

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EHRİCH ASİT TÜMÖRÜ TAŞIYAN
SWISS ALBİNO TÜRÜ FARELERDE
RHO-KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNDEN
Y-27632 MADDESİNİN ANTİTÜMÖRAL
ETKİSİNİN İN VİVO OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DERYA İŞLER
AĞUSTOS 2011**

**Ehrlich Asit Tumorü Taşıyan *Swiss Albino* Türü
Farelerde Rho- Kinaz İnhibitörlerinden Y-27632
Maddesinin Antitümöral Etkisinin İn vivo Olarak
Araştırılması.**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN**

**Derya İŞLER
Ağustos 2011**

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

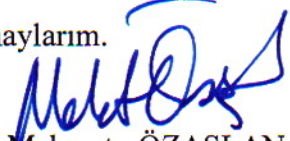
Tezin Adı: Ehrlich Asit Tümörü Taşıyan Swiss Albino Türü Farelerde Rho-kinaz
İnhibitörlerinden Y-27632 Maddesinin Antitümöral Etkisinin İn vivo Olarak
Araştırılması.

Öğrencinin, Adı Soyadı: Derya İŞLER
Tez Savunma Tarihi: 04.08.2011

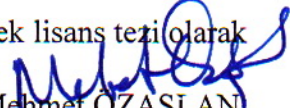
Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı


Prof. Dr. Ramazan KOÇ
FBE Müdürü

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

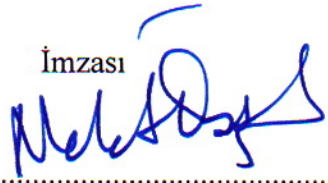

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

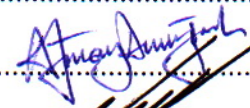
Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN



Prof. Dr. A.Tuncay DEMİRYÜREK



Prof. Dr. Metin KARAKÖK



Doç. Dr. Canan CAN



Yrd. Doç. Dr. I. Didem KARAGÖZ



ÖZET

Ehrlich Asit Tümörü Taşıyan *Swiss Albino* Türü Farelerde Rho-kinaz İnhibitörlerinden Y-27632 Maddesinin Antitümöral Etkisinin *In vivo* Olarak Araştırılması.

İŞLER Derya

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Ağustos 2011, 89 sayfa

Sinyal iletiminden sorumlu olan Rho proteinleri ve efektörlerinden biri olan Rho-kinaz hücre tipine bağlı olarak kontraktilitede, hücre permeabilitesinde, migrasyonda ve proliferasyonda değişikliğe ve apoptozise neden olabilir. Bütün bu fonksiyonlar, kanser gelişmesi ve ilerlemesi için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, Rho-kinaz inhibitörlerinden Y-27632 maddesinin Ehrlich asit tümörü (EAT) taşıyan *Swiss Albino* türü farelere intraperitoneal olarak verilerek *in vivo* da antitümöral etkisi araştırılmıştır. Altısı deney, üçü kontrol olmak üzere dokuz grup oluşturulmuştur. (Her bir grupta n=10) Çalışma Y-27632 (0,1-1-10 mg/kg/gün) inhibitör maddesiyle 2 aşamalı olarak (tümör öncesi ve tümör sonrası) yapılmıştır. Deney süresince tüm grupların kilo değişimleri kaydedilmiştir. Her iki aşamalı çalışmanın sonucunda hayvanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilmiştir. Hayvanların ince barsak ve kalın barsakları alınmış ve incelenmiştir. Deney başlangıcında ve sonrasında EAT hücreleri cedex XS cihazında sayılmış ve kıyaslama yapılmıştır. Tüm gruplarda tümör yükünden dolayı kilo artışı gözlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, tümör öncesi ve tümör sonrası gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında tümör öncesi ikinci gruba ait Y-27632 maddesinin 1 mg/kg olan dozunun EAT'ye karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rho-kinaz, Y-27632, Ehrlich, antitümöral

ABSTRACT

In vivo Investigation of the Antitumoral Effect of Rho-kinase Inhibitor Y-27632 Against to Ehrlich Ascites Tumor in *Swiss Albino* Mice

İŞLER Derya

Master Thesis, Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

August 2011, 89 pages

The Rho proteins which are responsible for signal transduction and Rho-kinase which is one of the Rho proteins cause contractility, cell permeability, differentiation in migration and proliferation and apoptosis depending on cell types. All of these functions are vital for cancer initiation and progression. In this study, *in vivo* antitumoral effect of Rho kinase inhibitor Y-27632 against to Ehrlich ascites tumor (EAT) in *Swiss albino* mice was investigated. Nine groups; six experimental, three control groups were included (for each group n=10). Y-27632 (0,1-1-10 mg/kg) was given to groups as two steps before and after treatment. During experiment, weight changes of all animals were recorded. All animals were sacrificed by ether anesthesia and intestine and colon tissues were taken and investigated pathologically. EAT cells were counted by cedex XS cell counter before and after experiment. According to data when before and after tumor groups compared, it was determined that 1 mg/kg dose Y-27632 belonging to second before tumor groups was determined to be effective against to EAT.

Key words: Rho-kinase, Y-27632, Ehrlich, Antitumoral

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteği sağlayan, deneyimleriyle her türlü konuda bana yol gösteren sevgili hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a;

Çalışmamın tüm aşamalarında tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşan, çalışmam süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ'e;

Çalışmam süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her türlü sorunumda tecrübelerinden yararlandığım sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ'a;

Tezimin uygulama aşamasında emeği geçen sevgili arkadaşım İzzettin GÜLER'e; ve diğer yüksek lisans arkadaşlarıma;

Çalışmamın patolojik değerlendirmelerini yapan ve bilgilerini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Metin KARAKÖK'e;

Çalışmam boyunca desteklerini ve bilgilerini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. A.Tuncay DEMİRYÜREK'e;

Tezimdeki çalışmamın patolojik alanında yardımcı olan Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü teknik kadrosuna ;

Hayatım boyunca beni her türlü konuda destekleyen ve arkamda olan canım ANNEM'e ve sevgili AİLEM'e;

Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Murat CEYHAN'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu tez çalışması TF 10.06 nolu proje olarak GAÜNBP tarafından desteklenmiştir.

Derya İŞLER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Deneysel Kanser Modelleri.....	3
1.1.1. Tarihçe.....	3
1.1.2. Deney Hayvanlarının Kullanımı.....	5
1.1.3. Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller.....	6
1.1.4. Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modelleri.....	6
1.1.4.1. Ehrlich Deneysel Tümör Modeli.....	7
1.1.4.1.1. Ehrlich Asit Tümörü.....	7
1.1.4.1.2. Ehrlich Solid Tümörü.....	8
1.1.4.1.3. Ehrlich Alt Formlar.....	9
1.2. Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser.....	9
1.3. Rho/Rho-kinaz Sinyalizasyon Yolağı.....	11
1.3.1. Rho Proteinleri.....	11
1.3.2. Rho-Kinaz.....	15
1.3.3. Rho/Rho-kinaz Substratları.....	18
1.3.4. Rho-Kinaz İnhibitörleri.....	20
1.3.4.1. Y-27632 Maddesinin Yapısı.....	22
1.4. Rho/Rho-kinaz Sinyal Mekanizmasının Rol Oynadığı Fizyolojik ve Patolojik Olaylar.....	23

1.4.1. Kardiyovasküler Sistemdeki Fonksiyonu.....	23
1.4.2. Gastrointestinal Sistemdeki Fonksiyonu.....	24
1.4.3. Solunum Sistemindeki Fonksiyonu.....	24
1.4.4. Ürogenital Sistemdeki Fonksiyonu.....	25
1.4.5. Santral Sinir Sistemindeki Fonksiyonu.....	25
1.4.6. Karaciğerdeki Fonksiyonu.....	26
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ.....	28
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Araç ve Gereçler.....	31
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	31
3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	31
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları.....	32
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. Swiss Albino Türü Farelerde Ehrlich Ascites Tümör (EAT) Oluşturulması.....	33
3.2.2. Y-27632 inhibitör maddesinin hazırlanması.....	33
3.3. Y-27632 maddesinin EAT Üzerine Olan Etkisini Araştırılması.....	34
3.3.1. Oluşturulan Gruplar ve Yapılan İşlemler.....	34
3.3.1.1. Y-27632 Maddesinin T.Ö. Uygulanan gruplar.....	34
3.3.1.2. Y-27632 Maddesinin T.S. Uygulanan gruplar.....	35
3.4. Tümör Gelişiminin Takip Edilmesi.....	35
3.5. Biyokimyasal Analiz.....	36
3.5.1. MDA Ölçümü.....	36
3.5.1.1. Hazırlanan çözeltiler.....	36
3.5.1.2. Deneyin yapılışı.....	36
3.5.2. GSH Ölçümü.....	36
3.5.2.1. Hazırlanan çözeltiler.....	37
3.5.2.2. Deneyin yapılışı.....	37
3.5. EAT' nin Patolojik Olarak İncelenmesi.....	37
3.7. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	38
3.7.1. İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi.....	38
3.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda EAT Sayısı.....	39

4.2. Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda EAT Sayısı.....	42
4.3. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda Ağırlık Değişimi.....	46
4.4. Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda Ağırlık Değişimi.....	48
4.5. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda GSH ve MDA Değişimi.....	50
4.6. Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda GSH ve MDA Değişimi.....	52
4.7. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda Patolojik Değerlendirmeler....	53
4.8. Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda Patolojik Değerlendirmeler....	56
4.9.Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda İmmünohistokimyasal Bulgular.....	57
4.10.Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda İmmünohistokimyasal Bulgular.....	60
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR.....	68
EKLER.....	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Rho aktivitesinin düzenlenmesi (Wettschureck ve Offermans, 2002). PKN; protein kinaz N.....	14
Şekil 1.2. ROCK I ve ROCK II'nin moleküler yapısı.....	16
Şekil 1.3. Rho-kinaz ve düzenlenmesi. PH; plekstrin homoloji bölgesi, RB; Rho bağlayıcı bölge AA; arasonik asit, GTP-Rho; Rho'nun aktif formu.....	16
Şekil 1.4. Y-27632 maddesinin yapısı.....	23
Şekil 4.1. T.Ö. Deneme Süresince Gruplardaki EAT Hücrelerinin Canlılık Yüzdesi.....	41
Şekil 4.2. T.S. Deneme Süresince Gruplardaki EAT Hücrelerinin Canlılık Yüzdesi.....	44
Şekil 4.3. T.Ö 1.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	46
Şekil 4.4. T.Ö. 2.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	47
Şekil 4.5. T.Ö 3.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	47
Şekil 4.6. T.Ö. Kontrol Grubu Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	48
Şekil 4.7. T.S 1.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	48
Şekil 4.8. 2.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	49
Şekil 4.9. T.S Kontrol Grubu Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	49
Şekil 4.10. Sağlıklı Kontrol Grubu Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği.....	50
Şekil 4.11. T.Ö. Deneme Gruplarına ait GSH değerlerinin Grafiksel gösterimi.....	51
Şekil 4.12. T.Ö. Deneme Gruplarına ait MDA değerlerinin Grafiksel gösterimi.....	51
Şekil 4.13. T.S. Deneme Gruplarına ait GSH değerlerinin Grafiksel gösterimi.....	52
Şekil 4.14. T.S. Deneme Gruplarına ait MDA değerlerinin Grafiksel gösterimi.....	53

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Rho kinaz substratları.....	17
Tablo 3.1. Deney Hayvanlarına Verilen Yemin İçeriği.....	32
Tablo 3.2. Deney Hayvanlarına Verilen Yemdeki Besin Maddeleri ve Enerji Düzeyi.....	33
Tablo 4.1. T.Ö. Deney Başlangıcında verilen EAT hücre parametreleri.....	39
Tablo 4.2. T.Ö. Deneme Gruplarına Ait EAT Hücrelerinin Canlılık Parametreleri.....	40
Tablo 4.3. T.S. Deney Başlangıcında verilen EAT hücre parametreleri.....	43
Tablo 4.4 T.S. Deneme Gruplarına Ait EAT Hücrelerinin Canlılık Parametreleri.....	44
Tablo 4.5. T.Ö. Deneme Gruplarına ait GSH ve MDA Değerleri	51
Tablo 4.6. T.S. Deneme Gruplarına ait GSH ve MDA Değerleri	52

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa

Resim4.1. T.Ö.Başlangıç EAT hücrelerinin tripan mavisi ile boyanmış görünümü.....	40
Resim 4.2. T.Ö. gruplara ait hücre görüntüleri.....	42
Resim4.3. T.S.Başlangıç EAT hücrelerinin tripan mavisi ile boyanmış görünümü.....	43
Resim4.4. T.S. gruplara ait hücre görüntüleri.....	45
Resim 4.5. Sağlıklı Kontrol Grubuna ait kalın bağırsak dokusu.....	54
Resim 4.6. T.Ö. gruplara ait doku preparatlarının örnek resimleri.....	55
Resim 4.7. T.S. gruplara ait doku preparatlarının örnek resimleri.....	57
Resim 4.8. T.Ö. gruplara ait doku preparatlarının ROCK2 immün boyanma örnek resimleri.....	59
Resim 4.9. T.S. gruplara ait doku preparatlarının ROCK2 immün boyanma örnek resimleri.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AA	Arasidonik Asit
ASODN	Antisens Oligodeoksi Nükleotid
CSF	Koloni Stimulan Faktör
DTNB	5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
EAT	Ehrlich Ascites Tümör
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ERK	Extracellular signal regulated kinase
GAP	GTP'az Aktive Edici Protein
GG	Geranilgeranil
GDI	GTP'az Ayrıştırıcı İnhibitör
GDP	Guanozin di fosfat
GEF	Guanin Nükleotid Değiştirici Faktör
GF	Çoğalan Fraksiyon
GFR	Büyüme Faktörü Reseptörü
GOF	Gain of function
GSH	Glutasyon
GTP	Guanozin tri fosfat
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
i.p.	Intra Peritoneal
JAK	Janus Family Kinases
LPA	Lizofosfatidik Asit
MAP	Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz
MDA	Malodialdehit
MLCK	Miyozin Light Chain Kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
P	Palmitoil
PBS	Phosphate buffered saline
PKB	Protein Kinaz B
RTK	Reseptör Tirozin Kinazlar
ROCK2	Rho-kinaz enzim izofromu
TBA	Tiyobarbütirik Asit
TCA	Triklorasetik Asit
TSTA	Tümör Spesifik Transplantasyon
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1.GİRİŞ

Kanser hastalığı, yıllardır tüm dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, 2020 yılında dünyadaki tüm yeni kanser hastalarının %70'nin gelişmekte ve geri kalmış ülkelerde olacağını bildirmektedir (Özyılkan, 2005).

