

(*En yüksek Doxorubicin dozu)

3.2.4. xCELLigence DP Sisteminde Migrasyon ve İnvazyon Deneylei İçin CIM-Plate Uygulaması

Önerilen protokole uygun olarak hücreler migrasyon deneyi başlatılmadan bir gün önce pasajlanmıştır. Hücreler bir gece boyunca serumsuz besiyeri (%10 Fötal bovine serum içermeyen) ile aç bırakılmıştır ve %60-80 oranında konfluent duruma geldiklerinde hücrelerin üzerindeki serumsuz besiyeri alınarak Dulbecco's PBS (DPBS) ile iki kez yıkama yapıldıktan sonra tripsinizasyon aşamasına geçilmiştir. Bu aşama sonunda hücreler besiyeri yerine DPBS ile santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon işlemi sonrasında elde edilen pellet serumsuz besiyeri ile resüspanse edilirken, kontrol kuyucuklarında kullanılacak hücreler ise serumlu besiyeri ile resüspanse edilmiştir.

Ön hazırlıklar devam ederken toplamda üç parçadan oluşan CIM-Plate 16 birbirinden ayrılmış ve alt parçadaki A1-A2'den G1-G2 dahil olmak üzere tüm kuyucuklara 160 µl serumlu besiyeri baloncuk oluşmasına izin verilmeden pipetlenmiştir. Kontrol kuyucukları olarak planlanan H1 ve H2 kuyucuklarına ise 160 µl serumsuz besiyeri eklenmiştir. Alt parçayı oluşturan kuyucuklara uygulanacak işlemlerin tamamlanmasıyla birlikte üst parça plate üzerindeki işaretlere uygun şekilde alt parçanın üzerine yerleştirilmiştir. Bu aşama ile birlikte üst parçadaki A1-A2'den G1-G2 dahil tüm kuyucuklara 25-50 µl serumsuz besiyeri eklenirken kontrol kuyucukları H1 ve H2'ye aynı miktarda serumlu besiyeri eklenerek plate cihazın D1 kızağına yerleştirilmiş ve 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik sürenin sonuna yaklaşılırken "RTCA Software 1.2.1" çalıştırılarak deney Çizelge 3.1.'de ki gibi planlanmıştır.

Çizelge 3.3. Migrasyon deneyi için kullanılacak CIM-Plate 16 düzeni

	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 serumlu besiyeri + hücre	100 µl serumlu besiyeri + hücre
	160 µl serumlu besiyeri	160 µl serumlu besiyeri

Üst kuyucuk
Alt kuyucuk

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

3.3.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Gen ekspresyonu deneyleri için hücreler T25 kültür kabı içerisinde çoğaltılmıştır. Kültür kapları konfluent duruma ulaştıklarında, hücrelerin yüzeyini kaplayan katkılı besiyeri uzaklaştırılarak taze katkılı besiyeri eklenmiştir. Besiyeri değişiminin ardından kültür kaplarına tek doz 10 µl hacim içerisinde Doxorubicin uygulanmıştır. Ekspresyon deneyleri için 3, 6, 12, 24 ve 48 saatlik ilaç uygulamasının

ardından tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Tripsinizasyon sonrasında hücreler DPBS ile santrifüj edildikten sonra pellet olarak elde edilmiştir.

Elde edilen hücrelerden Roche High RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany, Lot:11 828 665 001) kiti kullanılarak önerilen protokole göre RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA örnekleri Capital Bio. NanoQ Mikro-Volume Spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Ölçüm işleminin tamamlanmasıyla birlikte örnekler cDNA sentezine kadar -80°C'de saklanmıştır.

cDNA sentezi -80°C'den çıkarılıp eritilen RNA'lardan Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany, Lot:04 379 012 001) kullanılarak önerilen protokole göre yapılmıştır. Bu deney gerçekleştirilirken iki karışım hazırlanmıştır.

İlk karışım aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.4. cDNA sentez aşamasında kullanılan karışım 1 içeriği

Karışım 1 İçeriği	
Total RNA	2-9 µl
Random Primer	2 µl
dH ₂ O	X µl
Toplam	13 µl

cDNA sentezi için 260/280nm absorbans oranı 1.8-2.2 aralığında olan RNA örnekleri seçilmiştir. cDNA sentezi için her örnekten 1µg total RNA olacak şekilde alınarak karışım hazırlanmıştır.

Karışımların hazırlanmasıyla örnekler 65°C'de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca ikinci karışım hazırlanmıştır.

İkinci karışım aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.5. cDNA sentez aşamasında kullanılan karışım 2 içeriği

Karışım 2 İçeriği	
Transcriptor Reverse Transkriptase Reaction Buffer	4 µl
Protector Rnase Inhibitor Buffer	0.5 µl
dNTP Mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase Enzyme	0.5 µl
Toplam	7 µl

Karışım 2, 10 dakikalık inkübasyonu tamamlanan tüplerin içerisine eklenmiştir. Sonrasında uygulanan Thermal Cycler programı ise aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.6. cDNA sentez aşamasında kullanılan döngü ve süreleri.

25 °C	10 Dakika
50 °C	60 Dakika
85 °C	5 Dakika

3.3.2. Kantitatif RT-PCR'da Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 Gen İfadelerinin Ölçümü

Thermal Cycler'dan alınan örnekler gen ekspresyonu çalışmasına kadar -20 °C'de saklanmıştır. Ekspresyon çalışması için -20 °C'den alınan örneklerin Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin çalışmasında referans gen olarak β -aktin housekeeping gen kullanılmıştır. Karışım 96 kuyucuklu platalere Çizelge 3.5.'teki gibi yüklenmiştir. Gen ifadesi Pfaffl M.W. tarafından geliştirilen matematiksel yöntemle göre hesaplanmıştır [Pfaffl, 2001].

Çizelge 3.7. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 ifadelerinin incelenmesinde kullanılan karışım

96 Well Plate Yüklenen Karışım	
Master Mix (Roche, Mannheim, Germany)	10 µl
dH ₂ O	2 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Prob	1 µl
cDNA	5 µl
Toplam	20 µl

3.4. AKİM SİTOMETRİ ile FITC ANNEXIN V TESTİ

FITC Annexin V ile erken ve geç apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlamak amacıyla, Propidium Iodide (PI) veya 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) gibi vital boyalar ile konjuge edilerek kullanılmaktadır.

Bu test için T75 flaskta büyümekte olan hücrelerin konfluent olmalarının ardından seçilen Doxorubicin dozu hücrelere analiz saatinden 24 saat önce eklenmiştir. Süre sonunda hücrelerin üzerindeki katkılı ve ilaçlı besiyeri uzaklaştırılarak tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen hücreler DPBS ile santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrasında hücre sayımı Cedex XS cihazında gerçekleştirilerek testin uygulanmasına geçilmiştir. Sayım işleminin ardından hücrelerin boyanması işlemine geçilmiştir. Bu test uygulanırken örneklerin yanı sıra 3 farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Kullanılan örnekler ve kontrol gruplarında boyaların dağılımı Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.8. FITC AnnexinV apoptoz belirleme testinde kullanılan kontrol ve örneklerin hazırlanması

Deney Grupları	Kullanılan Hücre Sayısı	Kullanılan Boya ve Miktar
Kontrol Boyasız	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	-
Kontrol PI Boyalı	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	5 μl PI
Kontrol FITC AnnexinV Boyalı	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	5 μl FITC AnnexinV
Kontrol FITC AnnexinV+PI Boyalı	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	5 μl FITC AnnexinV + 5 μl PI
Doxorubicin Boyasız	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	-
Doxorubicin FITC AnnexinV Boyalı	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	5 μl FITC AnnexinV
Doxorubicin PI Boyalı	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	5 μl PI
Doxorubicin FITC AnnexinV+PI Boyalı	$1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$	5 μl FITC AnnexinV + 5 μl PI

Tripsinizasyon işlemi sonrasında pellet olarak elde edilen hücreler iki kez soğuk DBPS ile yıkanarak seyreltilmiş Binding Buffer (1x) ile 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Her bir tüp için bu karışımın 100 μl 'si (1×10^5) 5 ml'lik FACS tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra yukarıda verilen tabloya göre tüplere uygun boya veya boyalar 5 μl hacimde eklenerek 15 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon işlemi tamamlandığında kullanılacak kontrol ve ilaçlı tüplerin tamamına 400 μl Binding Buffer (1x) eklenerek BD FacsARIA III cihazında FITC AnnexinV prosedürüne uygun olarak okutulmuştur.

3.5. AKİM SİTOMETRİ ile PE KASPAZ-3 TESTİ

Sistein proteazlardan kaspaz ailesi, apoptoz ve inflamasyonda anahtar rol oynamaktadır. Kaspaz-3 apoptozun erken safhalarında aktif hale gelen anahtar proteazdır ve apoptozun deneysel olarak gösterilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir.

Aktif Kaspaz-3 testinde öncelikle elde edilen hücreler iki kez soğuk DPBS ile yıkanarak 5 dakika boyunca 300 g'de santrifüj edilmiştir. Bir sonraki aşamada kitin içerisinde bulunan Cytofix/Cytoperm solüsyonu ile belirtilen oranlarda resüspanse edilerek 20 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon aşamasının tamamlanmasıyla birlikte hücreler 5 dakika 300 g'de tekrar santrifüj

edilmiştir. Santrifügasyon sonrasında süpernatant atılarak $1 \times 10^6/0.5$ ml Perm/Wash Buffer (1x) ile yıkanmıştır. Bu aşama toplamda iki kez tekralandıktan sonra hücreler tekrar 5 dakika boyunca 300 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrasında süpernatant atılarak örneklerin üzerine $1 \times 10^6/0.1$ ml olacak şekilde Perm/Wash Buffer (1x) ve $1 \times 10^6/20$ µl olacak şekilde antikör eklenmiştir. Sonrasında örnek tüpleri 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu tamamlayan örneklerin üzerine 1 ml Perm/Wash Buffer (1x) eklenerek 5 dakika 300 g'de santrifügasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifügasyon sonrasında süpernatant atılarak örneklerin üzerine 500 µl Perm/Wash Buffer (1x) eklendikten sonra tüpler akım sitometri cihazında okutulmuştur.

BD FacsARIA III Cihazında Örneklerin Okutulması

BD FacsARIA III cihazında örnekler okutulmaya başlanmadan önce cihaz firmanın belirlediği prosedüre uygun olarak hazırlanmıştır. Öncelikle cihazın etanol tankına yaklaşık 5 litre %70'lik etanol eklenerek kapağı sıkıca kapatılmıştır. Sonrasında FACSFlow olarak adlandırılan tanka örneklerin okutulması sırasında sistem sıvısı olarak kullanılan FlowSheath eklenerek tank kapatılmıştır. Bunun sonrasında atık tankının cihaz ile bağlantıları ayrıldıktan sonra içerisindeki atık sıvı tıbbi atık kabına boşaltılmıştır. Tankın dibini kaplayacak kadar FACSClean solüsyonu eklenerek kapağı kapatılıp cihaz ile bağlantıları yapılmıştır. Cihazın çalışması için ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra cihazın güç düğmesi aracılığıyla cihaz çalıştırılmıştır. Kontrol ünitesinden FACSDiva yazılımı çalıştırılmasının ardından ekrana gelen yönergeler izlenerek cihaz örnek okutmaya hazır hale getirilmiştir. Sonrasında örnekler PE Aktif Kaspaz-3, FITC AnnexinV kitleri ile apoptoz analizi ve Ccycle Test Plus kiti ile hücre döngüsü analizi için prosedürlere uygun bir şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler FACSTube olarak adlandırılan özel propilen tüplere aktarılmıştır. Propilen tüpler cihazın yükleme kısmına yüklenerek yaklaşık 1 dakika süren ve incelenen olay sayısı 10.000 olana kadar okutulmak üzere programlanarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler gerçekleştiği esnada gerekli kapılama ve grafiklerin izlenmesi FACS Diva üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sadece hücre döngüsü analizine özel olarak elde edilen sonuçlar lisanslı olarak temin edilen ModFit LT programında analiz edilmiştir.

3.6. AKIM SİTOMETRİ ile HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

Bu test farklı şekilde izole edilmiş normal veya BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücrelerindeki anormal DNA'lı hücre hatlarını belirlemede, buna bağlı DNA index (Di) tahmininde ve bu hücre hattında hücre döngüsü faz dağılımlarını belirlemek için kullanılmıştır. Kitin çalışma metodu hücre membranını oluşturan lipidlerin iyonik olmayan deterjanlar yardımıyla çözülmesini, hücre iskeletinin ve nükleer proteinlerin tripsin yardımıyla uzaklaştırılmasını, hücre RNA'nın enzimler ile parçalanmasını ve spermin ile nükleer kromatinlerin stabilize edilmesi prensibine göre çalışmaktadır. Propidium Iodide (PI) stokiyometrik olarak temiz ve izole edilmiş nükleus bağlanarak elektronik-doublet diskriminasyonuna sahip akım sitometride çalışılmaktadır. PI ile boyanmış nükleus 580 ve 650nm dalga boyunda ışık yaymaktadır. Bu bilgiler ışığında deneyler planlanmış ve uygulanmıştır. Çoğaltılan ve 24 saatlik ilaç uygulaması sonrasında tripsinizasyon işlemi uygulanan hücreler öncelikle 17x100 mm'lik FACS tüplerine alınmıştır. Bu işlemi takiben hücrelere 5 dakika boyunca 500 g'de santrifügasyon uygulanmıştır. Santrifügasyon sonrasında tüpün dibinde oluşan pellete zarar verilmeden supernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 1 ml Buffer Solüsyonu eklenerek herhangi bir köpürme yapılmaksızın çalkalanmış ve sonrasında 5 dakika 500 g'de santrifügasyon yapılmıştır ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Atılan süpernatant sonrasında hücrelerin üzerine tekrar 1 ml Buffer solüsyonu eklenerek hücreler Cedex XS cihazında sayılmıştır. Sayım sonrasında konsantrasyon Buffer Solüsyonu ile 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücrelerin hazırlanması bu aşama ile tamamlandıktan sonra boyama protokolüne geçilmiştir. Hücreler bu aşamada ilk olarak 5 dakika boyunca 400 g'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatantın tamamı atılarak son damla peçeteye alınmıştır. Tüplere 250 µl Solüsyon A (Trypsin Buffer) eklenerek vorteks yapılmadan el yardımıyla karışma sağlanmıştır. Karıştırma işleminin ardından Solüsyon A'nın etkisini gösterebilmesi için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Solüsyon A boşaltılmadan üzerine 200 µl Solüsyon B (Tyripsin Inhibitör and RNase Buffer) eklenip tüplerin dibine el ile vurularak karışması sağlanmıştır. Karıştırma işleminin ardından Solüsyon B'nin etkisini gösterebilmesi için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından Solüsyon

A ve B boşaltılmadan üzerine 200 µl (2°C - 8 °C) soğuk olarak Solüsyon C (Propidium Iodide Stain Solution) tüm tüplere eklenmiştir. Hızlıca karıştırılarak 10 dakika boyunca karanlık ortamlı bir buzdolabında inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyon aşamasını takiben örnekler 35 µm ve 50 µm'lik filtreler kullanılarak 12x75mm tüplere aktarılmıştır. Bu işlem ile birlikte örnekler akım sitometri cihazına hazır hale gelmiş ve akım sitometri cihazında okutulmuştur.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

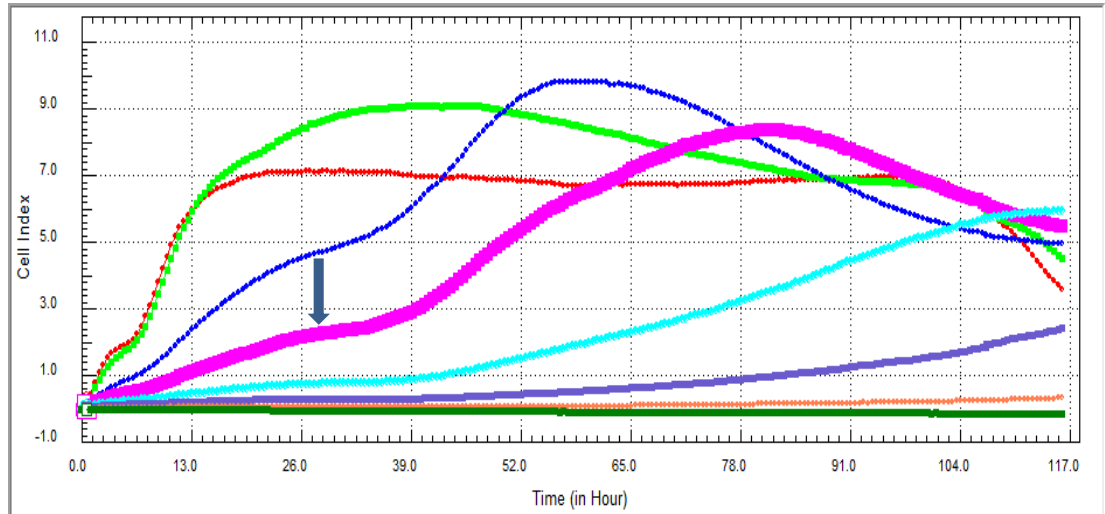
4.1. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA xCELLIGENCE DP SİSTEMİ ile HÜCRE TİTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücre titrasyonunun belirlenmesi için E-Plate 16 kullanılarak gerçekleştirilen deney yaklaşık olarak 100 saat izlenmiştir. E-Plate 16'nın kuyucuklarına yüklenen hücre sayıları ise Çizelge 4.1'deki gibidir (Bknz. 3.2.2 Hücre Titrasyonunu Belirlenmesi).

Çizelge 4.1. E-Plate 16 kuyucuklarına yüklenen hücre sayıları.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1 (Hücre Sayısı)	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	Kontrol
2 (Hücre Sayısı)	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1563	Kontrol

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda BxPC-3 hücre hattı için kullanılacak hücre sayısı 12500 ve Doxorubicin uygulanma saati ise 26-28. saatler arası olarak belirlenmiştir (Bknz. Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. BxPC-3 hücre hattının hücre sayısı ve zamana bağlı proliferasyonu.

Bu seçim gerçekleştirilirken; hücrelerin büyüme fazının uzun olması ve hücrelerin kendiliğinden ölüme başlama saatinin tespit edilmesi göz önüne alınan en önemli kriterler olmuştur.

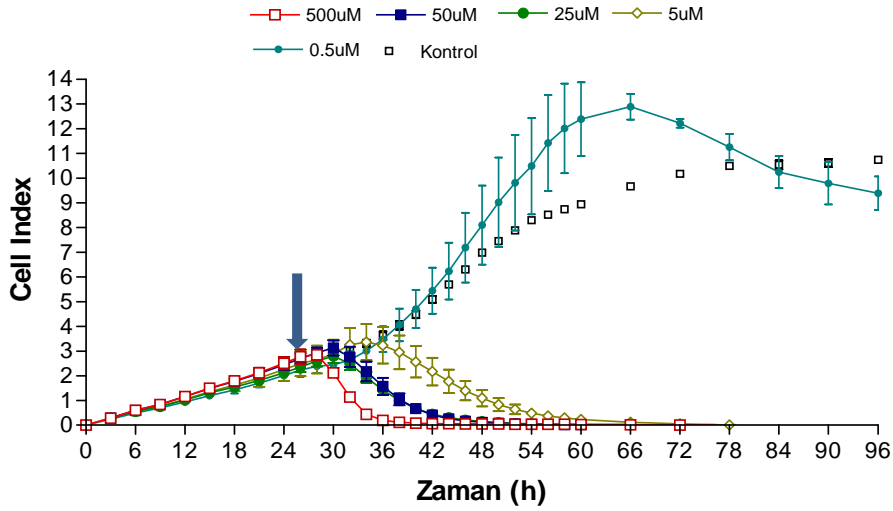
4.2. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA DOXORUBICIN'E BAĞLI SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ

Hücre titrasyon deneylerinin gerçekleştirilmesinin ardından E-Plate 16'nın A1-A2'den, F1-F2 kuyucukları dahil tüm kuyucuklarına 12500 hücre yüklenmiştir. G1-G2 kuyucukları ilaç uygulaması yapılmaksızın sadece hücre kontrolü olarak kullanılırken H1-H2 kuyucukları ise hücre buldurmeyen ve uygulanacak en yüksek Doxorubicin dozu (500 µM) içeren kontrol olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. E-Plate 16 kuyucuklarına yüklenen hücre sayısı ve uygulanan Doxorubicin dozları.

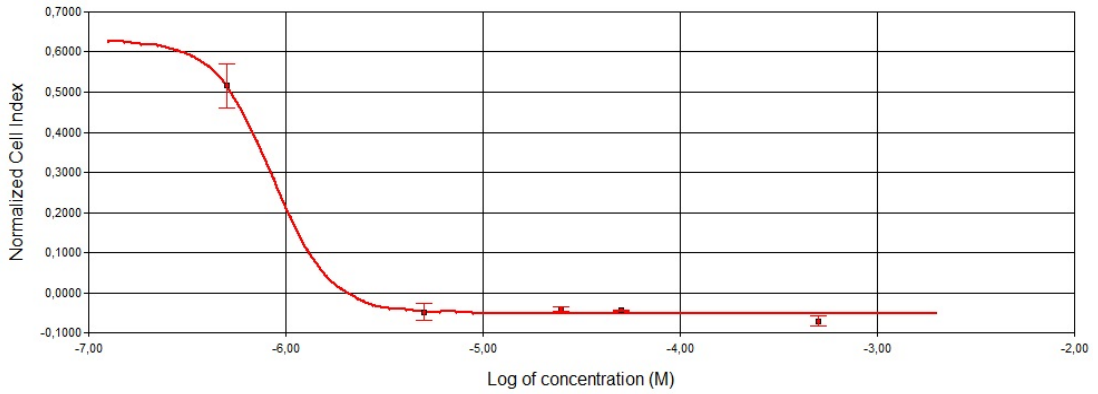
	A	B	C	D	E	F	G	H
1 Hücre Sayısı	12500 (500 µM)	12500 (50 µM)	12500 (25 µM)	12500 (25 µM)	12500 (5 µM)	12500 (0.5 µM)	12500 (İlaç yok)	Besiyeri (500 µM)
2 Hücre Sayısı	12500 (500 µM)	12500 (50 µM)	12500 (25 µM)	12500 (25 µM)	12500 (5 µM)	12500 (0.5 µM)	12500 (İlaç yok)	Besiyeri (500 µM)

Deney başladıktan sonra 27. saat içerisinde deney duraklatılarak E-Plate 16 laminar kabin içerisine alınmıştır. Bunu takiben kuyucuklara Çizelge 4.2.'de verildiği gibi Doxorubicin dozları uygulandıktan sonra deney devam ettirilmiş ve 188. saat sonunda sonlandırılmıştır. Deney sonucunda Doxorubicin dozuna bağlı sitotoksosite Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. RTCA Software 1.2.1 programı kullanılarak IC₅₀ değeri $8,64 \times 10^{-7}$ M (0,86 µM) olarak hesaplanmıştır. Doxorubicin'in antiproliferatif etkisinin gözlemlendiği çalışmalarda 1 µM 'lık doz kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde Doxorubicin ile yapılan çalışmalarda sitotoksik etkinin gözlemlenmesinde ise yakın dozlar kullanılmıştır [Rebbaa vd., 2003].



Şekil 4.2. Doxorubicin'in BxPC-3 hücrelerinde proliferasyona etkisi

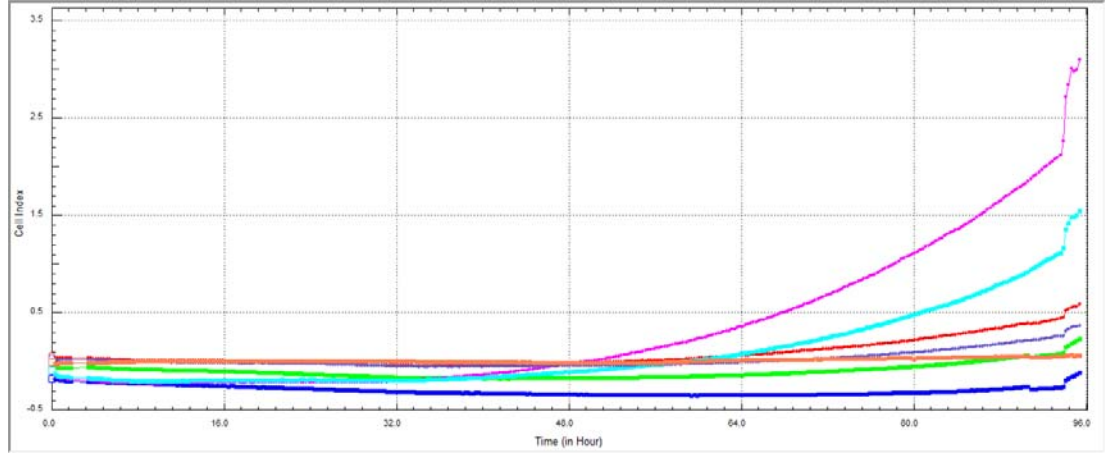
Uygulanan Doxorubicin dozlarından 500 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 5 μ M'in sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir. İlaç eklendikten sonra 16-20 saat içerisinde hücrelerin tamamının öldüğü görülmüştür. Doxorubicin'in 0.5 μ M dozunda ise; grafiğe bakıldığında, ilaç ilavesinden sonra 40 saate kadar proliferasyonda artış gözlenirken, sonraki saatlerde proliferasyonda ani düşüş görülmektedir. Kontrol ile karşılaştırıldığında kontrol grubundaki hücrelerin 96. saatte hala canlılıklarını koruduklarından 0.5 μ M'lık dozdaki 66. saatte gözlenen ani düşüşü Doxorubicin'in düşük dozlarda senesense neden olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir [Taylor vd., 2011; Altieri vd., 2012]. Burada gözlemlenen Cell Index değerindeki artış hücre sayısındaki artıştan ziyade senesens sürecinde hücrelerin genişlemesi nedeniyle empedans artışına bağlanmaktadır.