Kanser hastalığının adı, adının verdiği korku, gelecek kaygısı, hastalık ve tedavi sürecinde yaşanabileceklerin yarattığı stres, hasta ve hasta yakınlarını hiçbir hastalık grubunda olamayacak kadar çok olumsuz etkilemektedir (Northouse, 1988; Kayaalp, 1995; Kusch vd., 2000; Murray, 2000; Murray, 2002; Özyılkan, 2005). Bu yüzden bütün kanser hastalarının yaşamları süresince unutulmaması gereken kavramlardan en önemlisinin 'Yaşam Kalitesi' kavramı olduğunu görürüz. Yaşam kalitesinin arttırılabilmesi için bu hastaların gerek küratif tedavileri gerekse destek tedavilerinde gerekli olan uygun ilaç, beslenme vb. gibi özel ihtiyaçlarının belirlenmesi gereklidir (Özyılkan, 2005). Bundan dolayı deneysel kanser araştırmalarının ve yeni deneysel modellerin mutlak gerekliliği karşımıza çıkmaktadır.

Deneysel kanser araştırmalarının yapıldığı üç yüzyıllık dönem içinde özellikle kimyasal karsinojenler ile spontan veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Kanser araştırmalarında kullanılan spontan veya indüklenen tümör modelleri için çok sayıda hayvan, fazla miktarda maddi olanak ve uzun zaman gerektiğinden, birçok araştırmacı tarafından daha az tercih edilmişlerdir. Dolayısıyla özellikle 1950'li yıllardan sonra transplante edilebilen tümörlerin oluşturduğu modellerin tercih edildiğı kanser araştırmaları ön plana çıkmaktadır (Zeybek, 2003). Bu çalışmada tümör değerlendirmesi ve izlenmesi açısından kolaylık sağlayan transplante edilebilir tümör modellerinden biri olan EAT (Ehrlich Asit Tümörü) seçilmiştir.

Son yıllarda deneysel kanser modellerinin geliştirilmesiyle birlikte, kanser araştırmalarında önemli bir yere sahip olan kemoterapi için yeni antikanser ilaçların

geliştirilmesi hız kazanmıştır. Günümüzde bu doğrultuda özellikle sinyal ileti yolları üzerinde durulmakta olup özellikle kanser gelişiminin farklı evrelerinde rol alan protein kinaz aktiviteleri araştırılmaktadır.

Sinyal ileti proteinlerinden Rho kinaz bir serin-treonin protein kinazdır. Bugüne kadar en az 2 izoformu tanımlanmıştır (Fukata vd., 2001). Bunlar; ROCK1 ve ROCK2 olarak isimlendirilir. ROCK1 yaklaşık 1354 aminoasit ve ROCK2 1388 aminoasit dizisinden oluşmaktadır.

Rho/Rho kinaz yolağının aktivasyonu, aktin reorganizasyonunda, hücre hareketi ve migrasyonunda, hücrelerin birbirlerine ve matrikse olan adezyonunda, hücre siklusunun düzenlenmesinde, gen ekspresyonlarında ve apoptozda anahtar rol oynamaktadırlar. Bütün bu fonksiyonlar, kanser gelişmesi ve progresi için oldukça önemlidir (Shi ve Wei, 2007; Somlyo ve Somlyo, 2000 ; Santos vd., 1997; Boettner ve Aelst, 2002). Bu özellikleriyle Rho-kinaz kanser oluşumu ve gelişiminde önemli olan tümör hücrelerinin invazyonunda ve invaze olan tümör hücrelerinin çoğalıp metastaz oluşturmaları için gerekli olan anjiogenez uyarırlar. Bu bilgilere dayanarak Rho-kinaz inhibisyonunun, yeni antikanser ilaçların gelişimi için ümit vaat eden hedefler gibi görüldüğü düşünülmektedir (Fritz ve Kaina, 2006).

Rho-kinaz enzimini inhibe eden ajanlar arasında, Y-27632, fasudil (HA-1077), hidroksifasudil, Y-32885, Y-39983, H-1152P, SLx-2119, azabenzimidazol-aminofurazanlar (GSK-269962A ve SB772077) ve Wf-536 gibi birçok madde bulunmaktadır (Liao vd., 2007). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda özellikle Rho-kinaz inhibitörlerinden biri olan Y-27632 maddesi kullanılmıştır. Ancak yapılan literatür taramalarında *in vivo* da anti-tümöral etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada Rho-kinaz inhibitörlerinden olan Y-27632 inhibitör maddesinin *in vivo* kanser modelinde etkinliği denenmek istenmiştir. Bu nedenle Y-27632 maddesinin anti-tümöral etkisini *Swiss Albino* türü farelerde oluşturulan sıvı Ehrlich Asit Tümörü (EAT) üzerinde *in vivo* olarak test etmek amaçlanmıştır.

1.1. Deneysel Kanser Modelleri

1.1.1. Tarihçe

Erken dönem tıbbi kayıtlar incelendiğinde kanserin bir hastalık olarak tanımlanması tıp tarihi kadar eskidir. Kanserin açıklanmaya çalışıldığı yaklaşık 7 adet papirus incelendiğinde, bu konuda bir dereceye kadar bilgi edinilebilmektedir. Kansere çalışmalarına ilgili ilk yazılı kaynaklar olan bu papiruslar ancak 19.yy'da aydınlatılabilmektedir. 7 adet papirus içinde önemli yer tutan Edwin Smith ve George Ebers papiruslarından anlaşıldığı üzere M.Ö. 2500'lü yıllarda ilk kanser araştırmaları başlamış, M.Ö.1600 civarında ise bu araştırmalar yazılı dökümanlar halinde toplanmıştır (Zeybek, 2003).

M.Ö. 2400'lü yıllara ait Peru İnkâ belgelerinde malign melanomların lezyonları anlatılmaktadır. Bunun yanında papirus ve hiyerogliflere göre o dönemlerde kötü huylu olanlardan iyi huylu olanlara kadar bir sınıflandırma yapılmış, bazı kemik tümörü ve osteosarkomlardan söz edilmiştir (Zeybek, 2003).

M.Ö.400'lü yıllara gelindiğinde özellikle Yunanistan ve Roma'da Hipokrat ve Galen gibi büyük hekimlerin içinde bulunduğu araştırmacı doktorların kanser tanımlaması ve tedavisinde önemli gelişmeler kaydettikleri göze çarpmakta, kanserin tehlikeli olan veya olmayan formları bulunduğu bahsedilmektedir (Zeybek, 2003).

M.S. 500'lü yıllardan itibaren vücutta oluşan koyu renkte, safraya benzer bir sıvının hızlı artış göstermesinin kanserleşmeye neden olduğu ve bu oluşumun erken evrede tespit edilmesi durumunda tedavi edilebileceği görüşü destek bulmuş ve hemen hemen 16. yüzyıla kadar bu düşünce geçerliliğini korumuştur (Zeybek, 2003).

M.S.1000'li yılların başlarında Türk alimi İbn-i Sina'nın kısaca "Kanun" diye adlandırılan ve 12.yy'da Latinceye de çevrilen eserinde tedavi ve farmakolojik açıdan kansere yaklaşımı göze çarpmaktadır (Zeybek, 2003).

16.yy'a gelindiğinde beyaz arsenik ve Arap zamkından oluşan bir merhem ile kanserli derinin tedavisinde uygulamalar yapılmıştır (Marsden' in merhemi) (Zeybek, 2003).

1600'lü yıllar içinde Harvey otopsi çalışmalarıyla tümör özelliklerini göstermeye çalışmıştır (Zeybek, 2003).

17. Yüzyılın ilk dönemlerinde Fransız hekim Claude Gendron kanserin yayılma prensibini reddetmiş ve sıkı bir bağlanmayla lokalize olduğunu, kitlesini arttırıp ilaçlar ile tedavi edilmeyecek duruma geldiğini iddia etmiştir (Zeybek, 2003).

18. Yüzyıla, hekim Jean Astruc ve kimyacı Bernord Peyrille, deneysel onkoloji ve kanser tanısı ile ilgili çeşitli araştırmalar gerçekleştirip kanser tanısı, çevresel faktörlerin kansere etkisi ve kanser hastalarının özel tedaviye alınmaları yönünde çalışmalar yapmışlardır (Zeybek, 2003).

19. Yüzyılda ise mikroskoplardaki gelişmelere paralel olarak, özellikle hücresel patoloji araştırmaları yapan Rudolf Virchow tarafından kanserin bilimsel patolojik temelleri atılmıştır. Bu sayede mikroskobik patoloji ile kanser cerrahisi birlikte önemli ilerlemeler kaydetmiştir (Zeybek, 2003).

20.yy'ın erken dönemlerinden itibaren "günümüzde dahil" canlı organizmaların yapı, fonksiyon ve kimyasının aydınlatılmasıyla birlikte kimyasal karsinojenler, hücre kültürü, tanı teknikleri, kemoterapi ve genetik manipülasyonlar gibi alanlarda kanser araştırmaları hız kazanmıştır. Diğer yandan 19.yy'la beraber, özellikle kimyasal karsinojenlerin kullanıldığı, ilk kayıtlı, deneysel kanser çalışmaları göze çarpmaktadır (Zeybek, 2003).

1874-1878 yılları arasında Edinburgh Üniversitesi bünyesinde tavşanlarda meme kanseriyle ilgili araştırmalar yapılmıştır (Zeybek, 2003).

Ehrlich, 1907 yılında, albino bir farenin meme bezinden çıkartılan Ehrlich Mouse Carcinoma'dan türetilen EAT modelini ortaya koymuştur (Zeybek, 2003).

1911 yılında Tokyo Üniversitesi'nden tavuklarda viral kaynaklı kanser modeli uygulamaları olmuştur (Zeybek, 2003).

1915 yılında yine Tokyo Üniversitesi'nde tavşan derisine ilk defa kimyasal karsinojen (kömür katranı) uygulanmıştır (Zeybek, 2003).

1910-1915 yıllarında Jensen'in "Jensen Rat Sarcoma" yı deneysel kanser çalışmalarına kazandırdığı görülmektedir (Zeybek, 2003).

1950'li yıllardan sonra Wilm'in, transplante edilebilen sıçan renal tümörünü kullanmaya başlamasıyla transplante tümör modelleri ön plana çıkmıştır. Bununla birlikte ortaya konan değişik tümör modellerinin gelişimi ile birlikte çeşitli anti-karsinojen ajanların denenmesinde hızlı bir artış gözlenmiştir (Zeybek, 2003).

1940'lı yılların ortalarında Gilman'ın lenfomaya karşı alkilenmiş ajanlarla yaptığı sistemik kanser tedavisi ilk önemli ilaç etkilerini ortaya koymuştur (Zeybek, 2003).

1975'te insan melanom, akciğer, kolon ve göğüs kanserlerine benzeyen solid ve transplante edilebilen tümör modelleri paneli NCI tarafından oluşturulmuştur (Zeybek, 2003).

1980'li yıllar ile beraber, kolon, akciğer ve meme insan tümör xenograflarının kullanılması, tümör spesifik uygulama kolaylığı getirmiştir (Zeybek, 2003).

1985 sonrasında transgenik hayvan üretiminin gelişimiyle, bu özellikteki fareler alternatif bir başka uygulama alanı yaratmıştır. Transgenik hayvanlar bilinen bir genin düzensiz çalışmasından doğan onkojenik fenotip araştırmalarında önemli model olmuşlardır (Zeybek, 2003).

1.1.2. Deneysel Hayvanlarının Kullanımı

Kanser alanında uygulanan tedaviler geçmişten günümüze kadar farklı teknikler kullanarak veya sistemli ilaç uygulamaları ile gelişme kaydetmiştir. Yalnız hangi metot kullanılırsa kullanılsın ilaç geliştirme araştırmalarında hayvan modellerinden

yararlanmak bir yerde zorunluluk göstermektedir. Çünkü son yıllarda ön plana çıkan hücre kültürü veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen, uygulanan ajanlara karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler, hayvan modellerinin kullanımını önemli kılmaktadır. Bunun birlikte hayvan modelleri ilaç dozuna bağımlı toksisiteyi belirlemede, ilacın metabolik özelliklerini veya doku ile hücrelerarası dağılımını gözlemede, doz şiddetini kolaylıkla sağlamada ve tümör ilerleme durumunu ortaya koymada artan bir öneme sahiptir (Zeybek, 2003).

Ancak kanser ilaç araştırma ve geliştirmelerinde kullanılacak deneysel modellerin seçimi çok önemlidir. Kullanılacak kanser modeline en iyi cevap alınacak, uygulanacak tümörün biyolojik özelliklerini ve ilaçların sitotoksik etkilerini istenildiği şekilde gösterecek deney hayvanını seçmek, tümör oluşma şansını arttırmak için en uygun tür, soy, yaş ve cinsiyeti saptamak önemlidir (Zeybek, 2003).

1.1.3. Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller

Çeşitli kimyasal ajanları, deney hayvanlarına değişik yollarla vererek (intraperitoneal, intravenöz, subkutan v.s.) birbirinden farklı özellikte tümör modelleri oluşturulabilmektedir. Ancak burada kullanılacak karsinojenlerin uygun şartlarda saklanarak hem araştırmacıya hem de çevresindeki diğer kişilere zarar vermesini önlemek önemlidir. Diğer yandan hazırlanış şekilleri, uygulama yolları, uygulama sonrası karsinojenin etki mekanizması iyi belirlenerek en verimli çalışma modeli ortaya konmalıdır (Zeybek, 2003).

1.1.4. Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modelleri

Bu grup içinde bulunan transplante edilebilen tümör modelleri spontan oluşan tümörlerden elde edilen süspansiyonlardan türetilmektedir. Bu tümör modelleri insan kanser tiplerine kinetik özellik açısından benzerlik gösterirler. Ayrıca karsinogenezin biyolojisinin anlaşılmasında ve yeni antikanser ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynayan modellerdir (Zeybek, 2003).

1.1.4.1. Ehrlich Deneysel Tümör Modeli

Elde edilişinden bu yana pek çok araştırmaya konu olan deneysel hayvan tümörlerinden biri olan EAT, ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış (Aktaş, 1996; Taşkın, 2002) ve Ehrlich & Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel tümör haline getirilmiştir. 1932 yılında Loewenthal ve Jahn (1932) bu tümörün farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde etmeyi başarmışlar ve peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da oluştuğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır.

Lette vd. (1972) yaptığı çalışmalarla 2. Dünya savaşı sırasında hem bu tümörün devamını sağlamış hem de tümörü kalitatif ve kantitatif bakımdan kanser araştırmaları için uygun bir test sistemi haline getirmiştir. 1948 yılından sonra ise EAT hücreleri araştırmalarda kullanılmak üzere hızla dünyadaki araştırma enstitülerine yayılmıştır. EAT diferansiye olmamış bir tümördür. Transplante edilebilme oranı yüksek olan, regresyon göstermeyen, hızlı proliferasyona, kısa yaşama süresine sahip, %100 ölüme götüren ve immünolojik açıdan tümör spesifik transplantasyon antijenleri (TSTA)' ne sahip olmayan (Kaleoğlu ve İşli, 1977) bu tümörün orijinali hiperdiploiddir. Fare dışındaki deney hayvanlarında oluşmadığı gözlenmiştir (Zeybek 1996). EAT amaca göre asit form veya solid form olarak kullanılmaktadır. Eğer tümör hücresi içeren asit sıvısı deney hayvanına i.p. yolla enjekte edilirse asit form, s.c. yolla enjekte edilirse solid form elde edilir (Okay, 1998; Zeybek, 1996).

1.1.4.1.1. Ehrlich Asit Tümörü (EAT)

Tümör hücrelerinin herhangi bir vücut boşluğuna enjekte edilmesinden sonra orada çoğalmaları ile neoplastik hücreler ihtiva eden bir effüzyon meydana gelmesi, asit terimi ile ifade edilir. Genellikle tümörler tekrarlayan pasajlarla virülanslarını arttırmaları. Bu gibi tümörlerin büyüme hızı artar. Differansiasyon gitgide kaybolur, gelişmeyi kontrol eden başlıca mekanizmalardan sıyrılır, heterotransplantabilite kabiliyeti kazanır ve nihayet asit formuna dönüşebilirler (Kaleoğlu ve İşli, 1977).

Asit, gri-beyaz bazen hafif kanlı görünümde koyu bir sıvıdır ve 0,1 ml'de yaklaşık 10 milyon neoplastik hücre içerir (Kaleoğlu ve İşli, 1977; Aktaş, 1996). EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir (Klein, 1951). Dolayısıyla alışılmış basit sayma yöntemleriyle hem transplante edilen tümör hücre sayısı, hem de oluşan tümör büyüklüğünü kolay bir şekilde saptanabilmesi mümkün olmaktadır (Ekinci, 2000).

EAT hücreleri, farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon halinde çoğalırlar ve *in vitro* da yapay yüzeylere yapışmazlar (Aktaş, 1996; Lazebnik vd., 1991; Song vd., 1993; Vinuela vd., 1991). Pasajdan 4- 6 gün sonra asit oluşmaya başladığı anlaşılabilir ve toplam 5- 12 ml asit teşekkül eder (Gümüşhan, 2002). EAT hücreleri, farenin peritoneal boşluğuna inokulasyonu takiben 2 fazda çoğalırlar. Bu fazlar, hücre sayısının eksponansiyel olarak arttığı çoğalma fazı ve bunu izleyen, hücre sayısının hemen hemen sabit kaldığı plato fazıdır (Siems, 1993; Grune vd., 1992; Lazebnik vd., 1991; Skog vd., 1990; Tannock, 1961).

EAT hücrelerinin sayıları çoğalma periyodu boyunca hızlı hücre bölünmeleri ile artar ve periton boşluğunu doldururlar. Tümör hücrelerindeki bu çoğalmaya paralel olarak asit sıvısının birikimi de meydana gelir. Belli bir zaman sonra da konak hayvan hem tümör hacminin oluşturduğu basınç hem de tümörün organizmaya verdiği hasar sonucunda ölür (Öner, 1985; Altun, 1996; Aktaş, 1996). Çoğalma fazından plato fazına geçişleri boyunca EAT hücrelerinin canlılık oranlarında önemli bir azalma ortaya çıkmamaktadır. (Schmidt vd., 1991). Asit sıvısının birikiminde, tümör hücrelerinin asit sıvısının birikimini ilerleten bir vaskular permeabilite faktörünü salgılaması olayı, tümör asit sıvılarında incelenmiş ve sonuç olarak; bu hayvanların periton boşluğunda bulunan damarların kontrol hayvanlardaki aynı damarlara oranlara önemli derecede fazla permeabilite gösterdiği bulunmuştur. Artan bu permeabilitenin, normal plazma veya serumda bulunmayan etkili bir permeabilite faktörünün asit sıvısındaki mevcudiyetinden dolayı olduğu tespit edilmiştir (Senger vd., 1983).

1.1.4.1.2. Ehrlich Solid Tümörü

Ehrlich tümörü bir farede meme tümörü olarak başlamış, Ehrlich ve Apolant tarafından bundan transplante edilebilir solid tümör elde edilmiştir (Lettre, 1972). Ehrlich tümörü hücrelerinin deri altı verilmesiyle bir haftada yaklaşık 1cm çapında tümör elde edilir. Bu büyüklüğe ulaştığında tümörün ortasında bir miktar nekrotik saha vardır. Tümör hücreleri eşit büyüklükte değildir çapları 20- 30 mikrondur (Kaleoğlu, 1977). Tümörün en dış kısmında ise fibröz bir kapsül bulunduğu belirtilmektedir (Ekinci, 2000). Solid tümörün oldukça yavaş büyümesi yüksek oranda hücre ölümünden kaynaklanmaktadır (Tannock, 1969). Tümörün tutma oranının yüksek oluşu, hızlı gelişmesi ve infiltratif büyüme göstermesi yüksek derecede malign olduğunu gösterir (Kaleoğlu, 1977). Hipotetraploid Ehrlich hücreleriyle yapılan çalışmalarda katı ve sıvı formların mitoz oranları ile iki kat olma sürelerini incelemiştir ve katı tümör hücrelerinde iki kat olma zamanının uzadığını, mitoz oranının ise azaldığını bulmuşlardır (Ekinci, 2000). Solid tümör elde etmek için subkutan olarak tümör hücre süspansiyonunun 1×10^6 ml'lik hücre süspansiyonu deri altına enjekte edildiğinde, bir haftalık bir süre sonunda ölçülebilecek düzeyde solid tümör saptanabilir. Hiç bir tedavi yapılmazsa 35- 40 gün içinde farelerde ölüm gözlenir (Zeybek, 2003).

1.1.4.1.3. Alt formlar

1953'te Haucicka (Lettre vd., 1972), kromozom sayısı tetraploid olan bir alt soy elde etmiştir. Sonraki yıllarda bazı çalışmalar diploid , hipertetraploid (Lennartz vd., 1968), hipotetraploid (Burns, 1968) altsoyları ile de yürütülmüştür. Lettre ve Kramer (1972) kolşisine (colchicine) dirençli tümör ırkını ve Sholz (1972) ise, glikojen (+) ve glikojen Ø Ehrlich tümör ırklarını elde etmeyi başarmışlardır (Aktaş, 1972).

1.2. Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser

Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiyasyon gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız

çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün mikro çevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir (McCormick, 1999).

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır (Doğan ve Güç, 2004).

Protein kinazlar ve sinyal iletimi İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır (Blume-Jensen ve Hunter, 2001).

Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır. Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılır (Pawson vd., 2002; Pawson, 2002).

Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK süperailesinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır (Pawson,2002). Karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (Blume-Jensen ve Hunter, 2001).

Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK) ve "Janus Family Kinases (JAK)" proteinleri yer almaktadır (Blume-Jensen ve Hunter, 2001). Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi malign fenotipe özgü hücresel olayları hızlandırır (Jones vd., 2000; Frame, 2002).

Sinyal iletiminde yer alan moleküllerin ve sinyal yollarının karsinogenezdeki rollerinin ortaya konması ve bu yollara özgül inhibitör ajanlar ile yapılan klinik çalışmalar, kanser tedavisinde yeni ufukların açılmasını sağlayabilir. Bu yaklaşımların ortak hedefi, en etkin kanser tedavisine ulaşmaktır (Doğan ve Güç, 2004).

1.3. Rho/Rho-kinaz Sinyalizasyon Yolağı

1.3.1. Rho Proteinleri

Rho proteinleri monomerik GTP'azların Ras süper familyasının Rho subfamilyası üyeleridir. Rho geni ilk olarak 1985'de bir deniz salyangozu olan *Aplysia*'dan bir Ras homoloğu olarak klonlanmıştır ve bunu kısa süre sonra üç insan homoloğu RhoA, RhoB ve RhoC'nin bulunması izlemiştir (Madaule ve Axel, 1985).

Küçük molekül ağırlıklı, 20-40 kDA'lık G proteinleri monomerik GTP bağlayan proteinleridir. Mayalardan insanlara kadar bütün ökaryot hücrelerde bulunan ve 100'den fazla üyesi olan büyük bir aileyi oluştururlar (Casey ve Seabra, 1996). Bu büyük aile yapısal olarak en az beş alt aileye ayrılır. Bunlar:

1. Ras ailesi
2. Rho ailesi (en az 14 üyesi tanımlanmıştır)
3. Rab ailesi
4. Sar1/Arf ailesi
5. Ran ailesi

Memeli Rho ailesi en az 10 farklı üyeden oluşmaktadır. Bunlar: Rho izoformları olan RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG; Rac izoformları olan Rac1, Rac2; Cdc42 izoformu ve TC10 izoformudur (Takai vd., 2001). RhoA, RhoB ve RhoC'nin efektör bölgeleri aynı aminoasid dizilimine sahiptirler ve bu GTP'az proteinlerin hücrel fonksiyonları benzerdir. Rho'nun açıklanan birçok fonksiyonu RhoA ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır (Fukata vd., 2001). RhoA, en çok çalışılan ve vücutta en fazla bulunan bir Rho proteini alt tipidir (Miao vd. 2002; Boettner ve Aelst, 2002).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, RhoB'nin normal hücre döngüsünden çıkma potansiyeli olan ve böylece kansere neden olabilecek hasar görmüş hücreleri apoptoza doğru yönlendirebileceği bildirilmiştir. Tümörün hücre döngüsünde yer alan göç, yayılma ve apoptotik süreçten kaçış gibi özelliklerin Rho GTPaz aktivitesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Shi ve Wei, 2007).

Küçük G proteinleri olan Rho alt tipleri guanozindifosfat (GDP), GTP, GTP'az aktivitesi ve efektörleri ile etkileşmekten sorumlu aminoasit dizilimine sahiptirler. Sentezlendikten sonra lipidler ile posttranslasyonel değişikliklere gereksinim duyarlar. Bu lipid yapıları genellikle, palmitoil (P), farnesil (F) ve geranilgeranil'dir (GG). Küçük G proteinlerinin lipid modifikasyonu, bunların aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gereklidir (Olofsson, 1999). Rho'nun aktive olabilmesi için geranilgeranile olmuş C-terminal ucu ile membrana tutunması gerekir. Guanin nükleotid değişiminden sonra, Rho; Rho-kinaz (ROCK), protein kinaz N, rhotekin, citron, p140 mDia ve fosfolipaz D gibi alt efektörlerini aktive eder (Zheng, 2001).

Küçük G proteinlerinin GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olmak üzere birbirine dönüşebilen iki formu vardır. Rho aktivitesini kontrol eden başlıca 3 protein vardır. Bunlar:

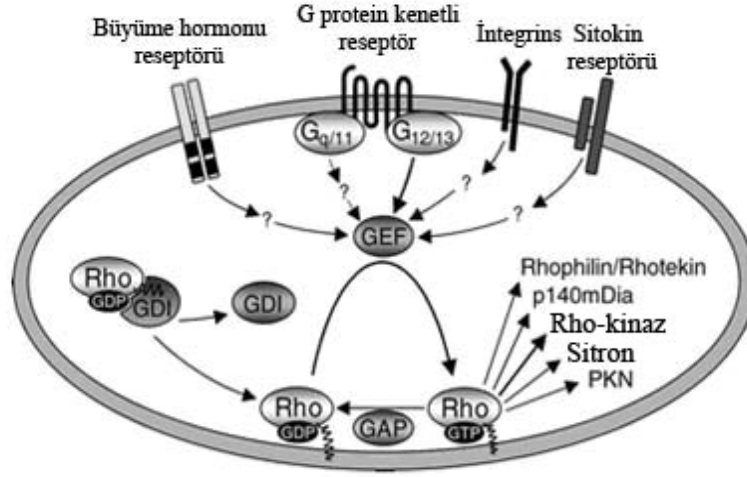
- 1- GTPaz aktive edici proteinler (GAPs, Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini arttırarak GTP bağlı Rho'nun inaktivasyonunu kolaylaştırır).
- 2- GTPaz ayırıcı inhibitörler (GDIs, bazı Rho ailesi GTPazlarının membrana bağlanmalarını inhibe eder. Nükleotid ayrılmasını ve böylece aktivasyonunu önler.
- 3- Guanin nükleotid değiştirici faktör (GEF, inaktif GDP-Rho'yu aktif GTP-Rho'ya dönüştürür (Sah vd., 2000 ; Wettschureck ve Offermans, 2002)).

Rho aktivitesi aynı zamanda çok sayıda G proteini ile kenetli reseptörler tarafından da düzenlenebilir (Fukata vd., 2001).

Rho'nun aktivitesi G12 ve G13 proteinleri ile düzenlenir. G12 ve G13 küçük molekül ağırlıklı GTP bağlayıcı Rho proteinini aktive eder. G12/G13 aynı zamanda, hücre iskeleti olaylarını da düzenleyebilen Na⁺/H⁺ değiş-tokuş proteinini de stimüle

eder (Buhl vd., 1995 ; Dhanasekaran ve Dermott, 1996). Sfingozin 1 fosfat (S1P), sfingofosforilkolin (SPC) ve lizofosfatidik asid (LPA) lipid yapısında kalsiyum duyarlaştırıcı ajanlardır, RhoA/ROCK yolunu aktive ederler (Somlyo, 2002). Bir G proteini olan G13'ün, Swiss 3T3 kültür fibroblastlarında Rho'yu aktive etmek için lizofosfatidik asid reseptörleriyle kenetlendiği bildirilmiştir. Ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörünün, G13 aracılığıyla Rho aktivasyonu ve stres lifleri oluşumunun yolağında yer aldığına ilişkin kanıtlar bulunmaktadır (Gohla vd.,1998). Botulinum toksin C3, Rho'yu spesifik olarak ADP-riboziller. Bu yüzden C3 toksin Rho'nun spesifik inhibitörü olarak kabul edilir (Amano vd., 2000).

Rho, hücre bölünmesindeki bölünme yarığının oluşmasında yer alan myozin II ve aktin filamentlerinin fonksiyonları için gereklidir. Bunun yanı sıra sitokinez boyunca, hücrenin kasılma aktiviteleri için de Rho sinyal yolağı kullanılır. Rho-kinaz, aynı zamanda myozin fosfatazı inhibe ederek de bölünme yarığının oluşmasına katkıda bulunabilir. Buna ek olarak bazı Rho fonksiyonları, formin proteinleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Rho-kinaz, radixin proteinini fosforilleyerek hücre iskeletinin plazma membranına bağlanmasını düzenleyebilir. Bazı çalışmalar Rho ve Cdc42'nin direkt olarak formin proteinlerinin bazı bölgeleriyle etkileştiğini ve forminlerin yeni aktin polimerizasyonu ile sinyal kaskadı arasında bağlantı kurduğunu önermiştir (Rossowski vd., 2002). Rho-kinaz enziminin kalponini fosforile ettiği ve böylece kalponin-F-aktin bağlanmasının inhibe edildiği gösterilmiştir. Kalponin, düz kas hücrelerinde F-aktin, kalmodulin ve tropomyozin bağlayıcı protein olarak keşfedilmiştir. Kalponinin bazik izoformunun, myozin fosfataz ile defosforile edildiği ve kasılmayla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Fosforile olmamış kalponin F-aktine bağlanır ve myozin ATP'az aktivitesini inhibe eder. Fosforile olduğunda bu özelliklerini kaybeder (Kaneko vd., 2000). Ayrıca Rho-kinaz ile miyozin ve adducin proteinlerinin fosforilasyonunun fibroblastlarda mikrovilli benzeri yapıların oluşmasında kritik rol oynadığı bildirilmiştir (Oshiro vd., 1998).