Şekil 4.3. RTCA Software 1.2.1'de hesaplanan BxPC-3 hücrelerinde Doxorubicin'e ait IC₅₀ değeri.

4.3. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA xCELLIGENCE DP SİSTEMİ ile MİGRASYONUN BELİRLENMESİ

Migrasyon deneyleri BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücreleri ile xCELLigence DP sisteminde CIM-Plate 16 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Açık bırakılan kanser hücrelerinin %10 FBS'li besiyerine yönelmeleri izlenmiş ancak besine yönelik hücre migrasyonuna cevap vermediği gözlemlenmiştir (Bknz. Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. BxPC-3 hücrelerinde migrasyonun gösterilmesi.

BxPC-3 hücre hattı için literatürde bu hücrelerin migrasyon yeteneği konusu tartışmalıdır. Belli koşullar altında migrasyon gözlenmiştir [Zhu vd., 2012]. Sadece besine yönelik migrasyona cevap vermediğinden uyarıcı hormon varlığında denenmesi gerekmektedir.

BxPC-3 hücre hattında migrasyon ile ilgili yapılan farklı bir çalışmada ise SMAD4'ün migrasyondaki önemli rolünden bahsedilmiştir. BxPC-3 hücrelerinde SMAD4'ün delesyona uğramış olması hücrelerin göç profillerini etkileyen faktörlerden biri olarak gösterilmiştir. Bu nedenle BxPC-3 hücrelerine çeşitli uyarıcı hormonların verilmesi ile hücrelere migrasyon özelliği kazandırılmış ve migrasyonda önemli olduğu düşünülen genlerin susturulmasına bağlı olarakta migrasyonun engellendiği gösterilmiştir [Zhu vd., 2012].

Diğer bir pankreas karsinoma hücre hattı olan Panc-1 ile migrasyon bakımından karşılaştırıldığında, Panc-1'in BxPC-3'e göre daha aktif olduğu bildirilirken, Panc-1 hücrelerinin ayrı ayrı hücreler halinde göç ettiği ve BxPC-3 hücrelerinin ise sıkıca paketlenmiş bir tabaka halinde göç ettiği "Wound Healing Assay" ile gösterilmiştir [Stahle vd., 2003]. Bu noktada CIM-Plate 16 porlarının bu tabakanın göçüne izin verecek büyüklükte olup olmadığı ise bilinmemektedir.

4.4. DOXORUBICIN'İN KASPAZ GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

BxPC-3 hücreleri Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı gibi hücreler konfluent olana kadar beslenmiştir. Hücreler konfluent duruma ulaştıklarında ilaç dozu 1 μM (10^{-6} M) olarak uygulanmıştır (IC_{50} : 0,864 μM). Doxorubicin uygulaması üzerinden 3, 6, 12, 24 ve 48 saat geçtiğinde kültür kabından kaldırılan hücreler santrifügasyon sonrası DPBS ile homojenize edilerek total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu sonucu Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. BxPC-3 hücre hattı RNA izolasyon sonuçları.

Doxorubicin Uygulaması 1 μM /Saat	Örnek Tipi	230nm Absorbans	260nm Absorbans	280nm Absorbans	260/280nm Absorbans	260/230nm Absorbans	Konsantrasyon (ng/ μl)
3 saat	RNA	2.26	5.55	2.72	2.03	2.44	222.03
6 saat	RNA	2.07	5.15	2.53	2.02	2.48	206.01
12 saat	RNA	3.42	10.29	4.86	2.11	3.00	411.81
24 saat	RNA	2.96	6.95	3.41	2.03	2.35	278.29
48saat	RNA	2.38	5.33	2.67	1.99	2.23	213.35
Kontrol (24 Saat)	RNA	2.40	5.47	2.69	2.02	2.27	218.87

cDNA sentezi için her bir örnekten 1 μg total RNA kullanılmıştır. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 gen ifadelerinin ölçümü β -Aktin ile normalize edilerek ölçülmüştür. Ölçüme ait sonuçlar Çizelge 4.4., Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. BxPC-3 hücrelerinde referans gen β -Aktin ve Kaspaz-3 ekspresyonu. (*Kalibratör)

Örnek	β -Aktin	Kaspaz-3	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
Kontrol	14,64	24,38	9,74	0	*1,00
1 μ M Doxorubicin - 3 saat	13,6	22,82	9,22	-0,52	1,43
1 μ M Doxorubicin - 6 saat	14,38	21,86	7,48	-2,26	4,79
1 μ M Doxorubicin - 12 saat	13,67	22,23	8,56	-1,18	2,27
1 μ M Doxorubicin - 24 saat	12,84	22,17	9,33	-0,41	1,33
1 μ M Doxorubicin - 48 saat	13,08	22,7	9,62	-0,12	1,09

Gen ifadesi çalışmasında referans gen olarak β -Aktin geni kullanılmıştır. Her üç gen içinde aynı kontrol kullanılmıştır. Kaspaz-3 değeri göreceli olarak β -Aktin housekeeping gen ifadesi ile karşılaştırılarak Pfaffl metoduna [Pfaffl, 2001] göre gösterilmiştir (Bknz. Çizelge 4.5. $2^{-\Delta\Delta$ CT}). Doxorubicin maruziyetinin 3. saatinde etki görülmezken, 6. saatte kontrol grubuna göre Kaspaz-3 gen ifadesinde yaklaşık 5 kat artış görülmüştür. Daha sonraki saatlerde Kaspaz-3 aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. BxPC-3 hücrelerinde referans gen β -Aktin ve Kaspaz-8 ekspresyonu. (*Kalibratör)

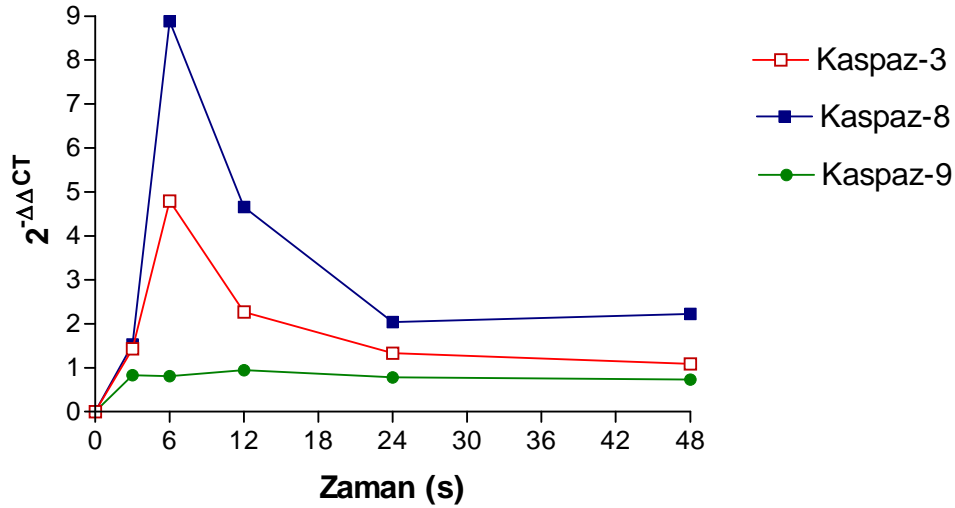
Örnek	β -Aktin	Kaspaz-8	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
Kontrol	14,64	29,96	15,32	0	*1,00
1 μ M Doxorubicin - 3 saat	13,6	28,31	14,71	-0,61	1,53
1 μ M Doxorubicin - 6 saat	14,38	26,55	12,17	-3,15	8,88
1 μ M Doxorubicin - 12 saat	13,67	26,77	13,1	-2,22	4,66
1 μ M Doxorubicin - 24 saat	12,84	27,13	14,29	-1,03	2,04
1 μ M Doxorubicin - 48 saat	13,08	27,24	14,16	-1,16	2,23

Kaspaz-8 gen ifadesi ise Doxorubicin maruziyetinin 3. saatinde etki görülmezken, 6. saatte kontrol grubuna göre Kaspaz-8 gen ifadesinde yaklaşık 9 kat artış görülmüştür. 12. saatte Kaspaz-8 için %50 aktivitenin halen korunduğu, 24. saatte ise Kaspaz-8 aktivitesinin görülmediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. BxPC-3 hücrelerinde referans gen β -Aktin ve Kaspaz-9 ekspresyonu. (*Kalibratör)

Örnek	β -Aktin	Kaspaz-9	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
Kontrol	14,64	24,86	10,22	0	*1,00
1 μ M Doxorubicin - 3 saat	13,6	24,09	10,49	0,27	0,83
1 μ M Doxorubicin - 6 saat	14,38	24,91	10,53	0,31	0,81
1 μ M Doxorubicin - 12 saat	13,67	23,96	10,29	0,07	0,95
1 μ M Doxorubicin - 24 saat	12,84	23,41	10,57	0,35	0,78
1 μ M Doxorubicin - 48 saat	13,08	23,75	10,67	0,45	0,73

Kaspaz-9 gen ifadesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bakılan tüm saatler için aktif olmadığı saptanmıştır. Her üç kaspaz gen ifadelerinin karşılaştırılması Şekil 4.5.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.5. BxPC-3 hücrelerinde Doxorubicin'e bağlı Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 gen ifadeleri.

Doxorubicin'in apoptotik etkisi BxPC-3 hücrelerinde dış yolak üzerinden uyarıcı Kaspaz-8'in aktivasyonu ile Kaspaz-3'ün üzerinden gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Doxorubicin farklı kanser hücrelerinde Bcl-2/Bax ve Kaspaz-9 yolağı üzerinden anti-kanser etkisi gösterdiği bilinmektedir. [Tait ve Green, 2010].

Panc-1 ve PC-3 hücrelerinde Doxorubicin'in TNF- α apoptoz indükleyen liganda (TRAIL) bağlanarak apoptotik etkisi araştırılmıştır. TRAIL'e bağlı Doxorubicin, anti-apoptotik bir protein olan c-FLIP'in sentezini yavaşlatırken,

proapoptotik kaspazları uyardığı ve reaktif oksijen bileşiklerini (ROS) artırarak iç apoptotik yolları uyarırken, aynı zamanda hücreyi reseptör aracılı apoptoza duyarlı hale getirerek anti-kanser etkisini göstermektedir. [Taylor vd., 2011].

Doxorubicin'in A2780 yumurtalık karsinoma hücre hattında gösterilen apoptotik etkisinde Kaspaz-9'un ana rol oynadığı, Kaspaz-3 ve Kaspaz-7'yi aktive ettiği bulunmuştur. Bu çalışmada Kaspaz-9 ve Kaspaz-3'ün apoptozu başlattığı ve Kaspaz-9'un Kaspaz-2, Kaspaz-3 ve Kaspaz-7'yi aktive ettiği, Kaspaz-3'ünde büyük olasılıkla Kaspaz-6 ve Kaspaz-8'i aktifleştirmiş olabileceği, Kaspaz-8'in ise pozitif geri bildirim ile Kaspaz-3'ü aktive ettiğini düşündürmektedir. Ayrıca Kaspaz-3 ayrı bir pozitif geri bildirim ile Kaspaz-9'u uyarılmış olabileceğinden söz edilmektedir [Minko vd., 2001].

İnsan pankreas karsinoma hücre hatlarının topoizomeraz II inhibitörlerine tepkilerinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir. BxPC-3 hücrelerinde Doxorubicin hassasiyeti gözlenirken, Capan-1 hücrelerinde Doxorubicin'e direnç olduğu gözlenmiştir. Bunun sonucunda Capan-1 ve BxPC-3'ün Doxorubicin uyarımı ile farklı apoptotik yollar üzerinden uyarıldıklarını göstermektedir. BxPC-3'ün uyarılmasında FASL reseptörlerinin etkin olduğu sonucuna varılmıştır [Arlt vd., 2001].