Şekil 1.1. Rho aktivitesinin düzenlenmesi (Wettschureck ve Offermans, 2002). PKN; protein kinaz N

İstirahat halindeki hücrelerde, Rho-GDP disosiyasyon inhibitörü (Rho GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve GDP-Rho'nun membrandan sitozole geçmesini sağlar. Hücreler bazı agonistlerle stimüle edildiğinde, GDP-Rho GTP-Rho'ya dönüşür. Bu dönüşüm GTP-GDP değişim reaksiyonunu stimüle eden guanin nükleotid değişim faktörünün (GEF'ler) aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir (Fukata vd., 2001).

GTP-Rho, daha sonra geranil geranillenmiş C terminal kuyruğu aracılığı ile hücre membranına yönlendirilir ve spesifik hedefleriyle etkileşir. GTPaz aktive edici proteinler (GAPs) negatif regülatörler olarak görev yaparlar. Bu proteinler Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini azaltarak Rho'yu inaktif hali olan Rho-GDP'ye dönüştürürler. Rho heterotrimetrik G proteinleri ile kenetli olan reseptörlerin bazı agonistler tarafından uyarılması sonucu bir takım fonksiyonlar görür (Yoshioka vd.,1998).

Rho proteinleri agonist stimülasyonu ile indüklenen Ca^{2+} duyarlaşmasından sorumludur ve miyozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek fonksiyon (Fukata vd., 2001).

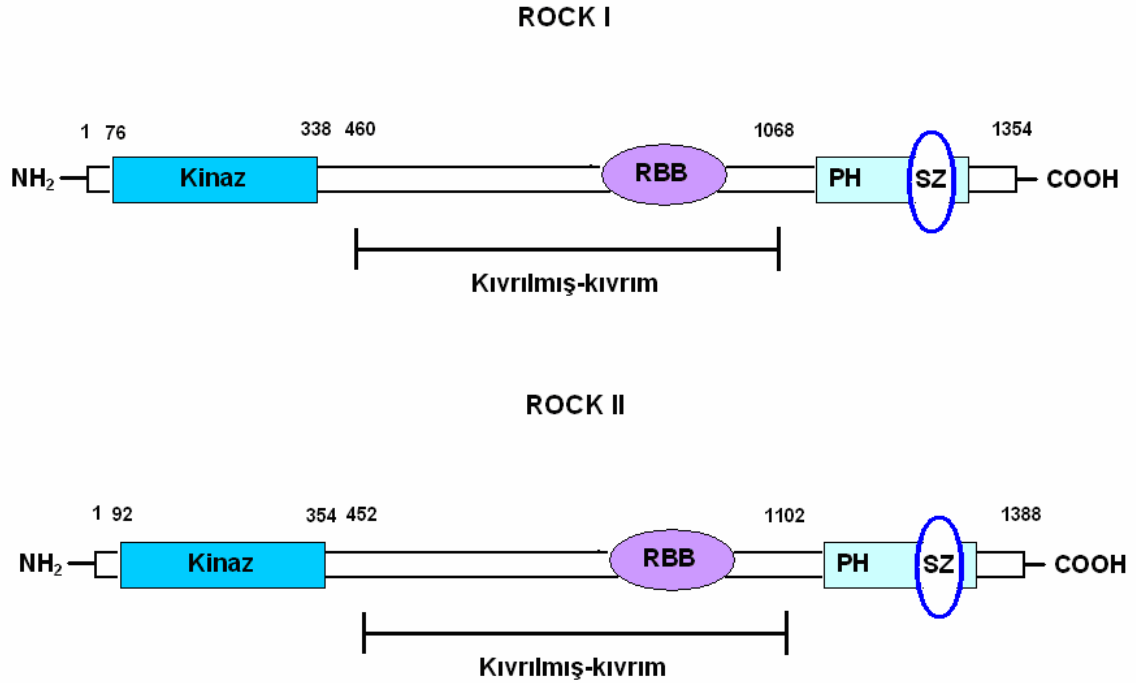
Diğer taraftan Rho/Rho kinaz yolağının aktivasyonu, tümör hücre invazyonuna neden olmaktadır. Bu yolağı inhibe eden fasudilin insan ve sıçan tümör modellerinde tümör progresini azalttığı bildirilmiştir (Ying vd., 2006). Rho proteinleri, aktin reorganizasyonunda, hücre hareketi ve migrasyonunda, hücrelerin birbirlerine ve matrikse olan adezyonunda, hücre siklusunun düzenlenmesinde, gen ekspresyonlarında ve apoptozda anahtar rol oynamaktadırlar. Bütün bu fonksiyonlar, kanser gelişmesi ve progresi için oldukça önemlidir (Shi ve Wei, 2007; Somlyo ve Somlyo, 2000 ; Santos vd., 1997; Boettner ve Aelst, 2002).

1.3.2.Rho-Kinaz

Rho-kinaz bir serin-treonin protein kinazdır. Şu an için en az 2 izomorf tanımlanmıştır. Bunlar, ROCK1 (ROCKI, ROCK β , ROK β) ve ROCK2 (ROCKII, ROCK α , ROK α) izomorfıdır (Nakagawa, 1996; Matsui, 1996). ROCK1 yaklaşık 1354 aminoasit ve ROCK2 1388 aminoasit dizisinden oluşur (Kimura vd., 1996; Fukata vd., 2001).

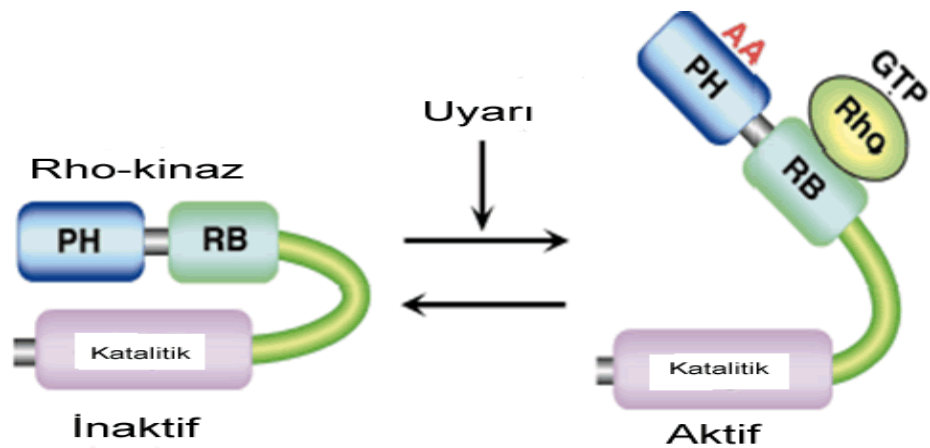
Her iki enzim tüm hücrelerde eksprese edilmektedir. ROCK2'nin beyin ve kalpte, ROCK1'in akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve testiste daha fazla eksprese edildiği bildirilmiştir. ROCK2'nin çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir (Kimura vd., 1996; Fukata vd., 2001; Büyükafşar ve Levent, 2003; Büyükafşar ve Ün, 2003; Büyükafşar vd., 2003).

Bu proteinler sitoplazmada dağılmış halde bulunur ve özellikle gelişmekte olan hücrelerde membran içerisinde lokalize olurlar (Matsui, 1996; Loirand, 2006). İnsanda ROCK1 ve ROCK2 genleri sırasıyla 18. kromozom (18q11.1) ve 2. kromozomda (2p24) yer almaktadır (Chitaley ve Webb, 2002).



Şekil 1.2. ROCK I ve ROCK II'nin moleküler yapısı (Shi, 2007)

Rho kinazın N-terminalinde kinaz bölgesi vardır. Orta bölgesinde kuramsal olarak kangal gibi kıvrılmış (coiled-coil) bölge ve C-terminal bölgesinde plekstrin homoloji bölgesi bulunur (Şekil 1.3.). Aktive olmuş Rho, Rho-kinazın kangal gibi kıvrılmış bölgesinin C-terminal parçasıyla etkileşerek kinaz bölgesini aktive eder (Amano vd.,1998).



Şekil 1.3. Rho-kinaz ve düzenlenmesi. PH; plekstrin homoloji bölgesi, RB; Rho bağlayıcı bölge, AA; arasinonik asit, GTP-Rho; Rho'nun aktif formu (Kaplan, 2007)

Bu olay sonucu aktive olan Rho-kinaz aşağıda, Tablo 1.1’de gösterilmiş olan substratları fosforile ederek çeşitli hücre içi olaylara katkıda bulunur (Hirano, 2007; Buhl vd., 1995; Miura vd., 1993).

Tablo 1.1. Rho kinaz substratları (Hirano, 2007; Buhl vd., 1995; Miura vd., 1993).

Substratlar	Fonksiyonları	Hücresel Yanıtlar
Miyozin fosfatının miyozin bağlayıcı alt ünitesi	Miyozin fosfatının inhibisyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Miyozin hafif zinciri (MCL)	Miyozinin F-aktine bağlanmasında artış	Stres lifleri oluşumu, fokal adezyon oluşumu, nörit retraksiyonu, hücre kasılması, hücre motilitesi
CPI-17 proteini	Miyozin fosfatının inaktive edici aktivitesinin aktivasyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Kalponin	F-aktine bağlanmada azalma	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Ezrin Radiksin Moesin (ERM)	Ezrin Radiksin Moesin aktivasyonu	Mikrovillus oluşumu
Addusin	F-aktine bağlanmada artış	Membranal olaylar (ruffling), hücre motilitesi
intermediyer filamentler (GFAB, vimentin)	Flamentlerin dağılımı	Flamentlerin sitokinez için ayrılması
Na^+/H^+ değiştiricisi	Değiştirici aktivitenin aktivasyonu	Stres lifleri oluşumu
LIM kinaz	Kinaz aktivitesinde artış	Kofilinin fosforilasyonu
CRMP-2	---	Büyüme konisi kollapsı
ZİPK(zipper interacting kinaz)	Miyozin fosfatının inhibisyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması

Rho ile etkileşerek aktive olan Rho-kinaz, düz kas kasılmasında, hücre büyümesi, adezyonu, migrasyonu, motilitesi, gen ekspresyonu ve apoptozunda farklı hücresel fonksiyonlara aracılık eder (Noma, 2006).

1.3.3. Rho/Rho-kinaz Substratları

Memeli Rho proteinlerinin çok sayıda alt (downstream) efektörü tanımlanmıştır. Bu protein kinazın aktivitesi GTP-Rho proteinleri ile stimüle edilir. Rho proteinlerinin diğer alt efektörleri; protein kinaz N (PKN) (Amano vd., 1996), myozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt ünitesi (Kimura vd., 1996), p140mDia (Drosophila gen Drophanous) (Watanabe vd., 1997), sitron(Madaule vd., 1995a), sitron kinaz (Madaule vd., 1995 b), rhophilin (Watanabe vd.,1996), rhotekin (Reid vd., 1996), fosfolipaz D'dir (Singer vd., 1997). Bunlar myozin hafif zincir fosfatazın myozin bağlayıcı alt ünitesi, myozin hafif zinciri, addusin (adducin), intermediyer filamentler, ERM (ezrin/radiksin/moesin), vimentin, desmin gibi ara filamentler, glial fibriler asidik protein (GFAP), nörofilamentler, LIM kinaz, Na⁺-H⁺ değiştirici ve kofilini içerir (Shimokawa ve Takeshita, 2005; Mueller vd., 2005). MAPK ve tau ROCK için aday substratlardır. Tau proteininin fosforilasyonu mikrotübül toplanmasını başlatır. Bunlardan MLC, ERM ailesi proteinleri ve addusin hem Rho-kinazın hem de myozin fosfatazın substratlarıdır. ERM hücre iskeleti düzenlenmesinde rol oynar. Bir GTP analogu olan GTP γ S, kalsiyum duyarlılığı oluşturur. Rho proteinleri kalsiyum tetiklemesi olmaksızın düz kas kasılması oluşturmaz, daha ziyade düz kas kasılmasının kalsiyuma duyarlılığını modifiye ederler.

Rho/Rho-kinaz'ın yanı sıra PKC, tirozin kinaz ve fosfatidilinozitol-3 kinazın da vasküler düz kas hücrelerinde Ca²⁺ duyarlılığında yer aldığı bildirilmiştir (Miao vd., 2002). Vasküler düz kas hücrelerinin agonistle indüklenen kasılmasında myozin hafif zincirinin fosforilasyon derecesi kasılma gücü için hayati bir basamaktır. MLC fosforilasyonun miktarı Ca²⁺/kalmodulin bağımlı MLCK ve myozin fosfataz arasındaki dengeye bağlıdır (Mukai vd.,2001). Shin ve ark. İzole düz kas hücrelerinin PGF2 α ile stimüle edilmesinin myozin fosfatazın lokalizasyonunda, belirgin değişiklik oluşturduğunu göstermiştir. Bu durum myozin fosfatazın Rho-kinaz ile inhibisyonunda alternatif bir mekanizma oluşturur (Shin vd., 2002). Myozin hafif zincir fosfataz (MLCP); 110 kDa. hedef/düzenleyici alt ünite (myozin bağlayan alt ünite, MYPT1), 37 kDa katalitik alt ünite tip 1 fosfataz (PP1), 20 kDa küçük düzenleyici katalitik olmayan alt ünite (M20) olmak üzere 3 alt birimden oluşmuştur. MYPT1 N terminalinde PP1 ile, C terminalde M20 ile etkileşir. Myozin fosfataz, myozin bağlayıcı alt ünite üzerinden fosforillenmiş myozin hafif zincirine bağlanır

ve onu defosforile eder. İn vitro olarak Rho-kinaz ile MYPT1'in fosforillenmesi myozin fosfataz (MP)'ı inhibe eder. MYPT ailesi MYPT1'e benzerlik derecelerine göre çeşitlendirilen MYPT2, MBS85, MYPT3, TIMAP üyelerini de içerir. Rho-kinaz aynı zamanda myozin hafif zinciri (MLC)'ni de fosforile ederek kasılma prosesine katkıda bulunur (Amano vd., 2000).