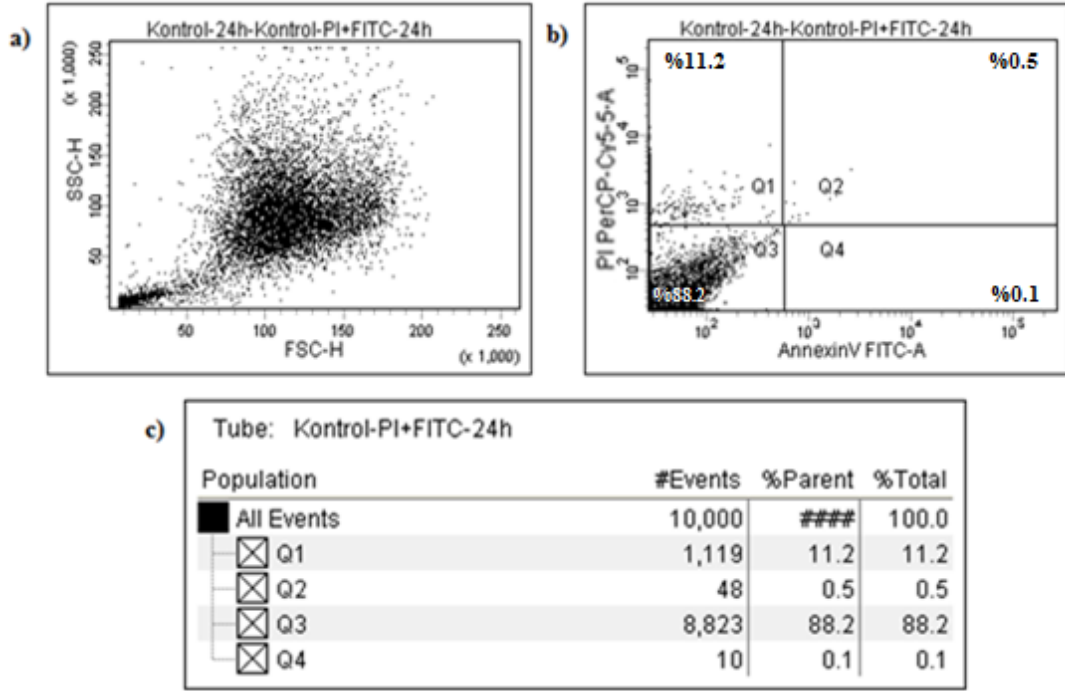
Elmore ve arkadaşları MCF-7 hücre hattında Doxorubicin ile yaptıkları çalışmada Doxorubicin'e bağlı hücre ölümünün aktif Kaspaz-3 yokluğunda da gerçekleşebildiğini göstermiştir [Elmore vd., 2002].

Niceliksel olarak incelenen Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 gen ifadelerinin dışında, apoptoz yolağında etkili olduğu düşünülen Kaspaz-7 gen ifadesine bakılması da gerekmektedir. Ayrıca BxPC-3 hücre hattında Doxorubicin'in CREB3L1 yolağına etkisini anlamak için immünohistokimya yapılması gerekmektedir.

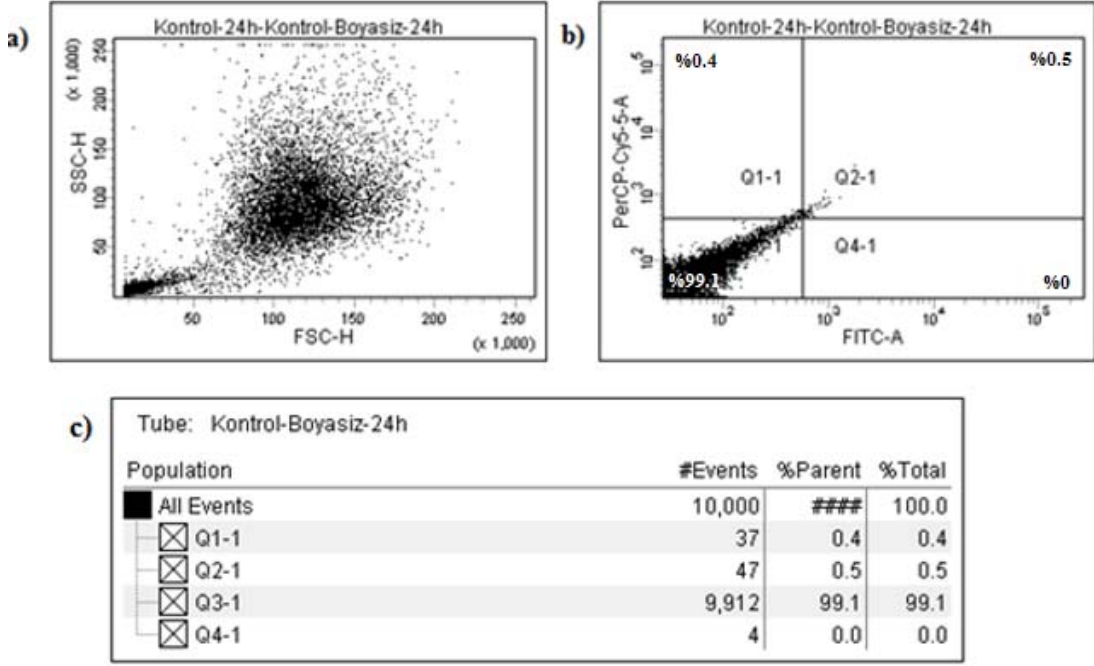
4.5. BxPC-3 HÜCRE HATTINDA DOXORUBICIN'E BAĞLI APOPTOZ SAFHALARININ AKIM SİTOMETRİDE BELİRLENMESİ

4.5.1. FITC AnnexinV ile Apoptozun Belirlenmesi

BxPC-3 hücreleri T75 flaskta hücreler konfluent olduğunda 1µM Doxorubicin dozuna 24 saat maruz bırakılarak Bölüm 3.4'de anlatıldığı gibi boyanmıştır. Boyanan hücre süspansiyonu cihazda okutuluncaya kadar +4°C'de bekletilmiştir. İlaç uygulaması yapılmayan iki kontrol grubu hücre bulunmaktadır. Kontrollerden bir tanesi ilaç uygulanan hücrelerle aynı şekilde boyanırken, diğeri ise negatif boyasız kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

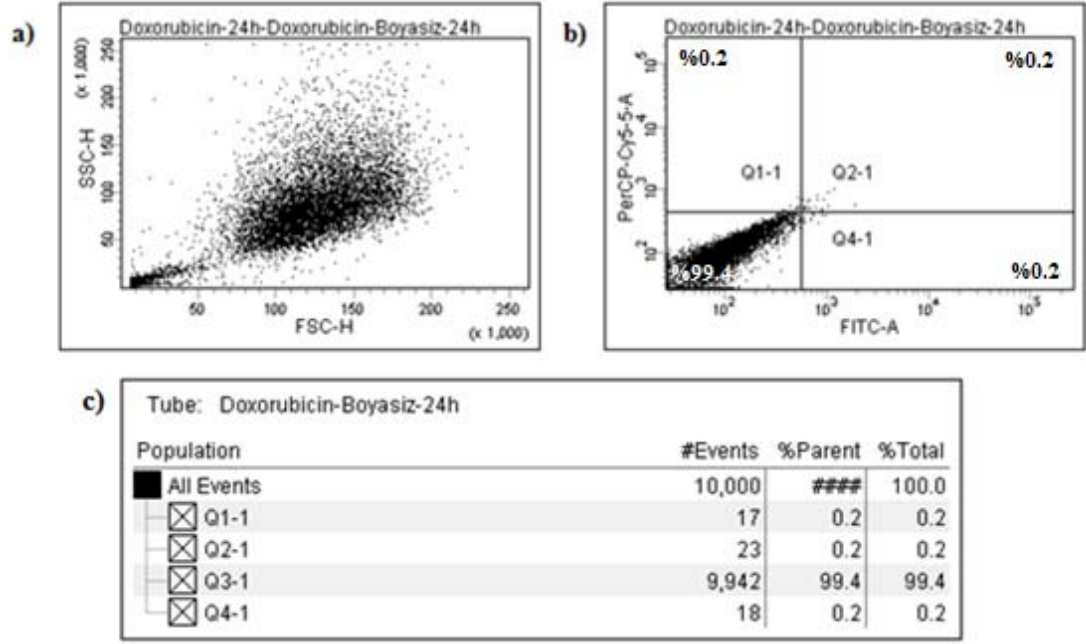


Şekil 4.6. Kontrol grubu BxPC-3 hücreleri: (a) FSC-H , SSC-H grafiğinde hücre popülasyonu büyüklüğü ve granül yapısına göre belirlenmiş hücreler, (b) FITC AnnexinV ve PI düzeylerinin gösterilmesi, (c) Boyanmamış hücrelerin % bakımından hücre popülasyonunun gösterimi (%99.1)

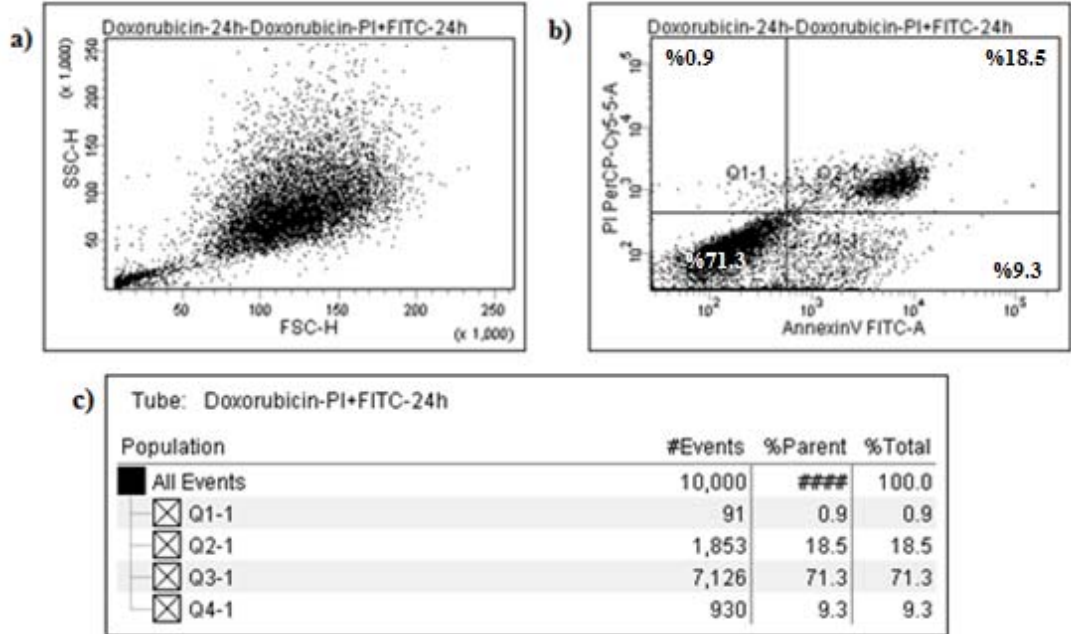


Şekil 4.7. Kontrol grubu boyalı BxPC-3 hücreleri: (a) FSC-H , SSC-H grafiğinde hücre popülasyonu büyüklüğü ve granül yapısına göre belirlenmiş hücreler, (b) FITC AnnexinV ve PI düzeylerinin gösterilmesi, (c) Boyanmış hücrelerin % bakımından hücre popülasyonunun gösterimi.

FITC AnnexinV -/PI - olan hücreler canlı hücre popülasyonunu oluşturmaktadır. Kontrol grubu için canlı hücre %88,2 olarak belirlenmiştir. FITC AnnexinV +/PI - hücre oranı ise %0,1 olarak belirlenen erken apoptotik hücrelerdir. FITC AnnexinV +/PI+ hücre oranı ise %0,5 olarak belirlenen geç apoptotik/ölü hücre popülasyonunu oluşturmaktadır. Elde edilen canlı/cansız hücre oranı kontrol grubu için beklenildiği gibi olmuştur.

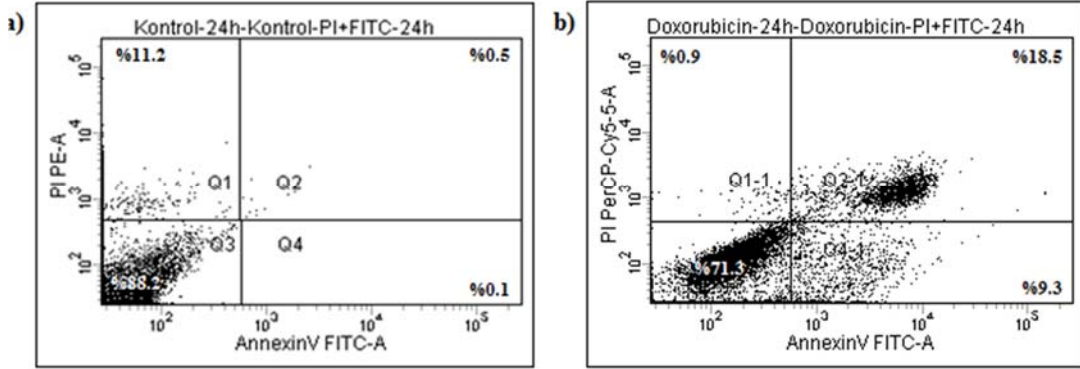


Şekil 4.8. Doxorubicin'e maruz bırakılıp boyama yapılmayan BxPC-3 hücreleri: (a) FSC-H , SSC-H grafiğinde hücre popülasyonu büyüklüğü ve granül yapısına göre belirlenmiş hücreler, (b) FITC AnnexinV ve PI düzeylerinin gösterilmesi, (c) Boyanmamış hücrelerin % bakımından hücre popülasyonunun gösterimi (%99.4).



Şekil 4.9. Doxorubicin'e maruz bırakılıp boyama yapılan BxPC-3 hücreleri: (a) FSC-H , SSC-H grafiğinde hücre popülasyonu büyüklüğü ve granül yapısına göre belirlenmiş hücreler, (b) FITC AnnexinV ve PI düzeylerinin gösterilmesi, (c) Boyanmış hücrelerin % bakımından hücre popülasyonunun gösterimi.

FITC AnnexinV -/PI - olan hücreler canlı hücre popülasyonunu oluşturmaktadır. Doxorubicin'e maruz bırakılan hücre grubu için canlı hücre %71,3 olarak belirlenmiştir. FITC AnnexinV +/PI - hücre oranı ise %9,3 olarak belirlenen erken apoptotik hücrelerdir. FITC AnnexinV +/PI+ hücre oranı ise %18,5 olarak belirlenen geç apoptotik veya ölü hücre popülasyonunu oluşturmaktadır.



Şekil 4.10. Kontrol grubu (a) ve ilaç uygulaması yapılan (b) BxPC-3 hücrelerinde apoptozun gösterilmesi.

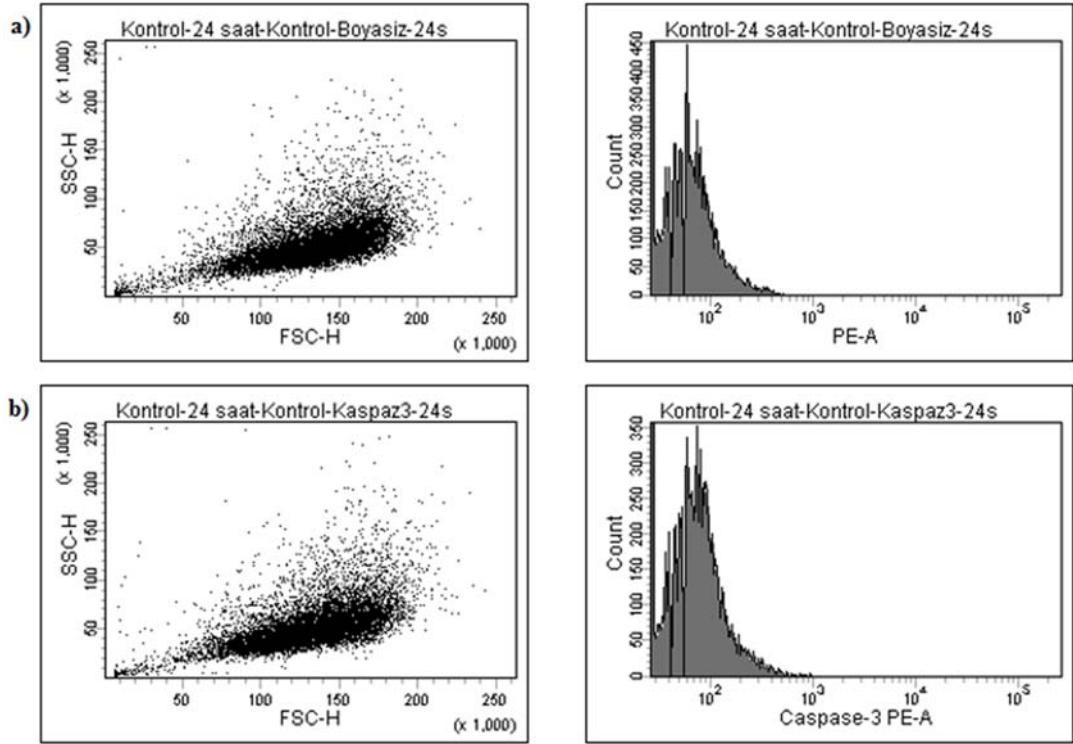
Hct-116 insan kolon karsinoma hücrelerine 5µM Doxorubicin uygulamasının 24 saat ardından, akım sitometri cihazında AnnexinV testi uygulandığında çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma sonucunda AnnexinV -/PI - olan canlı hücre popülasyonu %68, AnnexinV +/PI - erken apoptotik hücreler %8,9 ve AnnexinV +/PI + hücre oranı ise %22 olarak belirlenen geç apoptotik/ölu hücre popülasyonunu oluşturmaktadır [Lüpertz vd., 2010].

İnsan tiroid karsinoma hücre hatları ile yapılan diğeri bir çalışmada ise FTC-238 ve FTC-133 hücreleri 4 saatlik süre boyunca 0.5µM ve 1µM'lık Doxorubicin uygulamasının ardından gerçekleştirilen AnnexinV apoptoz testinde Doxorubicin'in herhangi bir apoptotik etkisi gözlemlenmezken, 12 ve 24. saatler sonucunda gerçekleştirilen testlerde Doxorubicin'in apoptotik etkisi her iki doz içinde FTC-238 ve FTC-133 hücrelerinde görülmüştür. 24 saat boyunca 1µM Doxorubicin uygulamasının ardından FTC-238 hücre hattından elde edilen sonuçlara göre AnnexinV +/PI - erken apoptotik hücre oranı %73,5 olurken, AnnexinV +/PI + geç apoptotik/ölu hücrelerin oranı ise %6,6 olmuştur. FTC-133 hücre hattında ise AnnexinV +/PI - erken apoptotik hücre oranı %42 olurken, AnnexinV +/PI + geç

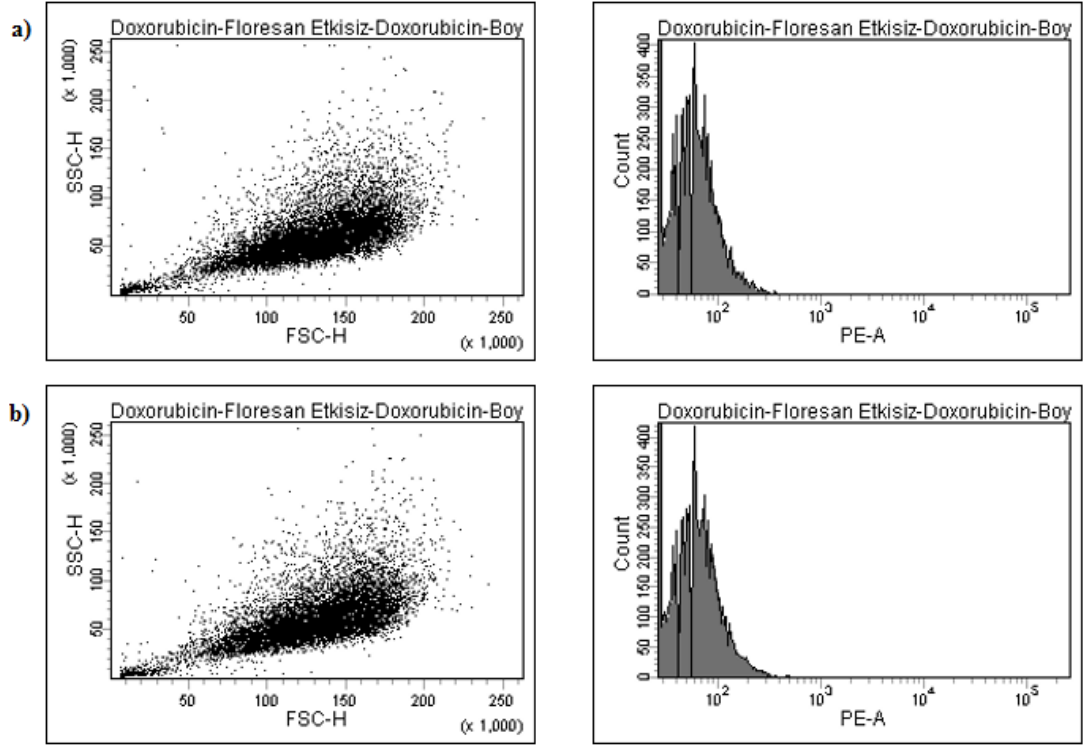
apoptotik/ölü hücrelerin oranı ise %18,7 olmuştur [Massart vd., 2004]. Bu sonuçlara göre hücre çeşidine ve Doxorubicin dozuna bağlı apoptotik etki değişmektedir.

4.5.2. PE Aktif Kaspaz-3 Testi ile Apoptozun Gösterilmesi

Topoizomeraz II inhibitörü olan Doxorubicin'in Kaspaz-3, -8, -9 gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle gösterildikten sonra protein düzeyinde aktif kaspaz-3'ün gösterilmesi akım sitometrik olarak PE Aktif Kaspaz-3 testi ile analiz edilmiştir. Ancak kontrol grupları ile karşılaştırıldığında uygulanan doz ve saatte Aktif Kaspaz-3 varlığı edilmemiştir. Doxorubicin'in ileri saat ve doz uygulamalarında protein ifadesine, geç etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Bknz. Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.).



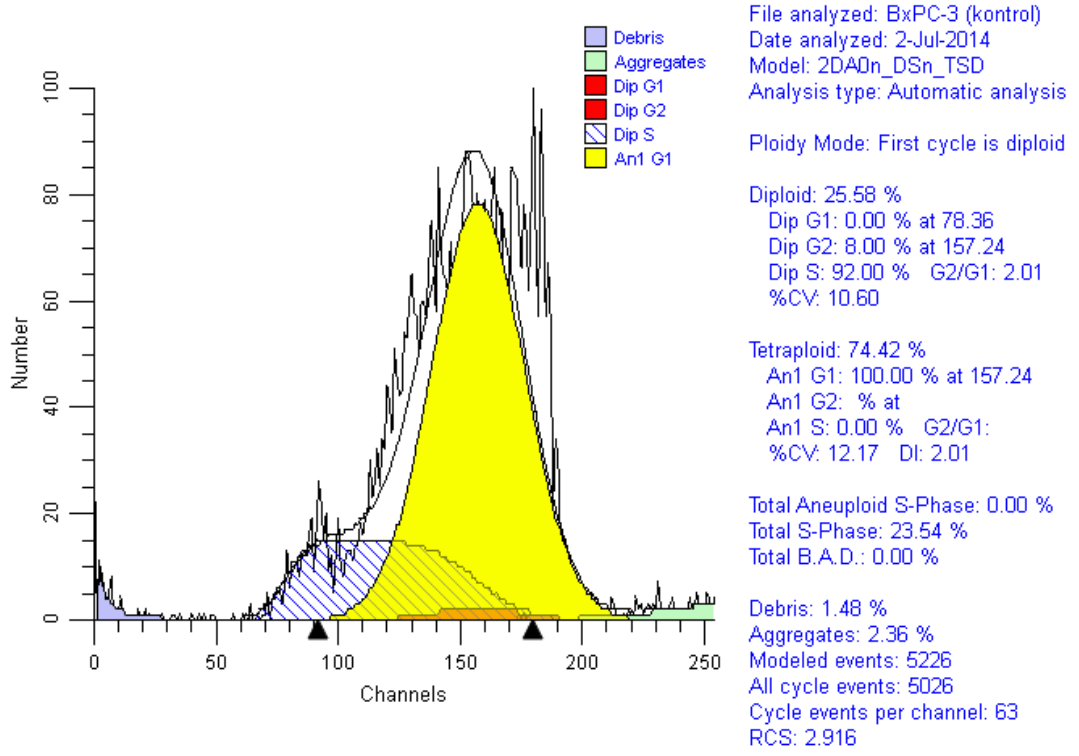
Şekil 4.11. Kontrol grubu BxPC-3 hücrelerinde Kaspaz-3 düzeyleri.



Şekil 4.12. Doxorubicin uygulaması yapılan BxPC-3 hücrelerinde Kaspaz-3 düzeyleri.