Myozin II'nin fosforilasyonu düz kas ve hücre kasılması, hücre hareketi, yapışması, hücre iskeleti yapısı, sitokinezis, trombosit aktivasyonu ve çeşitli iyon kanallarının etkileri gibi birçok hücrel fonksiyonlar için önemlidir. Bu olaylar için myozin fosfatazın hedefi genellikle myozin hafif zincirinin serin 19. aminoasididir. Ancak treonin 18 ve serin 9'u da defosforile edebilir. Moesin ve addusin diğer hedef proteinlerdir. Myozin fosfataz vasküler ton, kan basıncı kontrolü, gastrointestinal motilite, havayolu direnci, erektil fonksiyon, uterin kasılmalar gibi pekçok düz kas fonksiyonlarını düzenler (Ito vd., 2004). Protein kinaz C, CPI-17'nin fosforilasyonu ile fizyolojik olarak Ca^{2+} duyarlaşmasını sağlar. Fosforile olan CPI-17 myozin fosfataz'ın fosforilasyon bağımlı inhibitördür. Molekül ağırlığı 17 kDa'dur. Düz kasta ve beyinde ekspresyonu gösterilmiştir. PKC ve Rho-kinazın her ikisi için de alt efektördür (Ito vd., 2004). Tirozin kinaz, RhoGEF'ü tirozin fosforilleyerek aktive eder ve RhoA/ROCK'ın aktivasyonunu sağlayarak, myozin II'nin Ca^{2+} duyarlaşmasını başlatır. Tromboksan A2 mimetiklerle indüklenen aktif GTPRhoA'daki artış tirozin kinaz inhibitörleri ile inhibe edilir. ROCK ve tirozin kinaz inhibitörleri düz kasın agonistle indüklenen kasılmasını inhibe eder (Janssen vd., 2001). LIM-kinaz (LIMK) Rho-kinazın alt efektörüdür. Aktin depolimerize edici faktör kofilini, fosforile ederek aktivitesini azaltır, hücre iskeleti aktininin reorganizasyonu sağlar. Myozin II ATP'az aktivitesini arttıran F-aktin'in polimerizasyon yeteneğini arttırır. LIMK ile F-aktinin stabilizasyonu, stres lifleri içine aktinin polimerizasyonu için yeterlidir (Amano vd., 2001).

MYPT1 üzerinde çeşitli fosforilasyon alanları bildirilmiştir. Myozin hafif zincir fosfataz (MLCP) aktiviteleri için bu fosforilasyon alanlarının inhibisyonu önemlidir (Ihara ve McDonald, 2007). Rho-kinaz, MYPT1'in çeşitli bölgelerini fosforile edebilir. Treonin696 ve treonin853 2 major fosforilasyon alanıdır (Hirano, 2007). sAMP bağımlı PKA ve sGMP bağımlı PKG, Ca^{2+} duyarlaşmasında rol oynar. PKG ile MYPT1'in fosforilasyonunun MLCP aktivitesinde etkisiz olduğu gösterilmiş,

PKA/PKG ile Ser695'in fosforile edilmesinin, ZIPK (zipper interacting protein kinase) ile Treonin696'nın fosforile olmasını önlediği gösterilmiştir. sGMP ile indüklenen Ca^{2+} duyarlaşması kalponinle homoloji gösteren düz kas proteini (CHASM) veya 'smoothelin-like' 1 ve telokinle ilişkilidir (Ihara ve McDonald, 2007).

ZIPK, bir serin/treonin kinazdır. Molekül ağırlığı 54 kDa'dur. ZIPK, DAPKS (death associated protein kinases) ailesinin üyesidir. ZIPK hücre ölüm olaylarını, hücre hareketini, düz kas kasılmasını düzenler. 32 kDa'luk kısa kısmı düz kas kasılmasında rol oynar. 54 kDa'luk ZIPK myozin hafif zincir kinazın serin 19 ve treonin18. aminoasidini kalsiyum bağımsız difosforilleyerek kas olmayan hücrelerde apoptotik fonksiyonları düzenler veya CPI-17'nin treonin 38'ini fosforilleyerek indirekt olarak MLCP aktivitesini düzenler (Ihara ve McDonald, 2007). Kaveolin-1'in sıçan uterus düz kaslarında, PKC α ve RhoA'nın karbakol ile indüklenen membrana lokalizasyonunu engellemiştir. Kaveolinler, kaveolar plazma membran girintilerinin ana protein yapılarıdır. Uterus, mide ve ileal düz kaslarda her üç kaveolin izoformu da saptanmıştır. Kaveolalardaki yoğun cisimcikler hücre iskeleti için bağlanma bölgeleridir. Son zamanlarda kaveolinlerin eNOS, PKC α ve RhoA'yı da içeren birçok sinyal iletim molekülüyle etkileştiği gösterilmiştir. Kaveolin-1'in kısa sitoplazmik N-terminal bölgesi bu etkileşme için gerekli görülmektedir. Bu bölge çatı (scaffolding) bölgesi olarak isimlendirilmiştir. Fibroblastlarda kaveolden zengin membran bölgelerinde PKC α ve RhoA'nın birlikte yerleşim gösterdikleri tespit edilmiştir (Taggart vd., 2000). ROCK aktivasyonu endotelial nitrik oksit sentazın ekspresyonunu azaltır. Rho'nun veya Rho-kinazın inhibisyonu eNOS'un downregüle olmasını önler (Takemoto vd., 2002). Statinler, Rho geranilgeranilasyonunu inhibe ederek eNOS aktivitesini arttırır (Rikitake vd., 2005)

1.3.4.Rho-Kinaz İnhibitörleri

Rho kinaz enzimini inhibe eden ajanlar arasında, Y-27632 (trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4 piridinilsikloheksankarboksamid dihidroklorid), fasudil (HA-1077), hidroksifasudil, Y32885, Y-39983, H-1152P, SLx-2119, azabenzimidazol-aminofurazanlar (GSK-269962A ve SB77 2077 gibi) ve Wf-536 gibi birçok madde bulunmaktadır (Shi ve Wei, 2007). Rho kinaz'ın spesifik inhibitörleri (Somlyo ve

Somlyo, 1994) (fasudil, Y-27632, H-1152P gibi) kullanılarak daha sonra yapılan çalışmalar, bu enzimin hipertansiyon (Uehata vd., 1997), koroner arter spazmı (Kandabashi vd., 2000), glokom (Rao vd., 2001), kanser invazyonu (Takamura vd., 2001), akciğer harabiyeti (Köksel vd., 2005), kalp (Bao vd., 2004) ve karaciğerde (Takeda vd., 2003) iskemi-reperfüzyon hasarlanması, beynin iskemik zedelenmesi (Satoh vd., 2001) gibi hastalıklarda ve ayrıca üreter (Levent vd., 2004), safra kesesi (Şahan-Fırat vd., 2005; Büyükafşar vd., 2006), gastrik fundus (Büyükafşar ve Levent, 2003), vas deferens (Büyükafşar, 2003) fonksiyonlarında, ağrı iletiminde ve/veya oluşumunda (Büyükafşar vd., 2006) rolünün olduğunu ortaya çıkarmıştır.

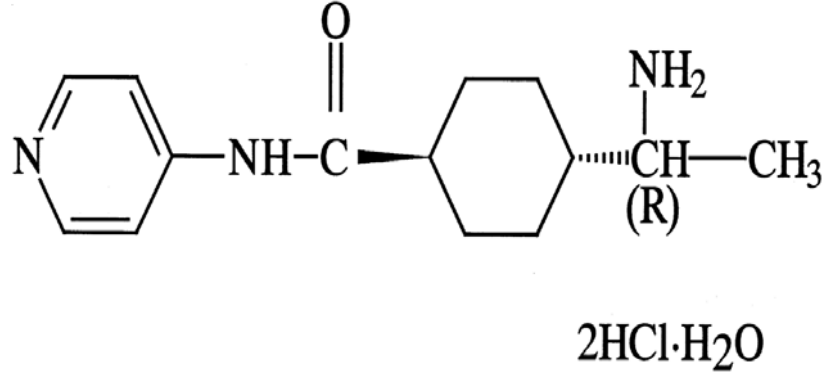
Hipertansif hastalarda periferik vasküler direncin artmasının patogeneğinde Rho-kinaz yolağının rolünün olabileceği öne sürülmüştür (Masumoto vd., 2001). Rho-kinaz sinyal yolağının sadece hipertansif vaskülopatide değil, aynı zamanda vasküler hastalıkların diğer formlarında da yer aldığı ortaya konmuştur (Shimokawa, 2002).

İnsan penil kavernoza düz kas hücrelerinde Rho-kinaz'ın varlığı ve aktivitesi (Rees vd., 2002), diyabetik korpus kavernoza da Rho-kinaz protein ekspresyonunun arttığı (Bivalacqua vd., 2004), asetilkoline gevşeme cevaplarının kontrole göre azaldığı, Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve fasudil ile oluşan gevşemelerin değişmediği, diyabete bağlı erektil disfonksiyonda Rho-kinaz sinyal yolağının katkısının olduğu (Büyükafşar, 2003), insan ve tavşan korpus kavernoza dokularında noradrenerjik sinir stimülasyonu ve fenilefrinle oluşturulan kontraksiyonların, Y-27632 ile konsantrasyon bağımlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir. Rho-kinaz enzim inhibitörünün intrakavernoza uygulanmasının anesteziye edilmiş sıçanlarda ereksiyona neden olduğu ve erektil disfonksiyonun tedavisinde Rho-kinaz antagonistlerinin tedavi edici ajan olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Chitale vd., 2001). Fasudil, Japonya'da 1995 yılında subaraknoid hemoraji sonrasında serabral vazospazmı tedavi etmek için onaylanmıştır ve ilaç olarak kullanılmaktadır. Rho kinaz inhibitörleri ROCK1 ve ROCK2 enzimini nonselektif olarak inhibe ederler, fakat XD-400 gibi ROCK2 selektif inhibitörü de geliştirilme aşamasındadır (Liao, 2007).

1.3.4.1.Y-27632 Maddesinin Yapısı

Bir Rho-kinaz inhibitörü olan Y-27632 maddesi *trans*-4-[(1*R*)-1-aminoetil]-*N*-4 piridinilsikloheksankarboksamid dihidroklorid formülüne sahiptir. Rho-kinaz alfa (ROCK α) ve Rho-kinaz beta (ROCK β)'nın her ikisini de katalitik uçlarından bağlanarak kompetitif inhibisyon yapar. Y-27632 Rho kinaz (ROCK) ailesini diğer kinazlardan (miyozin hafif zincir kinaz, siklik adenozin monofosfat (c-AMP) bağımlı kinaz ve protein kinaz-C) 100 kat daha etkili şekilde inhibe eder. Bu sonuçtan sonra Y-27632; Rho kinazların çeşitli sistemler üzerindeki etkilerini araştırma amacı ile nötrofil kemotaksisinde (Sahai vd., 1999), yara iyileşmesinde (Klages vd., 1999), hücre transformasyonunda (Fu vd., 1998), trombosit aktivasyonunda (Seasholtz vd., 1999), çeşitli uyanlarla oluşturulan aortik düz kas kasılmasında (Kuwahara vd., 1999), trombinin indüklediği aortik düz kas hücrelerinin cevabında (Yoshii vd., 1999), kardiyomiyozitlerin hipertrofinde (Nilius vd., 1999), bronşiyal düz kas kasılmasında (Itoh vd., 1999), volüm düzenleyici anyon kanallarının aktivasyonunda (Stryer, 1995), tümör invazyonunda (Traut, 1994) yaygın olarak kullanılmıştır.

Y-27632 maddesi kinazlarla bağlanma için adenozin trifosfat (ATP) ile yarışarak Rho kinazları inhibe eder. Hücre içerisine taşıyıcı ile hücre içi konsantrasyonundan bağımsız olarak difüzyonla taşınır ki bu sonuca göre hücre içi ile hücre dışı arasında neredeyse eşit konsantrasyona sahip olduğu ve böylece hücre içinde biyolojik cevaplara inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Y-27632 hücre içindeki spesifik etkilerini mikromolar düzeyinde gösterebilmesi ATP'nin de hücre içindeki konsantrasyonun milimolar düzeyinde olmasından dolayı ATP ile yarışmalı inhibisyon yapabilmesi görüşüyle çelişkilidir (Uehata vd., 1997; Ishizaki vd., 1997). Birçok çalışmanın sonucu göstermiştir ki; canlı ortamda Y27632'nin ATP ile yarışmalı inhibisyonunda farklı ilave mekanizmalar da rol alır (Kuwahara vd., 1999; Itoh vd., 1999; Hirose vd., 1998; Lu ve Mattson, 2001; Uchiyama ve Mihara 1978).



Şekil 1.4. Y-27632 maddesinin yapısı

1.4. Rho/Rho-kinaz Sinyal Mekanizmasının Rol Oynadığı Fizyolojik ve Patolojik Olaylar

1.4.1. Kardiyovasküler Sistemdeki Fonksiyonu

Bu sinyal ileti mekanizması vasküler sistemin tonusunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Rho/Rho sinyalizasyon yolağı sadece damar düz kasılmasına katkı sağlamaz aynı zamanda inflamatuvar arterosklerotik lezyonların gelişmesini önlemiştir (Shimokawa vd., 2001). Rho-kinazın kardiyovasküler yeniden yapılanma patogenezinde rol aldığı ortaya konmuştur (Kobayashi, 2002; Shimokawa vd., 2002). Yapılan bir çalışmada rekombinat cGMP ile cGMP-bağımlı protein kinazın RhoA'yı fosforilleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir (Chitaley ve Webb, 2002). Sıçan aortasında yapılan bu çalışmada, bir Rho-kinaz inhibitörü olan Y-27632'nin endoteliumlu dokularda fenilefrin ile oluşturulan kasılmaları endoteliumsuz olanlara göre nispeten daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca sodyum nitroprusiyatın fenilefrinle indüklenen RhoA translokasyonunu geri çevirdiği bulunmuştur. Buna karşın, endoteli sağlam aorta ringlerinde, nitrik oksit sentaz inhibitörleri ve guanilat siklaz inhibitörleri varlığında, fenilefrin kasılmalarının Y-27632'ye verdiği gevşeme yanıtları küntleşmiştir (Chitaley ve Webb, 2002). Sıçan superior mezenterik arterinde ROCK2 enziminin eksprese edildiği ve damar yatağı perfüzyon basıncının kontrolüne katkı sağladığı gösterilmiştir (Büyükaşar vd., 2004). Miyokardiyal infarktüsün deneysel modeli olarak uygulanan koroner arter oklüzyon-reperfüzyon modelinde, Rho-kinaz inhibitörlerinin anestezi altındaki sıçanlarda iskemi-reperfüzyonla oluşan aritmiler ve infarkt alanı üzerindeki etkileri incelenmiş ve Rho-

kinaz inhibitörlerinin kalpte önkoşullama oluşturabilmeleri yanında antiaritmik etkili oldukları da gösterilmiştir (Demiryürek, 2005 a,b). Vazospastik anjina, iskemik inme ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda Rho-kinazın esaslı bir rol oynadığı gösterilmiştir (Noma, 2006).

Rho/rho kinaz yolağı, hipertansiyon, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, aritmi, diyabetik komplikasyonlar ve hipertrofik kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir terapötik hedef olarak görünmektedir (Wettshureck ve Offemanns, 2002; Ren ve Cindy, 2005).