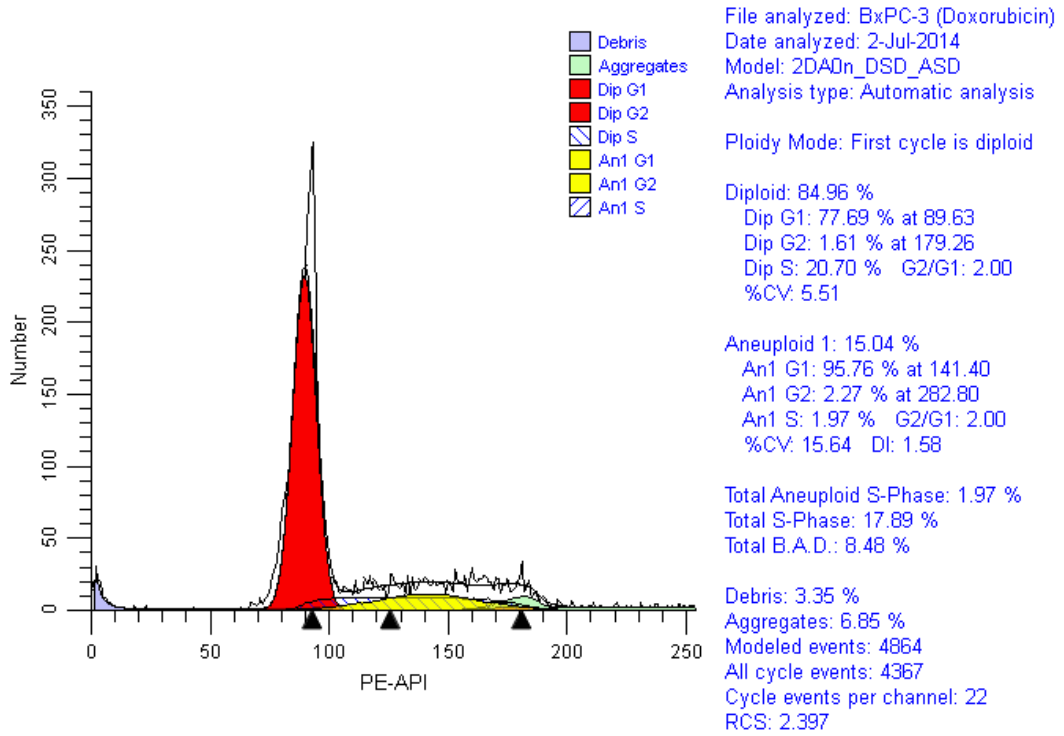
4.5.3. Hücre Döngüsü Analizi ile DNA Hasarının Gösterilmesi

Hücre döngüsü analizi farklı şekilde izole edilmiş normal veya BxPC-3 pankreas adenokarsinoma hücrelerindeki anormal DNA'lı hücre hatlarını belirlemede, buna bağlı DNA index (Di) tahmininde ve bu hücre hattında hücre döngüsü faz dağılımlarını belirlemek için kullanılmıştır. Test BD FacsARIA III akım sitometri cihazında gerçekleştirilmiş ve sonrasında ModFit LT yazılımı ile gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait hücre döngüsü analiz sonuçları

Kontrol grubu hücre popülasyonunun diploid fazdaki %25.58'lik kısmın %92'si S ve %8'i G₂ fazındadır. Tetraploid fazda gözlemlenen hücre oranı ise %74.42 olmuştur. Bu veriler kontrol grubu hücrelerinin sağlıklı bölünen hücreler olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. Doxorubicin uygulaması yapılan hücelere ait hücre döngüsü analiz sonuçları

Doxorubicin'e maruz bırakılan hücelerden diploid fazdaki hücelerin %84.96'sının; %77.69'u G₁, %20.70'i S, ve %1.61'inin G₂ fazında olduğu belirlenmiştir. Anöploid fazda %15.04 oranında hücre görülürken tetraploid fazda hücreye rastlanmamıştır (Bknz. Şekil 4.14.). Bu verilere göre topoizomeraz II inhibitörü olan Doxorubicin'in sitotoksik etkisinin hücrenin S fazına geçmesini engellediğini göstermektedir.

Doxorubicin ile BxPC-3 hücelerinde yapılan farklı bir çalışmada benzer sonuçlar gösterilmiş olup 1µg/ml ve 2µg/ml Doxorubicin dozuna maruz kalan hücelerden yaklaşık %65'nin G₁/ G₀, %25'inin G₂/M ve %10'unun S fazında olduğu gösterilmiştir [Fueger vd., 2001].

MCF-7 meme kanseri hücelerinin 0.25 µg/ml Doxorubicin'e maruz bırakılmasının ardından gerçekleştirilen hücre döngüsü analizinde; hücelerin %2'sinin G₀, %77'sinin G₁, %9'unun S ve %12'sinin G₂/M evresinde olduğu belirlenmiştir [Osman vd., 2012].

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada topoizomeraaz II inhibitörlerinden biri olan Doxorubicin DNA hasarı, süper radikal oluşumu gibi sitotoksik ve apoptotik mekanizmalarla anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Doxorubicin'in kaspaz aktivasyonuna bağlı apoptotik ve anti-tümör etki mekanizması Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve FITC AnnexinV düzeylerine bakılarak araştırılmıştır. Kaspaz gen ifadelerinin (3, 8, 9) BxPC-3 hücre hattı üzerindeki etkileri anlaşılmaaya çalışılmıştır.

Bu çalışma sonucunda;

1. xCELLigence DP sistemi kullanılarak E-Plate 16'da sitotoksisite deneylerinde kullanılacak kuyucuk başına hücre sayısı 12500 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Doxorubicin uygulama saati 26-28. saat arası olarak belirlenmiştir.
2. Doxorubicin (500 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 5 μ M, 0.5 μ M) uygulaması sonucu IC₅₀ değeri $8,64 \times 10^{-7}$ M (0.86 μ M) olarak belirlenmiştir.
3. xCELLigence DP sisteminde CIM-Plate 16 kullanılarak gerçekleştirilen migrasyon deneyleri sonucunda BxPC-3 hücrelerinin %10 FBS içeren katkılı besiyerine bağlı migrasyon göstermediği belirlenmiştir.
4. Doxorubicin dozuna bağlı Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 gen ifadesi düzeyleri 1 μ M Doxorubicin uygulanarak 3., 6., 12., 24., ve 48. saatler için qRT-PCR yöntemiyle ölçülmüştür. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin ifade düzeylerini belirlemek için $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü, referans gen olarak ise β -Aktin kullanılmıştır. Kontrol grubuna göre Kaspaz-3 için 6. saatte 4 kat, 12. saatte ise etkinin azalarak yaklaşık 2 kat olduğu, Kaspaz-8 için 6. saatte yaklaşık 9 kat, 12. saatte yaklaşık 5 kat fazla ifade edildiği görülürken, Kaspaz-9 ifadesinde ise anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

5. Akım sitometride Doxorubicin'in apoptotik etkisinin belirlenmesi için 24 saat Doxorubicin'e maruz bırakılan hücelere FITC AnnexinV testi uygulanmıştır. Test sonucunda hücrelerin %18.5'inin geç apoptotik, %9.3'ünün ise erken apoptotik evde olduğu belirlenmiştir
6. PE Aktif Kaspaz-3 testinde kontrol grubu ile ilaç uygulaması yapılan hücreler arasında anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir.
7. DNA hücre döngüsü analizi ile anti-mitotik etki (G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarındaki) yüzde oranlarına göre tutuklanma durumları karşılaştırılmıştır. İlaç uygulaması yapılan hücrelerin %77.69'unun G₁ evresinde olduğu belirlenmiştir.

Niceliksel olarak incelenen Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 gen ifadelerinin dışında, apoptoz yolağında etkili olduğu düşünülen Kaspaz-7 gen ifadesine bakılması da gerekmektedir. Ayrıca BxPC-3 hücre hattında Doxorubicin'in CREB3L1 yolağına etkisini anlamak için immünohistokimya yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Altieri, P., Spallarossa, P., Barisione, C., Garibaldi, S., Garuti, A., Fabbi, P., Ghigliotti, G., Brunelli, C., “Inhibition of doxorubicin-induced senescence by PPAR δ activation agonists in cardiac muscle cells: cooperation between PPAR δ and Bcl6”, *PLoS One*, 7(9): e46126, (2012).
- Anderson, L.N., Cotterchio, M., Gallinger, S., “Lifestyle, dietary, and medical history factors associated with pancreatic cancer risk in Ontario, Canada”, *Cancer Causes Control*, 20(6): 825-834, (2009).
- Arao, S., Masumoto, A., Otsuki, M., “Beta1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells”, *Pancreas*, 20, 129–137, (2000).
- Arlt, A., Vorndamm, J., Breitenbroich, M., Fölsch, U.R., Kalthoff, H., Schmidt, W.E., Schafer, H., “Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin”, *Oncogene*, 20(7): 859-868, (2001).
- Aubert, M., Crotte, C., Bernard, J.P., Lombardo, D., Sadoulet, M.O., Mas, E., “Decrease of human pancreatic cancer cell tumorigenicity by alpha1,3galactosyltransferase gene transfer” *Int J Cancer*, 107, 910–918, (2003).
- Boyle, P., Maisonneuve, P., De Mesquita, B.B., Ghadirian, P., Howe, G.R., Zatonski, W., Baghurst, P., Moerman, C.J., Smard, A., Miller, A.B., Przewoniak, K., McMichael, A.J., Hsieh, C.C., Walker, A.A., “Cigarette Smoking and Pancreas Cancer: A Case-Control Study of The Search Programme of the IARC” *Int. J. Cancer.*, 67, 63-71, (1996).
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A., “The role of DNA fragmentation in apoptosis”, *Trends Cell Biol*, 5, 21–26, (1995).

- Bracci, P.M., "Obesity and pancreatic cancer: Overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms", *Molecular Carcinogenesis*, 51(1): 53-63, (2012).
- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Jenai, M.K., Guthrie, L.A., Henson, P.M., "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase." *J. Biol. Chem.*, 272, 26159-26165, (1997).
- Callery, M.P., Chang, K.J., Fishman, E.K., Talamonti, M.S., Traverso, L.W., Linehan, D.C., "Pretreatment Assessment of Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Expert Consensus Statement", *Ann Surg Oncol.*, 16(7): 1727-1733, (2009).
- Carpelan-Holmström, M., Louhimo, J., Stenman, U.H., Alfthan, H., Haglund, C., "CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers.", 22(4): 2311-2316, (2002).
- Cohen, G.M., "Caspases: the executioners of apoptosis", *Biochem J.*, 326(1): 1-16, (1997).
- Deer, E.L., Gonzalez-Hernandez, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Scaife, C.L., Firpo, M.A., Mulvihill, S.J., "Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines", *Pancreas.*, 39(4): 425-435, (2010).
- Denard, B., Lee, C., Ye, J., "Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1." *eLife* 1:e00090, (2012).
- Denard, B., Seemann, J., Chen, Q., Gay, A., Huang, H., Chen, Y., Ye, J., "The membrane-bound transcription factor CREB3L1 is activated in response to virus infection to inhibit proliferation of virus-infected cells", *Cell Host Microbe*, 10, 65–74, (2011).

- Duffy, M.J., Sturgeon, C., Lamerz, R., Haglund, C., Holubec, V.L., Klapdor, R., Nicolini, A., Topolcan, O., Heinemann, V., “Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report”, *Ann Oncol.*, 21(3): 441-447, (2010).
- Edge, S.B., Compton C.C., “The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM”, *Ann Surg Oncol*, 17: 1471-1474, (2010).
- Elmore, L.W., Rehder, C.W, Di, X., Mc Chesney, P.A., Jackson-Cook, C.K., Gewirtz, D.A, Holt, S.E., “Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction”, *J Biol Chem.*, 277(38): 35509-35515, (2002).
- Elmore, S., “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death”, *Toxicol Pathol.*, 35(4): 495-516, (2007).
- Farrell, T.J., Barbot, D.J., Rosato, F.E., “Pancreatic resection combined with intraoperative radiation therapy for pancreatic cancer”, *Ann Surg.*, 226, 66–69, (1997).
- 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 CancerBase No. 11”, International Agency for Research on Cancer, <http://globocan.iarc.fr> (2012)
- Freelove, R., Walling A.D., “Pancreatic cancer: diagnosis and management”, *Am Fam Physician*, 73(3): 485-492, (2006).
- Fueger, B.J., Hamilton, G., Raderer, M., Pangerl, T., Traub, T., Angelberger, P., Baumgartner, G., Dudzcak, R., Virgolini, I., “Effects of chemotherapeutic

agents on expression of somatostatin receptors in pancreatic tumor cells.” *J Nucl Med.*, 42(12): 1856-1862, (2001).

Fukasawa, M., Korc, M., “Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines” *Clin Cancer Res*, 10, 3327–3332, (2004).