1.4.2. Gastrointestinal Sistemdeki Fonksiyonu

Bu sinyal ileti mekanizması gastrik fundus düz kasında Rho kinazın gerek agonist, gerek nöral ve gerekse depolarizasyonla oluşturulan kasılmalarında rol aldığı ayrıca kolinerjik sinirlerden nörotransmitter, asetilkolin salıverilmesine karıştığı gösterilmiştir (Büyükafşar ve Levent, 2003). Rho kinaz sinyal ileti mekanizması, koyun ve insan safra kesesi kontraktilitelerine de aracılık etmektedir (Şahan-Fırat vd., 2005; Büyükafşar vd., 2006).

1.4.3. Solunum Sistemindeki Fonksiyonu

Rho aracılı sinyalin Ca^{+2} duyarlaşması üzerinden hava yolu düz kas tonusunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hayvan modelleri bu yolağın hava yolu duyarlılık artışı durumlarında özellikle aktive olduğunu göstermiştir (Chiba vd., 1995; Chiba vd., 1999). Rho kinaz inhibisyonu vasküler ve solunum düz kas migrasyonunu da bloke etmektedir (Gerthoffer, 2007,2008). Rho kinaz selektif inhibitörü Y-27632 inhalasyonu asetilkolin ve ovalbumin ile indüklenen solunum yolu rezistans artışını inhibe etmiştir (Iizuka vd., 2000). Oleik asit ile indüklenen ARDS modelinde Y-27632 akciğer hasarlanmalarını önlemede oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Köksel vd., 2005).

1.4.4. Ürogenital Sistemdeki Fonksiyonu

RhoA ve Rho-kinazın penil düz kasında eksprese olduğu gösterilmiştir (Rees vd., 2002; Wang vd., 2002). RhoA kavernozaal düz kasta vasküler düz kasa oranla 17 kat daha fazla eksprese olmaktadır (Wang vd., 2002). Rho-kinazın selektif inhibitörünün in vitro olarak insan korpus kavernozaumunda relaksasyon meydana getirdiği ve hayvan modellerinde ise, penil ereksiyonu indülediği gösterilmiştir (Chitaley vd., 2001; Rees vd., 2001). Dominant negatif RhoA verilmiş olan anestezi altındaki sıçanlarda, kontrol grubu denekler ile kıyaslandıklarında erektil fonksiyonda artma görülmüştür (Chitaley vd., 2002).

Bütün bunların sonucunda, penil düz kasların fazik kontraksiyonunun, $[Ca^{+2}]$ 'daki artış ile regüle edildiği ve tonik kontraksiyonun ise, kalsiyum sensitizan yollar tarafından yönetildiği sonucuna ulaşılmaktadır (Cellek vd., 2002).

Klitoriste ve vajinada ROCK inhibisyonunun inhibitör etki oluşumunu sağladığı bildirilmektedir (Park vd., 2002; Cellek, 2003). Rho/Rho kinaz yolağının üreter düz kasın çeşitli eksitator uyarılarla indüklenen kontraktıl aktivitelere önemli katkı sağladığı gösterilmiştir ve ROCK inhibitörlerinin renal kolik tedavisinde potansiyel antispazmodik olabileceği gösterilmiştir (Levent ve Büyükafşar, 2004).

1.4.5. Santral Sinir Sistemindeki Fonksiyonu

Rho kinaz enziminin hem beyinde hem de omurilikte eksprese edildiği ve ağrı cevabına karıştığı gösterilmiştir (Büyükafşar vd., 2006). Çeşitli çalışmalarda ROCK inhibitörlerinin spinal kord yaralanmasının hayvan modelinde, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, nöropatik ağrı, diğer nörolojik hastalıklarda potansiyel nörodejeneratif tedavi edici ajan olabileceği öne sürülmüştür. ROCK-2 CRMP2 (kollapsin response mediatör protein2)'yi fosforile ederek sinir sistemi gelişmesi esnasında semaphorin 3A'nın oluşturduğu akson uzamasında rol oynar (Mueller ve Mack, 2005).

Y-27632'nin intratekal uygulamasının insan neoplastik menenjit tedavisi için uygun kemoterapötiklerle kombine edilmesinin faydalı olabileceği önerilmektedir

(Nakagawa vd., 2005). Rho-bağımlı sinyal yolağının, vasküler ve vasküler olmayan düz kas kasılması dışında, hücre iskeletinin aktinini etkileyerek sitokinez, hücre morfolojisi ve hücre göçünü de içeren farklı hücre fonksiyonları (Fukata vd., 2001), aynı zamanda nöronal fonksiyonları (Nikolic, 2002) düzenlediği bildirilmiştir.

Ayrıca kas olmayan hücrelerden sinir hücrelerinde de Rho GTP'azların, sinaps oluşumu, akson göçü, dendrit girintileri ve şekillenmesi, aksonun büyümesi, polaritesi gibi olaylarda fonksiyonu olduğu bildirilmiştir (Luo, 2000). Rho proteinlerinin astrositlerin şeklini ve diğer nöronlarla etkileşimini düzenlediği, Rho A'nın nörit retraksiyonu için esansiyel olduğu, RhoA'nın inaktivasyonunun aktomyozin kontraktilitesini ve nörit gelişimini baskıladığı da rapor edilmektedir (Jalink vd., 1994). İskemik beyinde ROCK-2'nin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Serebral infarkt esnasında aksonlarda, ROCK'un aktive olduğu, bunun fasudil ile önlediği bildirilmiştir (Yamashita vd.,2007). Glutamatın nöronal hücrelerde ROCK'u aktive ettiği, fasudilin ise glutamatın indüklediği sinir hasarı ve hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Yamashita vd.,2007). Ayrıca Rho-kinazın ağrı iletiminde rol oynadığı bildirilmiştir (Büyükaşar vd., 2006).

1.4.6.Karaciğerdeki Fonksiyonu

Rho/Rho-kinaz sinyalizasyon yolağının, karaciğer stellat hücrelerinin kasılma, göç (Kawada vd., 1999), çoğalma (Iwamoto vd., 2000) gibi fonksiyonlarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yolağın aktivitesindeki artış, hepatosit stellat hücrelerinin kasılmasını, hücrenin ekstraselüler matrikse tutunmasını arttırarak hücre morfolojisini düzenlediği gösterilmiştir (Yanase vd., 2000). Karaciğer stellat hücrelerinin yaşam süresinin Rho/Rho-kinaz yolağı ile etkilendiği, bu yolağın inhibe edilmesinin *P53*, *Bcl2*, *Bax* seviyelerini etkilemeden, kaspaz 3 aktivitesini arttırdığı, karaciğer stellat hücrelerinde apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan Rho/Rho-kinaz yolağının aktive edilmesinin ise DNA kırılmasını azalttığı iddia edilmiştir (Ikeda vd., 2003). Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin karaciğer stellat hücrelerinde endotelin-1 ile oluşturulan kasılmaları ve portal damar basınç artışını inhibe ettiği (Kawada vd., 1999), hepatoselüler kanserlerin intrahepatik ve peritoneal metastazlarını azalttığı bildirilmiştir (Itoh vd., 1999). Ayrıca septik karaciğer hasarına karşı Rho-kinaz inhibitörlerinin koruyucu olduğu öne sürülmüştür

(Thorlacius vd., 2006). Karaciğerin iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında Rho/Rho-kinaz yolağının aktive olduğu, Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin hepatik iskemi reperfüzyon hasarlanmasını azalttığı bildirilmiştir (Takeda vd., 2003).

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Araştırmacıların farklı zamanlarda yaptıkları çalışmalarda Rho/Rho kinaz yolağının, hücre adezyonu, migrasyonu, şekil değişiklikleri ve sitokinez de etkili olduğu bildirilmiştir (Kimura, 1996; Fukata, 1999). Rho kinazın bu etkisiyle yola çıkan araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda Rho kinaz inhibisyonu ile bu hücre fonksiyonlarının azaltıldığı ve kanser hücrelerinde metastazın baskılandığını göstermişlerdir (Takamura, 2001; Ying, 2006).

Onkojenik değişim, hücre çoğalmasında kontrolün kaybedilmesiyle ve hücrenin morfolojik değişimleriyle karakterizedir. Hücredeki morfolojik değişiklikler aktin stres lifleri vasıtasıyla sağlamaktadır. Hücrelerin onkolojik değişikliğe uğramasında Rho proteinleri ve Rho-kinazın aktivasyonunun önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Itoh, 1999).

RhoA/ROCK yolunun glioma hücrelerinde apoptosizi olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Daha sonra Rho-kinaz inhibisyonunun apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Rattan, 2006). Metastatik özofajial kanser hücre kültüründe yapılan çalışmada Rho-kinaz aracılığıyla invazyon ve mobilitenin arttığı ve bu durumun Y-27632 maddesiyle inhibe edildiği bildirilmiştir (Lawler, 2006).

Testis GCT (germ cell tumor) dokularından sağlanan örneklerle yapılan çalışmada, testiküler tümörlerde RhoA ve Rho-kinaz mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu bulgular sonucunda Rho/Rho-kinaz yolağının testis tümör ilerlemesinde yer aldığı bildirilmiştir (Kamai, 2002).

Farelerde yapılan in vivo denemelerde, B16 melanoma hücrelerinde Rho-kinaz inhibitörü WF-536'nın invazyonu baskıladığı ve akciğer metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Nakajima, 2003a).

Nakajima (2003b) ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, *in vivo* tümör metastazı ve bu mekanizmayı aydınlatmak için Rho kinaz inhibitörlerinden WF- 536 maddesinin etkinliğini araştırılmıştır. Sonuç olarak Rho kinaz inhibitörü WF- 536 maddesinin tümör hücresi invazyon ve migrasyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği bildirilmiştir.

İnsan over kanser hücrelerinde ROCK1'e karşı ASODN (antisens oligodeoksinükleotid) ile yapılan çalışmada ROCK1'in migrasyon ve invazyonunu artırırken oligodeoksinükleotidin bu hücrelerin motilitesini ve invazif özelliğini inhibe ettiği gösterilmiştir. Böylece bu çalışmada over kanser hücrelerinde metastazın önlenmesi için önemli bir hedef olabileceği bildirilmiştir (Han, 2005).

Trombosit kökenli endotel hücre büyüme faktörü (PD-EDGF) uygulanan kültür hücrelerinde ROCK1'in aşırı ekspresyonuna ve kanser hücresi motilitesinin artmasına neden olduğu bulunmuştur (Yoshinaga, 2003).

Araştırmacılar tarafından farklı yıllarda yapılan çalışmalarda hipoksi ile indüklenen anjiyogeneze Rho-kinazın aracılık ettiği ve Rho-kinaz inhibisyonunun anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Hyvelin, 2005; Yin, 2007).

Metastaz hücre iskeletinin, hücre hücre ve hücre matriks bağlantılarının yeniden yapılandırılması ile tümör kitlesinden hücrelerin ayrılması, çevre dokuları istila ederek vücuda yayılması sürecidir. Metastazda görülen bu olaylarda Rho GTPaz ailesinin rolü vardır (Vega, 2008).

Ras DNA ile transfekte edilmiş insan mesane kanseri TSGH 8301 hücre kültüründe yapılan çalışmada Y- 27632 uygulaması sonucu kanser hücrelerinin invazyonunda ve migrasyonunda azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak mesane kanserinde yeni tedavi yöntemleri için iyi bir fırsat olabileceği bildirilmiştir (Chang vd., 2010).

Yüksek metastatik özelliğe sahip HCC hücre hattında ROCK sinyal yolunun metastatik özelliği arttırdığı ve Y- 27632 inhibisyonu sonucu kanser gelişiminin ve intrahepatik metastaz gelişiminin yavaşlatıldığı bildirilmiştir. Böylece ROCK-sinyal

aracılı inhibisyonun HCC tedavisinde yararlı olabileceği gösterilmiştir (Xue vd., 2007).

Metastatik Rho kinaz enzimlerinden olan ROCK1 ve ROCK2 gen polimorfizmleri ile meme kanserinin metastaz yapma özelliği arasındaki ilişkiyi göstermek için yapılan bir çalışma sonucu elde edilen verilere göre ROCK2 genindeki Thr431Asn polimorfizminin, meme kanserinde metastaz gelişimini önceden tahminde bir belirleyici olarak kullanılmasının mümkün olduğu bildirilmiştir (Camcı vd., 2008).

Rho-kinaz metastatik meme kanser hücrelerinde CD44v (3,8-10)-ankyrin etkileşimi ve tümör hücre göçüyle ilgili yapılan çalışmada meme kanseri hücresi migrasyonu, metastazı ve invazyonu ile Rho/Rho kinaz ekspresyonu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Bourguignon vd., 1999; Yoshioka vd.,1999).

Karaciğer stellat hücreleriyle yapılan çalışmada karaciğer stellat hücrelerinin yaşam süresinin Rho/Rho-kinaz yolağı ile etkilendiği, bu yolağın inhibe edilmesinin *P53*, *Bcl2*, *Bax* seviyelerini etkilemeden, kaspaz 3 aktivitesini arttırdığı, karaciğer stellat hücrelerinde apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte Rho/Rho-kinaz yolağının aktive edilmesinin ise DNA kırılmasını azalttığı iddia edilmiştir (Ikeda vd., 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Ajanlar

Ksantin oksidaz (Sigma, Germany), Nitroblue tetrazolyum (Roche), Ksantin (Merck, Germany), Etanol (Grup Delta), Asetik Asit (Merck, Germany), Hidrojen peroksit (Merck, Germany), Etilendiamine-tetraasetik asit (EDTA) (Sigma, Germany), Sülfirik asit (Merck, Germany), Formaldehit (Sigma, Germany), Sodyum asit (Merck, Germany), Diyominobenzidin (Sigma, Germany), Aseton (Merck, Germany), Kloroform (Merck, Germany), Hemotoksilen (Sigma, Germany), Nikotinamid-Adenin Dinükleotit Fosfat (β -NADPH) (İndirgenmiş form) (Sigma, Germany), Glutasyon (Okside,% 98) (Sigma, Germany), Glutasyon redüktaz (Sigma, Germany), Bovin serum albumin (Sigma, Germany), Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) (Carlo Erba, France), Amonyum Bromit (Sigma, Germany), 4-aminoantipirin, Fenol (Merck, Germany), Butillendirilmiş hidrokstolyen (BHT) (Sigma, Germany), Sülfirik asit (Merck, Germany), Sodyum klorid (Riedel-de Haën), Ksenol orange tetrasodyum (Merck, Germany), Gliserol (Carlo Erba, France), Amonyum-Fer (II) sülfate heksahidrat (Merck, Germany), 2-Tiyobarbütürik asit (Sigma), 1,1,3,3,-Tetraetoksi Propan (Sigma), Tris Hidrokloride (Ambresco), Tris Base (Sigma, Germany), Etilen Glikol (Fluka), 5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid), DTNB (Sigma, Germany), Parafin (Sigma, Germany), ROCK-2 (Tocris Bristol, United Kingdom), Y-27632 (Tocris).