Funahashi, H., Takeyama, H., Sawai, H., Furuta, A., Sato, M., Okada, Y., Hayakawa, T., Tanaka, M., Manabe, T., “Alteration of integrin expression by glial cell linederived neurotrophic factor (GDNF) in human pancreatic cancer cells”, *Pancreas*, 27, 190–196, (2003).

Gewirtz, D., “A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin”, *Biochem Pharmacol.*, 57, 727-741, (1999).

Givant-Horwitz, V., Davidson, B., Reich, R., “Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the M(r) 67,000 laminin receptor.” *Cancer Res*, 64, 3572–3579, (2004).

Greco, E., Basso, D., Fogar, P., Mazza, S., Navaglida, F., Zambon, C.F., Falda, A., Pedrazolli, S., Ancona, E., Plebani, M., “Pancreatic cancer cells invasiveness is mainly affected by interleukin-1beta not by transforming growth factor-beta1” *Int J Biol Markers*, 20, 235–241, (2005).

Greene, F.L., “American Joint Committee on Cancer, American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual 6th ed.*”, Springer, New York, 294 s., (2002).

Groopman, J., “How doctors think? 1st ed.”, Houghton Mifflin, United States, 305 s., (2007).

- Hochwald, S.N., Zee, S., Conlon, K.C., Colleoni, R., Louie, O., Brennan, M.F., Klimstra, D.S., “Prognostic factors in pancreatic endocrine neoplasms: an analysis of 136 cases with a proposal for low-grade and intermediate-grade groups”, *J Clin Oncol.*, 20(11): 2633-2642, (2002).
- Hu, S., Snipas, S.J., Vincenz, C., Salvesen, G., Dixit, V.M., “Caspase- 14 is a novel developmentally regulated protease”. *J Biol Chem*, 273, 29648–29653, (1998).
- Hurley, L.H., “DNA and its associated processes as targets for cancer therapy”, *Nature Reviews Cancer*, 2, 188-200, (2002).
- Jemal, A., Clegg, L.X., Ward, E., Ries, L.A., Wu, X., Jamison, P.M., et al. “Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival”, *Cancer*, 101: 3-27, (2004).
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S.M., Fu, B., Lin, M.T., Calhoun, E.S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., Smith, D.R., Hidalgo, M., Leach, S.D., Klein, A.P., Jaffee, E.M., Goggins, M., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C., Eshleman, J.R., Kern, S.E., Hruban, R.H., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses", *Science*, 321(5897): 1801–1806, (2008).
- Kang, S.J., Wang, S., Kuida, K., Yuan, J., “Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response” *Cell Death Differ*, 9, 1115–11125, (2002).
- Klapman, J., Malafa, M.P., “Early Detection of Pancreatic Cancer: Why, Who, and How to Screen”, *Cancer Control*, 15(4): 280-287, (2008).

- Kleeff, J., Friess, H., Berberat, P.O., Martignoni, M.E., Z'graggen, K., Büchler, M.W., "Pancreatic cancer--new aspects of molecular biology research", *Swiss Surg.*, 6, 231–234, (2000).
- Klimstra, D.S., "Nonductal neoplasms of the pancreas", *Mod Pathol.*, 20(1): 94-112, (2007).
- Kloppel, G., Solcia, E., Longnecker, D.S., Capella, C., Sobin, L.H., "Histological Typing of Tumors of the Exocrine Pankreas, 2nd ed.", Springer, Heidelberg, 61 s., (1996).
- Lal, M., Caplan, M., "Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions", *Physiology (Bethesda)*, 26, 34–44, (2011).
- Lohr, M., Trautmann, B., Gottler, M., Peters, S., Zauner, I., Maier, A., Klöppel, G., Liebe, S., Kreuser, E.D., "Expression and function of receptors for extracellular matrix proteins in human ductal adenocarcinomas of the pancreas", *Pancreas*, 12, 248–259, (1996).
- Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R.W., Lankisch, P.G., Andersen, J.R., Dimango, E.P., Andren-Sandberg, A., Domellöf, L., and The International Pancreatitis Study Group, "Pancreatitis and The Risk of Pancreatic Cancer", *N Engl J Med.*, 328(20): 1433-1437, (1993).
- Loukopoulos, P., Kanetaka, K., Takamura M., Shibata, T., Sakamoto, M., Hirohasi, S., "Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity", *Pancreas*, 29,193–203, (2004).
- Lüpertz, R., Watjen, W., Kahl, R., Chovolou, Y., "Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells", *Toxicology*, 271(3): 115-121, (2010).

- Marchesi, F., Monti, P., Leone, B.E., Zerbi, A., Vecchi, A., Piemonti, L., Mantovani, A., Allavena, P., “Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4.”, *Cancer Res.*, 64, 8420–8427, (2004).
- Massart, C., Barbet, R., Genetet, N., Gibassier, J., “Doxorubicin induces Fas-mediated apoptosis in human thyroid carcinoma cells”, *Thyroid*, 14(4): 263-270, (2004).
- McIntyre, L.J., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Kim, Y.S., “Attachment of human pancreatic tumor cell lines to collagen in vitro.”, *Cancer Res.*, 41, 3296–3299, (1981).
- McKay, C.J., Glen, P., McMillan, D.C., “Chronic inflammation and pancreatic cancer”, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 22(1): 65-73, (2008).
- Metz, C.D., Jensen R.T., “Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors: Pancreatic Endocrine Tumors”, *Gastroenterology*, 135(5): 1469-1492, (2008).
- Miknyoczki, S.J., Chang, H., Klein-Szanto, A., Dionne, C.A., Ruggeri, B.A., “The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma”, *Clin Cancer Res*, 5, 2205–2212, (1999).
- Minko, T., Kopeckova, P., Kopecek, J., “Preliminary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells”, *J Control Release*, 71(3): 227-237, (2001).
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L., “Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity”, *Pharmacol Rev.*, 56, 185–229, (2004).

- Nakamura, T., Fidler, I.J., Coombes, K.R., “Gene expression profile of metastatic human pancreatic cancer cells depends on the organ microenvironment”, *Cancer Res*, 67, 139–148, (2007).
- Nio, Y., Ohmori, H., Minari, Y., Hirahara, N., Sasaki, S., Takamura, M., Tamura, K., “A quinolinone derivative, vesnarinone (OPC-8212), significantly inhibits the in vitro and in vivo growth of human pancreatic cancer cell lines”, *Anticancer Drugs*, 8, 686–695, (1997).
- Norbury, C.J., Hickson, I.D., “Cellular responses to DNA damage”, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 41, 367-401, (2001).
- Osman, A.M., Bayoumi, H.M., Al-Harthi, S.E., Damanhour, Z.A., Elshal, M.F., “Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line”, *Cancer Cell Int.*, 12(1): 47-55, (2012).
- Pannala, R., Basu, A., Petersen, G.M., Chari, S.T., “New-onset Diabetes: A Potential Clue to the Early Diagnosis of Pancreatic Cancer”, *Lancet Oncol.*, 10(1): 88-95, (2009).
- Pfaffl, M.W., “A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR”, *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2003-2007, (2001).
- Pericleous, M., Rossi R.E., Mandair, D., Whyand, T., Caplin, M.E., “Nutrition and Pancreatic Cancer”, *Anticancer Research*, 34: 9-22, (2014).
- Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V.K., “Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing”, *Int J Low Extrem Wounds*, 4, 138–144, (2005).
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P.M., Mirkin, B.L., “Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence”, *Oncogene*, 22(18): 2805-2811, (2003).

- Sawai, H., Yamamoto, M., Okada, Y., Sato, M., Akamo, Y., Takeyama, H., Manabe, T., "Alteration of integrins by interleukin-1alpha in human pancreatic cancer cells", *Pancreas*, 23, 399–405 (2001).
- Scihima, W., Függer, R., Schober, E., Oettl, C., Wamser, P., Grabenwöger, F., Ryan, J.M., Novacek, G., "Diagnosis and Staging of Pancreatic Cancer: Comparison of Mangafodipir Trisodium—Enhanced MR Imaging and Contrast-Enhanced Helical Hydro-CT", *AJR Am J Roentgenol.*, 179(3): 717-724, (2002).
- Shain, A.H., Giacomini, C.P., Matsukuma, K., Karikari, C.A, Bashyam, M.D., Hidalgo, M., Maitra, A., Pollack, J.R., "Convergent structural alterations define SWItch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) chromatin remodeler as a central tumor suppressive complex in pancreatic cancer". *PNAS*, 109(5): 252–259, (2012).
- Stahle, M., Veit, C., Bachfischer, U., Schierling, 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).
- Sun, C., Yamato, T., Furukawa, T., Ohnishi, Y., Kijima, H., Horii, A., "Characterization of the mutations of the K-ras, p53, p16, and SMAD4 genes in 15 human pancreatic cancer cell lines", *Oncol. Rep.*,8, 89–92, (2001).
- Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C.R., "Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems", *J Pharm Pharmacol.*, 65(2): 157-170, (2013).
- Tait, S.W., Green, D.R., "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond", *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(9): 621-632, (2010).

- Takada, M., Nakamura, Y., Koizumi, T., Toyama, H., Kamigaki, T., Suzuki, Y., Takeyama, Y., KurOda, Y., “Suppression of human pancreatic carcinoma cell growth and invasion by epigallocatechin-3-gallate”, *Pancreas*, 25, 45–48, (2002).
- Taylor, D.J., Parsons, C.E., Han, H., Jayaraman, A., Rege, K., “Parallel screening of FDA-approved antineoplastic drugs for identifying sensitizers of TRAIL-induced apoptosis in cancer cells”, *BMC Cancer*, 11:470, doi: 10.1186/1471-2407-11-470, (2011).
- Tong, W.G., Ding, X.Z., Hennig, R., Witt, R.C., Standop, J., Pour, P.M., Adrian, T.E., “Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells”, *Clin Cancer Res*, 8, 3232–3242, (2002).
- Tramacere, I., Scotti, L., Jenab, M., Bagnardi, V., Bellocco, R., Rota, M., Corrao, G., Bravi, F., Boffetta, P., La Vecchia, C., “Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation”, *Int. J. Cancer*, 126, 1474-1486, (2010).
- Varadarajulu, S., Wallace, M.B.,” Applications of endoscopic ultrasonography in pancreatic cancer”, *Cancer Control.*, 11(1): 15-22, (2004).
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., “Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer”, *Ann Hematol.*, 84(10): 627-639, (2005).
- Wang, F., Herrington, M., Larsson., Permert, J., “The relationship between diabetes and pancreatic cancer”, *Molecular Cancer*, 2(4): 1-4, (2003).
- Wong, J.C., Lu, D.S., “Staging of pancreatic adenocarcinoma by imaging studies.”, *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 6(12): 1301-1308, (2008).

Yao, J.C., Eisner, M.P., Leary, C., Dagohoy, C., Phan, A., Rashid, A., Hassan, M., Evans D.B., "Population-Based Study of Islet Cell Carcinoma", *Annals of Surgical Oncology*, 14(12): 3492-3500, (2007).

Zhu, L., Qin, H., Li, P.Y., Xu, S.N., Pang, H.F., Zhao, H.Z., Li, D.M., Zhao, Q., "Response gene to complement-32 enhances metastatic phenotype by mediating transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell line BxPC-3", *J Exp Clin Cancer Res.*, 31(1): doi: [10.1186/1756-9966-31-29](https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-29), (2012).

EKLER

EK-1. Hücrelerin Çözülmesi

1. Bir beher içine distile su koyup 37°C'ye kadar ısınması beklenir.
2. Azot tankından içinde dondurulmuş hücreler bulunan dondurma tüpü çıkarılır.
3. Çıkarılan dondurma tüpü hemen buz aküsü üzerine koyulur.
4. Dondurma tüpü buz aküsü üzerinde ısınan su banyosu yanına taşınır.
5. Dondurma tüpü su banyosu içine koyulur.
6. 1-2 dakika beklenir.
7. Su banyosundan dondurma tüpü alınır ve çevresi temiz kağıt havlu ile kurulanır.
8. Dondurma tüpü çevresine alkol sıkılır.
9. Tekrar kurulanır.
10. Bir tüp içine 7-9 ml besiyeri koyulur.
11. Dondurma tüpü içindeki hücre karışımı sıvı çekilip tüpe koyulur.
12. Pipetaj yapılır.
13. 500xg'de 5 dakika santrifüj edilir.
14. Santrifüj sonrası tüpün üstündeki supernatant pastör pipeti ile çekilerek atılır.
15. Tüpün dibinde kalan pelete besiyeri eklenir.
16. Eklenen besiyeri ile nazikçe pipetaj yapılır.
17. Tüpte oluşan hücre+besiyeri karışımı pipet ile çekilerek kültür kabına ekilir.
18. Kültür kabına 2 ml besiyeri eklenir.
19. Mikroskopta hücreler kontrol edilir.
20. Kültür kabı 37°C ve %5'lik CO ₂ 'li etüve yerleştirilir.