3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

Doku Takip Cihazı, Etüv (Nüve EN 500), Mikrotom (MicroTec Cut 4060), Hassas Terazi (Precisa 160M), Isıtıcı (Velp Scientifica), Işık Mikroskobu (MicrosMC300A),

Fotoğraf Makinesi (Fujifilm Fine Pix 600S zoom), Motic Plus 2,0 Yazılım Programı ve Motic marka Kamera (Motic), Cedex XS (Roche) hücre sayım cihazı.

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları

Araştırmada kullanılan deney hayvanları *Swiss Albino* türü (30- 40g ve 8-10 haftalık) erkek fareler olup Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma merkezinden temin edilmiştir. Hayvanlar 23°C’de 12 saat aydınlık-karanlık siklusuyla propilen kafesler içinde laboratuvar ortamında yetiştirilmiştir. Deneme için seçilen hayvanların hiçbiri göz, kulak enfeksiyonu taşıyor, yamalı tüy ya da açık yara barındırmıyordu. Deney hayvanlarının beslenmesinde hazır pelet yem kullanılmıştır ve su *ad libitum* olarak verilmiştir. Hayvanların beslenmelerinde kullanılan yem Gaziantep Keskin Yem Fabrikasından getirilmiştir. Yemin bileşiminde bulunan maddeler Tablo 3.1’ de ve enerji düzeyleri de Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deney Hayvanlarına Verilen Yemin İçeriği

Yem Maddeleri	Yüzdeleri (%)
Mısır	34
Arpa	5,4
Buğday	13
Kepek	2
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8,5
Et-Kemik Unu	4
Kireç Taşı	0,5
DCP	1
Tuz	0,6
Vitamin Karması	1
Mineral Karması	1
Melas	4

Tablo 3.2. Deney Hayvanlarına Verilen Yemdeki Besin Maddeleri ve Enerji Düzeyi

Besin Maddeleri ve Enerji Düzeyleri	Yüzdeleri (%)
Kuru Madde	86,32
Ham Protein	23,99
Kalsiyum	1,17
Fosfor	0,9
Met + Sis	0,77
Lizin	1,48
Ham Yağ	3
Ham Selüloz	3,18
Metabolik Enerji (kcal/kg)	2658,31

3.2. Yöntemler

3.2.1. *Swiss Albino* Türü Farelerde Ehrlich Ascites Tümör (EAT) Oluşturulması

Çalışmamızda sıvı tümör oluşturulmasında İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen peritonunda sıvı EAT taşıyan stok fare (ağırlığı 30g, 2 aylık) kullanılmıştır. Bu fareden alınan EAT sıvısı Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma merkezinden temin edilen ağırlıkları 30-40g arasında değişen 8-10 haftalık *Swiss Albino* türü farelerin peritonuna enjekte edilmiştir ve elde edilen periton sıvısı çalışmalarımızda kullanılmıştır. Bu sıvı, 0,1 ml PBS içinde süspansiyon edilerek Tripan blue ile boyanarak hücre sayım cihazında (Cedex XS, Roche) sayılmıştır ve yaklaşık olarak 1×10^6 EAT hücresi farelere i.p. olarak enjekte edilmiştir.

3.2.2. Y-27632 inhibitör maddesinin hazırlanması

Y-27632 dihidroklorit Tocris Cookson Ltd (Bristol, United Kingdom)'dan satın alınmıştır ve %0,9 NaCl (Eczacıbaşı-Baxter, İstanbul Türkiye) içinde çözülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırladığımız Y-27632 solüsyon deney hayvanlarına intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

3.3. Y-27632 maddesinin EAT Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması

Çalışmada Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma merkezinden sağlanan 30-40 g ağırlığında 8-10 haftalık 90 adet *Swiss Albino* türü erkek fareler kullanılmıştır. Deneme grupları tümör öncesi ve tümör sonrası olarak dizayn edilmiş ve kontrol grupları da dahil olmak üzere 9 grup oluşturulmuştur (n=10). Y-27632 maddesi 0,1-1-10 mg/kg/gün dozlarında, kontrol gruplarına ise 1 mg/kg/gün serum fizyolojik i.p. olarak enjekte edilmiştir. Tümör öncesi gruplara uygulamanın ikinci gününden itibaren, tümör sonrası gruplara ise uygulamaya başlamadan 2 gün önce 1×10^6 EAT hücresi i.p. olarak enjekte edilmiştir. Deneme süresi 15 günle sınırlandırılmıştır. Uygulama sonunda tüm hayvanlardan heparinize enjektörler vasıtasıyla kardiyak kanlar alınmış ve ardından eter anestezisi altında sakrifikasyon yapılmıştır.

3.3.1. Oluşturulan Gruplar ve Yapılan İşlemler

3.3.1.1. Y-27632 Maddesinin T.Ö. Uygulanan Gruplar

GRUP 1: Denemenin ilk gününden itibaren hazırlanan 0,1 mg/kg/gün Y-27632 maddesi her gün ve denemenin 3. gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez olmak üzere hayvanlara i.p. olarak uygulanmıştır.

GRUP 2: Denemenin ilk gününden itibaren hazırlanan 1 mg/kg/gün Y-27632 maddesi her gün ve denemenin 3. gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez olmak üzere hayvanlara i.p. olarak uygulanmıştır.

GRUP 3: Denemenin ilk gününden itibaren hazırlanan 10 mg/kg/gün Y-27632 maddesi her gün ve denemenin 3. gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez olmak üzere hayvanlara i.p. olarak uygulanmıştır.

Tümör Öncesi Kontrol: Denemenin ilk gününden itibaren 1 mg/kg/gün SF her gün ve denemenin 3. gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez olmak üzere hayvanlara i.p. uygulanmıştır.

3.3.1.2. Y-27632 Maddesinin T.S. Uygulanan Gruplar

GRUP 1: Denemenin ilk gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez ve denemenin 3. gününden itibaren 0,1 mg/kg/gün Y-27632 maddesi her gün olmak üzere hayvanlara i.p. uygulanmıştır.

GRUP 2: Denemenin ilk gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez ve denemenin 3. gününden itibaren 1 mg/kg/gün Y-27632 maddesi her gün olmak üzere hayvanlara i.p. uygulanmıştır.

GRUP 3: Denemenin ilk gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez ve denemenin 3. gününden itibaren 10 mg/kg/gün Y-27632 maddesi her gün olmak üzere hayvanlara i.p. uygulanmıştır.

Tümör Sonrası Kontrol: Denemenin ilk gününde 0,1 ml içerisinde 1×10^6 EAT hücresi bir kez ve denemenin 3. gününden itibaren 1 mg/kg/gün SF her gün olmak üzere hayvanlara i.p. uygulanmıştır.

Sağlıklı Kontrol: denemenin ilk gününden itibaren 1 mg/kg/gün SF her gün olmak üzere hayvanlara i.p. uygulanmıştır.

3.4. Tümör Gelişiminin Takip Edilmesi

Tümör gelişimi günlük besin ve su tüketimi ve deneme süresince hayvanların ağırlık artışlarıyla takip edilmiştir. Tümör gelişimini belirlemek için tümör inokulasyonundan önce belirlenen vücut ağırlıklarına kıyasla her gün hayvanlar tartılmıştır.

Ayrıca çalışmanın başlangıcında hücre sayım cihazında sayılarak hayvanlara inokule edilen 1×10^6 EAT hücresi deneme bitiminde hücre sayısı ve canlılık oranlarının belirlenmesi amacıyla tekrar sayılmış ve değerlendirilmiştir.

3.5. Biyokimyasal Analiz

Toplanan kardiyak kanlarda oksidan Malondialdehit (MDA) ve antioksidan Redükte Glutasyon (GSH) parametrelerine bakılmıştır.

3.5.1. MDA Ölçümü

Yoshioka ve arkadaşlarının MDA çalışma yöntemi esas alınarak uygulanmıştır (Yoshioka vd., 1979).

3.5.1.1. Hazırlanan çözeltiler

- 1- Triklorasetik asit (% 20): 20 g triklorasetik asit (TCA) alınarak, bir miktar distile suda çözülmüş ve hacim 100 ml' ye tamamlanmıştır.
- 2- Tiyobarbütirik asit (% 0,67): 1,675 g tiyobarbütirik asit alınarak, bir miktar distile suda çözülmüş ve hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 3- Standart MDA çözeltisi: 0,494 ml 1,1,3,3-tetraetoksipropan 100 ml alkolde çözülerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlanmıştır. Bundan 0.1 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlanmış ve 20 mol/L'lik standart çözelti elde edilmiştir.

3.5.1.2. Deneyin yapılışı

Test ve kör olarak işaretlenen cam deney tüpleri alınmıştır ve test tüpüne 0.5 ml plazma eklenmiştir. Kör tüpüne 3 ml ve test tüpüne 2,5 ml, % 20'lik TCA ilave edilmiştir ve daha sonra her iki tüpe 1 ml TBA alınmış ve tüpler 90 C' lik su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin tamamlanmasıyla birlikte soğutulan tüplere 4 ml n-bütanol konularak 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra n-bütanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak 535 nm'de köre karşı, testin absorbansı spektrofotometrede okunmuştur.

3.5.2. GSH Ölçümü

Beutler ve arkadaşlarının GSH çalışma yöntemi esas alınarak uygulanmıştır (Beutler, 1963).

3.5.2.1. Hazırlanan çözeltiler

- 1- Çöktürücü çözelti: 1.67 g metafosforik asit, 0,2 g etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) ve 30 g NaCl alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 2- Fosfat çözeltisi (0.3M Na₂HPO₄): 53.4 g Na₂HPO₄·2H₂O bir miktar distile suda çözülerek hacmi litreye tamamlanmıştır.
- 3- DTNB çözeltisi (Ellman's çözeltisi): 40 mg DTNB alınarak %1'lik sodyum sitrat ile hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.
- 4- Standart GSH çözeltisi: 40 mg GSH alınarak distile su ile hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.5.2.2. Deneyin Yapılışı

Kör, standart ve test olarak işaretlenen tüplerden test tüpüne, 200 ul EDTA'lı kan, standart tüpüne 200 ul standart çözeltisi alınarak üzerine 1800 ul distile su ve 3 ml çöktürücü çözelti eklenmiştir. Kör olarak işaretlenen tüpe 800 ul distile su, 1200 ul çöktürücü çözelti eklenerek tüpler karıştırılmış ve buzlu suda 5 dk bekletildikten sonra 3000 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir. Kör tüpü aynen alınarak standart ve test olarak işaretlenen yeni tüplere 2'şer ml süpernatant alınmıştır. Bütün tüplere 8'er ml fosfat çözeltisi ilave edildikten sonra 1 ml DTNB eklenip, 412 nm'de köre karşı, testin absorbansı spektrofotometrede okunmuştur.

3.6. EAT'nin Patolojik Olarak İncelenmesi

Tüm gruplar eter anestezisi altında sakrifiye edildikten sonra farelerin kalınbarsak ve incebarsak dokuları ambulok çıkarılarak örnek alınmıştır. Tüm örnekler 24 saat %10'luk tamponize formaldehitte bekletilmiş, daha sonra değişik derişikliklerdeki alkoller ve ksilollerden geçirilerek 24 saat içerisinde tespit edilmiştir. Böylece parafin blokları hazırlanan doku örneklerinden 4 mikron kalınlığında doku kesitleri alınmıştır ve deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Hematoksilen ile boyanan örnekler ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra Nikon marka ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

3.7. İmmünohistokimyasal Yöntem

İnce ve kalın bağırsak dokularından hazırlanan kesitler deparafinizasyondan sonra Ventana Benchmark XT cihazında (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, Amerika Birleşik Devletleri), bu cihaza uygun kit ile AMPLIFIER A, B güçlendiriciler kullanılarak bir sonraki aşamaya uygun hale getirilmiştir. Daha sonra 60 dakika kaynatma protokolu uygulanarak 1/40 dilüsyon ile Rock-2 (BD Transduction Laboratories, Kanada) antikoru ile boyama yapılmıştır. Boyama sonrasında ışık mikroskopunda Rock-2 protein ekspresyonu incelenmiştir (Ark vd., 2005).

3.7.1. İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi

Tümör hücrelerindeki sitoplazmik boyanma oranı ve şiddeti değerlendirilmiştir. Boyanma oranı semikantitatif olarak şu şekilde derecelendirilmiştir: 0 = tümör hücrelerinin %1'den azında boyanma; 1+ = tümör hücrelerinin %1- 10'unda boyanma; 2+ = tümör hücrelerinin %11-50'sinde boyanma; 3+ = tümör hücrelerinin %51-80'inde boyanma; 4+ = tümör hücrelerinin %80'inden fazlasında boyanma. Boyanma şiddeti de şu şekilde derecelendirilmiştir: 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun. Daha sonra “(1+boyanma şiddeti/3) x boyanma oranı” formülü ile toplam skor hesaplanarak ve bu skora göre olgular 4 gruba ayrılmıştır: 0 = boyanmayan, 1 = minimal boyanan, 2 = orta dereceli boyanan, 3 = güçlü boyanan şeklinde değerlendirilmiştir (Çoban vd., 2010).

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 13.0 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede Kruskal-Wallis varyans analizi ve Friedman testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda EAT Sayısı

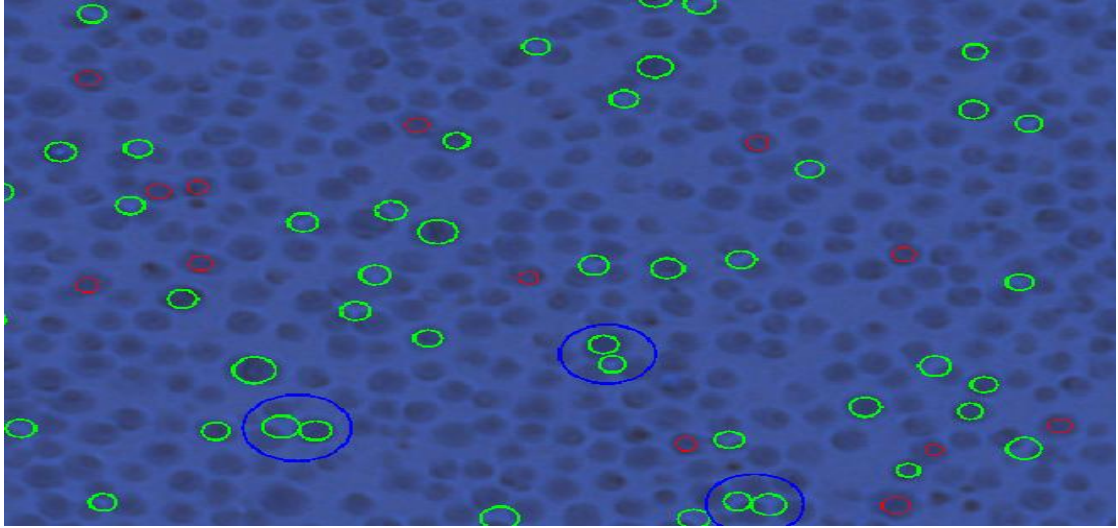
T.Ö. gruplar değerlendirildiğinde deneme grupları ve kontrol grubunda EAT hücresi canlılık yüzdeleri başlangıç değerlerine oranla anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,05$). Başlangıçta %98 olan canlılık yüzdeleri gruplar arasında sırasıyla %44, %26, %27 ve kontrol grubunda %32 olarak bulunmuştur.