EK-2. Hücrelerin Subkültürü (Pasajlama)

1. Etüvdeki kültür kabı dışarı alınır ve mikroskopta hücrelerin canlılığı ve pasajlama zamanının gelip gelmediği değerlendirilir.
2. Hücre kabının hücre olmayan köşesine biriktirilen besiyeri, pastör pipeti ile çekilir.
3. Kültür kabındaki hücreler PBS ile yıkanır. (w/o Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺)
4. Başka bir pipet ile 2-3 ml Tripsin kültür kabına eklenir.
5. 37°C'de etüvde 5 dakika bekletilir.
6. Etüvden alınan hücrelerin tripsin ile muamele sonrası kalkıp kalkmadığı mikroskopta değerlendirilir. Hücreler kalkmamış ise bir süre daha inkübe edilir.
7. Pipet ile hücreler ve tripsin bir tüpe alınır; üzerine bir miktar besiyeri eklenir.
8. 500xg'de 5 dakika santrifüj edilir.
9. Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstündeki supernatant pastör pipeti ile çekilerek atılır.
10. Pellet üzerine besiyeri eklenir.
11. Eklenen besiyeri ile 1-2 kez pipetaj yapılır.
12. Hücreler ve besiyerinden oluşan karışım miktarı 4'e bölünür*.
13. Hücrelere zarar verilmeden çekilir ve 4 kültür kabına eşit olarak hücreler ekilir.
14. Kültür kabı üzerine hücre tipi, işlemin tarihi, kaçınıcı pasaj olduğu ve kullanılan besiyeri yazılır.
15. Kültür kaplarının üzerine 2ml besiyeri eklenir.
16. Kültür kabına ekilen hücreler mikroskopta incelenir.
17. Kültür kabı 37°C ve %5'lik CO ₂ 'li etüve yerleştirilir.

*Bu miktar her çalışma için farklıdır.

EK-3. Hücrelerin Dondurulması

1. Etüvdeki kültür kabı dışarı alınır ve mikroskopta hücrelerin canlılığı değerlendirilir.
2. Hücre kabının hücre olmayan köşesine biriktirilen besiyeri laminar kabin içerisinde pastör pipeti ile çekilir.
3. Başka bir pipet ile 2-3 ml Tripsin kültür kabı üzerine eklenir.
4. 37°C'de etüvde 5 dakika bekletilir.
5. Etüvden alınan hücrelerin tripsin ile muamele sonrası kalkıp kalkmadığı mikroskopta değerlendirilir. Hücreler kalkmamış ise bir süre daha inkübe edilir.
6. Pipet ile hücreler ve tripsin bir tüpe alınır, üzerine bir miktar besiyeri eklenir.
7. 500xg'de 5 dakika santrifüj edilir.
8. Bu sırada dondurma tüpü içine 700µl medium, 200µl FCS, 100µl DMSO konulup buz üzerinde bekletilir.
9. Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstündeki supernatant pastör pipeti ile çekilerek atılır.
10. Dondurma tüpünde hazırlanan solüsyonla hücre pelleti 1-2 kez pipetaj yapılır. Hücrelere zarar verilmeden hepsi çekilir.
11. Dondurma tüpüne alınır. Dondurma tüpü üzerine hücre tipi, işlemin tarihi, kaç kez pasajlandığı (T ₁ /P ₁) ve kullanılan besiyeri yazılır.
12. +4°C'de 3-4 saat bekletilir.
13. -20°C'de 1 gece (8-10 saat); varsa bir süre -80°C'de bekletilir.
14. Sonrasında sıvı azot tankına aktarılır.

EK-4. Aktif Kaspaz-3 Boyama Protokolü

1. BD Perm/Wash Buffer (10x) 1:10 olacak şekilde dilüe edilir. 1 ml Perm/Wash Buffer falkon tüpe eklenir ve üzerine 9 ml steril su eklenir. Eğer hazırlanan seyreltik Perm/Wash Buffer (1x) herhangi bir çökelti, tortu olursa 0.45 µm filtreden geçirilmesi gerekmektedir. (HAZIRLIK)
2. Deneyde kullanılacak örnek başına 100 µl Perm/Wash Buffer (1x) ve 20 µl antibody eklenerek karışım hazırlanır. (HAZIRLIK)
3. Hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkanır ve 5 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edilir.
4. Santrifüj sonrası süpernatant atılır.
5. BD Cytofix/Cytoperm içerisinde resüspanse edilir. ($1 \times 10^6 / 0.5$ ml .. Yani 1 milyon hücre olduğunda 500 µl)
6. Hücreler 20 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilir.
7. İnkübasyon sonrası hücreler 5 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edilir.
8. Süpernatant atılır ve hücreler Perm/Wash Buffer (1x) ($1 \times 10^6 / 0.5$ ml .. Yani 1 milyon hücre olduğunda 500 µl) ile yıkanır.
9. 5 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edilir.
10. Süpernatant atılır ve hücreler Perm/Wash Buffer (1x) ($1 \times 10^6 / 0.5$ ml .. Yani 1 milyon hücre olduğunda 500 µl) ile yıkanır.
11. 5 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edilir.
12. Süpernatant atılır. Her tüpe ($1 \times 10^6 / 0.1$ ml .. Yani 1 milyon hücre olduğunda 100 µl) Perm/Wash Buffer (1x) eklenir ve üzerine ($1 \times 10^6 / 20$ µl antibody) eklenerek resüspanse edilir.
13. 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
14. Her test tüpüne 1 ml Perm/Wash Buffer (1x) eklenir.
15. 5 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edilir.
16. Süpernatant atılır ve her test tüpüne 500 µl Perm/Wash Buffer (1x) eklenir ve akım sitometri cihazında analiz edilir.

EK-5. FITC AnnexinV Boyama Protokolü

Hazırlanması gereken solüsyonlar:

10x FITC AnnexinV Buffer'dan 1 ml alınır ve üzerine 9 ml su eklenir. Böylece 10 ml 1x FITC AnnexinV Buffer elde edilmiş olur.

Kullanılması önerilen kontroller:

1. FITC AnnexinV ve PI ile BOYANMAMIŞ hücreler.
2. FITC AnnexinV ile BOYANMIŞ hücreler (PI eklenmemiş).
3. PI ile BOYANMIŞ hücreler (FITC AnnexinV eklenmemiş).

Staining (Boyama):

1. Hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkanır ve hücreler 1x Binding Buffer ile resüspanse edilir. (1×10^6 cells/ml.. (Yani 1 milyon hücreye 1 mililitre koyuyoruz.)
2. Hazırlanan bu karışımın 100 μ l'si (1×10^5) 5 ml'lik kültür tüpüne aktarılır.
3. Daha sonra bu tüp içerisine 5 μ l FITC AnnexinV ve 5 μ l PI eklenir.
4. Hücreler karıştırılır ve karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edilir.
5. Tüm tüplere 400 μ l 1x Binding Buffer eklenir ve 1 saat içerisinde Akım Sitometri cihazında okutulur.

Bu işlem sonrasında tüm tüplere 400 μ l 1x Binding Buffer eklenir ve 15 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılır.

EK-6. CycleTest™ PLUS DNA Reagent Kit Protokolü

Hücrelerin Hazırlanması;

1. Hücre süspansiyonu öncelikle 17x100 mm'lik FACS tüplerine alınır.
2. 5 dakika 300xg'de oda sıcaklığında santrifüj edilir.
3. Süpernatant atılır. Tüpün dibindeki pellete zarar vermemek için yaklaşık 50 µl kadar süpernatant bırakılabilir.
4. Üzerine 1 ml Buffer Solüsyonu eklenir ve hücreler düşük hızda köpürtülmeden çalkalanır.
5. 5 dakika 300xg'de oda sıcaklığında santrifüj edilir.
6. Süpernatant atılır. Tüpün dibindeki pellete zarar vermemek için yaklaşık 50 µl kadar süpernatant bırakılabilir.
7. Üzerine 1 ml Buffer Solüsyonu eklenir ve hücreler düşük hızda köpürtülmeden çalkalanır.
8. 5 dakika 300xg'de oda sıcaklığında santrifüj edilir.
9. Süpernatant atılır. Tüpün dibindeki pellete zarar vermemek için yaklaşık 50 µl kadar süpernatant bırakılabilir.
10. Üzerine 1 ml Buffer Solüsyonu eklenir ve hücreler düşük hızda köpürtülmeden çalkalanır.
11. Hücre sayım cihazında sayım yapılır ve Buffer Solüsyonu ile konsantrasyon 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanır.

Boyama Protokolü;

Not: Solüsyon A ve B oda sıcaklığına ulaştırıldıktan sonra kullanılmalıdır. Solüsyon C ise soğuk olarak (2°C - 8°C) karanlıkta bekletilmelidir.

12. Oda sıcaklığında 5 dakika 400xg'de santrifüj edilir.
13. Süpernatant tamamen dökülür ve son damla peçeteye alınır.
14. Tüpe 250 µl Solüsyon A (Trypsin Buffer) tüm tüplere eklenir ve el ile vurularak karışması sağlanır. (Vorteks yapma).
15. Karıştırma işlemi sonrasında Solüsyon A'nın etkisini gösterebilmesi için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanır.

16. Solüsyon A boşaltılmadan üzerine 200 µl Solüsyon B (Tyripsin Inhibitör and RNase Buffer) eklenir ve tüplerin dibine el ile vurularak karışması sağlanır. (Vorteks yapma).
17. Karıştırma işlemi sonrasında Solüsyon B'nin etkisini gösterebilmesi için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanır.
18. İnkübasyon sonrasında Solüsyon A ve B boşaltılmaz ve üzerine 200 µl (2°C - 8 °C) soğuk olarak Solüsyon C (Propidium Iodide Stain Solution) tüm tüplere eklenir. Hızlıca karıştırılır ve 10 dakika boyunca karanlıkta ve buzdolabında inkübasyonu sağlanır.
19. Örnekler 50 µm ve 35 µm çapında filtre kullanılarak 12x75 mm tüplere aktarılır.
20. Örnekler akım sitometri cihazında kullanılmak üzere hazır hale gelir. Akım sitometri analizlerine kadar kapakları kapalı şekilde karanlık buzdolabında saklanabilir.
21. Not: Solüsyon C eklendikten sonra 3 saat içerisinde akım sitometri analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Buzdolabında saklanan örnekler çalışılmadan önce tüpün dibine vurularak homojen hale gelmesi sağlanmalıdır.

EK.7. DNA QC Particles Protokolü

Bu protokol BD CycleTEST PLUS yapılmadan önce yapılması gereken optimizasyon işlemlerini içermektedir. Bu aşamada hazırlanması gereken 3 solüsyon vardır. Bunlar;

CEN solüsyonunun içeriği;

1 ml PI boyama solüsyonu (D vial) + 40 µl CEN (A vial) alınarak FACS tüpüne aktarıldıktan sonra karıştırılarak kapağı kapatılır ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirilir.

Saklama koşulları yerine getirildiği durumlarda (2°C - 8 °C sıcaklığında ve karanlık) 4 saat boyunca aktivitesini korumaktadır.

CTN solüsyonunun içeriği;

1 ml PI boyama solüsyonu (D vial) + 40 µl CTN (B vial) alınarak FACS tüpüne aktarıldıktan sonra karıştırılarak kapağı kapatılır ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirilir.

Saklama koşulları yerine getirildiği durumlarda (2°C - 8 °C sıcaklığında ve karanlık) 4 saat boyunca aktivitesini korumaktadır.

2-µm Beads solüsyonunun içeriği;

Bead şişesini sağlıklı bir şekilde vorteks ediniz. FACS tüpü içerisindeki filtre edilmiş 1ml PBS içerisine 2-µm Beads (C vial) bir damla damlatınız ve vorteksleyiniz.

Dilüe edilmiş 2-µm Beads solüsyonu saklama koşulları yerine getirildiği durumlarda (2°C - 8 °C sıcaklığında ve karanlık) 12 saat boyunca aktivitesini korumaktadır.

Hazırlanan solüsyonlar sırası ile akım sitometri cihazına okutulur ve gerekli voltaj ve kompanzasyon ayarlarından sonra ise örnek okutulur ve elde edilen analiz sonucu ModFit LT programı yardımıyla analiz edilir.

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Turhan YILMAZ

Doğum Tarihi: 20/03/1990

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen Bilimleri	Ticaret Borsası Lisesi	2004-2008
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2008-2012
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2012-2014

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Ay, G., Kaçar, Y., Ünal, S., Özçimen, A.A., Yılmaz, T., Basut, N., "Orak Hücre Hastası Çocuklarda PONL55M ve PONQ192R Polimorfizmleri Analizi", I.Hematolojik Genetik Sempozyumu, İzmir, (2013). (Poster).