Deneme sonundaki EAT hücresi canlılık yüzdeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında ise kontrol grubuna kıyasla yalnızca 1. Grupta anlamlı bir farklılık bulunurken ($p<0,05$); 2. ve 3. Gruplarda ise anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Deneme başlangıcında verilen EAT hücresi için Tablo 4.1’ de verilen değerler bulunmuştur. Tripan mavisi ile boyanmış başlangıç EAT hücre görüntüsü Resim 4.1’ de verilmiştir.

Tablo 4.1. T.Ö Deney Başlangıcında verilen EAT hücre parametreleri (c /10 ul)

Parametreler	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı	Toplam hücre sayısı	Canlı hücre konsantrasyonu	Ölü hücre konsantrasyonu	Toplam hücre konsantrasyonu	Canlılık (%)
Değerler	1823	35	1858	4.1×10^6	1×10^6	4.2×10^6	98.1



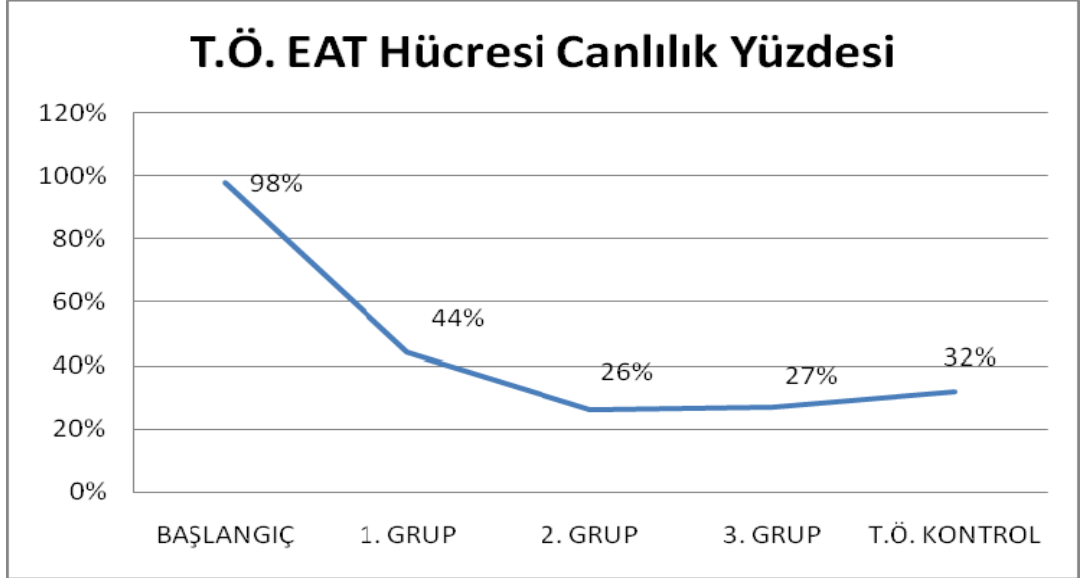
Resim 4.1. T.Ö. Başlangıç EAT hücrelerinin tripan mavisi ile boyanmış görüntüsü (Yeşil daireler ile işaretlenmiş olanlar canlı EAT hücrelerini, kırmızı daireler ile işaretlenmiş olanlar ölü EAT hücrelerini göstermektedir. Mavi daireler ise agregasyonu işaret etmektedir) (x400)

Deneme sonunda hayvanlardan alınan EAT hücrelerinin gruplara göre hücre sayım cihazında belirlenen sayıları ve canlılık oranları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. T.Ö. Deneme Gruplarına Ait EAT Hücrelerinin Canlılık Parametreleri (c /10 ul)

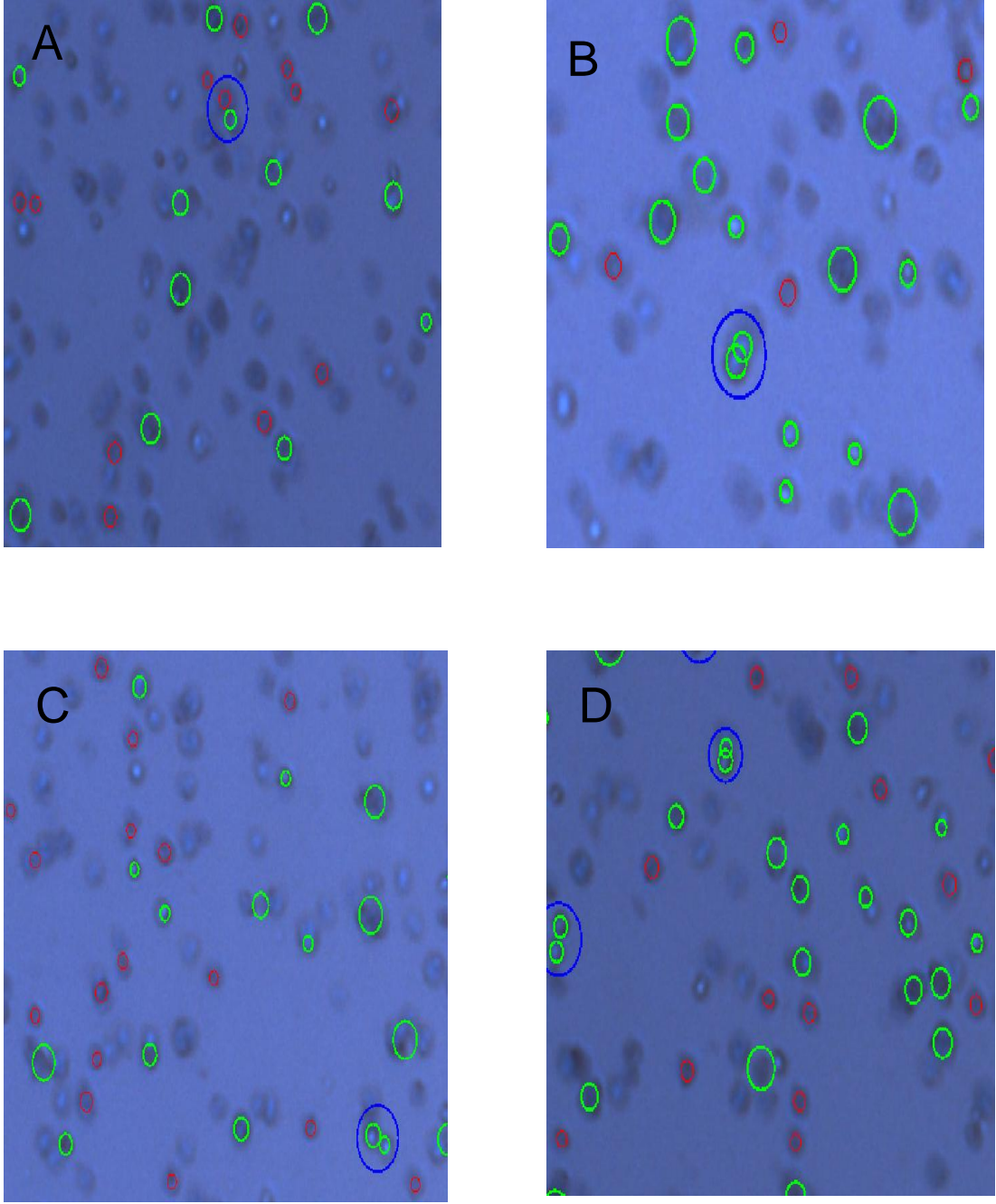
Adı	Ortalama Canlı hücre sayısı	Ortalama Ölü hücre sayısı	Toplam hücre sayısı	Canlı hücre konsantrasyonu	Ölü hücre konsantrasyonu	Toplam hücre konsantrasyonu	Canlılık (%)
Grup 1	221	277	498	0.508×10^6	0.647×10^6	1.155×10^6	44
Grup 2	87	250	337	0.290×10^6	0.827×10^6	1.117×10^6	26
Grup 3	135	360	495	0.473×10^6	1.281×10^6	1.754×10^6	27
Kontrol	108	228	336	0.289×10^6	0.617×10^6	0.906×10^6	32

Gruplar arasında EAT hücrelerinin canlılık yüzdelerinin azalışı Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. T.Ö. Deneme Süresince Grumlardaki EAT Hücrelerinin Canlılık Yüzdesi

Deneme sonunda elde edilen T.Ö. gruplara ait hücre görüntüleri Resim 4.2, A, B, C, ve D’de verilmiştir.



Resim 4.2. T.Ö. gruplara ait hücre görüntüleri **A:** T.Ö. 1. Gruba ait, **B:** T.Ö. 2. Gruba ait, **C:** T.Ö. 3. Gruba ait, **D:** T.Ö. Kontrol grubuna ait tripan mavisi ile boyanmış EAT hücrelerinin görünümü (Yeşil daireler ile işaretlenmiş olanlar canlı EAT hücrelerini, kırmızı daireler ile işaretlenmiş olanlar ölü EAT hücrelerini göstermektedir. Mavi daireler ise agregasyonu işaret etmektedir) (x400)

4.2. Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda EAT Sayısı

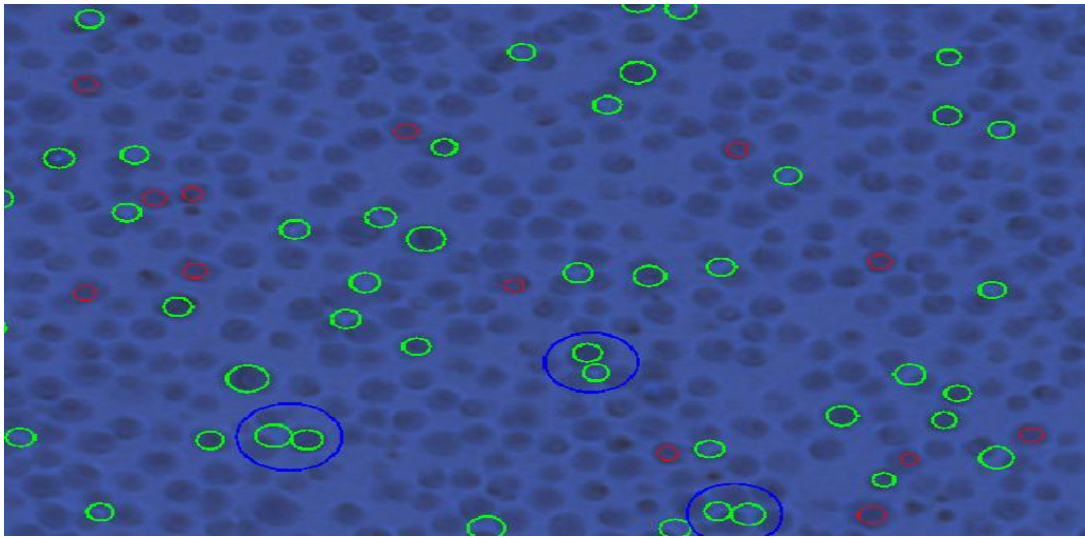
T.S. deneme grupları arasında yer alan 3. Grupta % 90 mortalite görüldüğünden bu grup değerlendirmeye alınmamıştır. Deneme başlangıcında inokule edilen EAT hücreleri %98 canlılık yüzdesine sahipken deneme sonunda bu değer gruplar

arasında sırasıyla %50 ve %48'e ve kontrol grubunda %55 değerine düşmüştür fakat bu değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte deneme grupları ve kontrol grubu kıyaslandığında da anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Deneme başlangıcında verilen EAT hücresi için Tablo 4.3' de verilen değerler bulunmuştur. Tripan mavisi ile boyanmış başlangıç EAT hücre görüntüsü Resim 4.3' de verilmiştir.

Tablo 4.3. T.S. Deney Başlangıcında verilen EAT hücre parametreleri (c /10 ul)

Parametreler	Canlı hücre sayısı	Ölü hücre sayısı	Toplam hücre sayısı	Canlı hücre konsantrasyonu	Ölü hücre konsantrasyonu	Toplam hücre konsantrasyonu	Canlılık (%)
Değerler	1823	35	1858	4.1×10^6	1×10^6	4.2×10^6	98.1



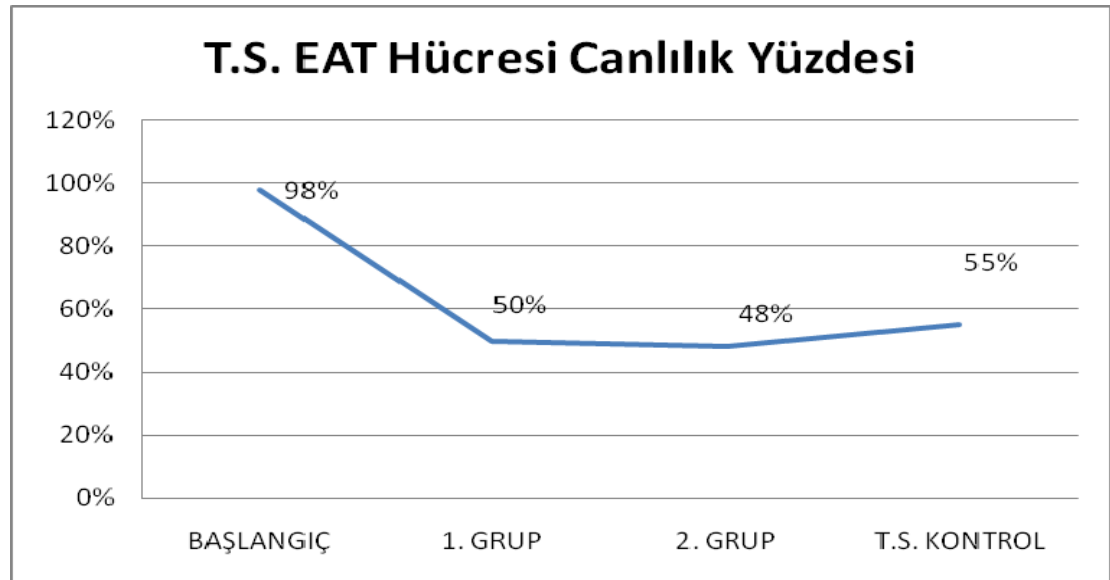
Resim 4.3. Başlangıç EAT hücrelerinin tripan mavisi ile boyanmış görünümü (Yeşil daireler ile işaretlenmiş olanlar canlı EAT hücrelerini, kırmızı daireler ile işaretlenmiş olanlar ölü EAT hücrelerini göstermektedir. Mavi daireler ise agregasyonu işaret etmektedir) (x400)

Deneme sonunda hayvanlardan alınan EAT hücrelerinin gruplara göre hücre sayım cihazında belirlenen sayıları ve canlılık oranları Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. T.S. Deneme Gruplarına Ait EAT Hücrelerinin Canlılık Parametreleri (c /10 ul)

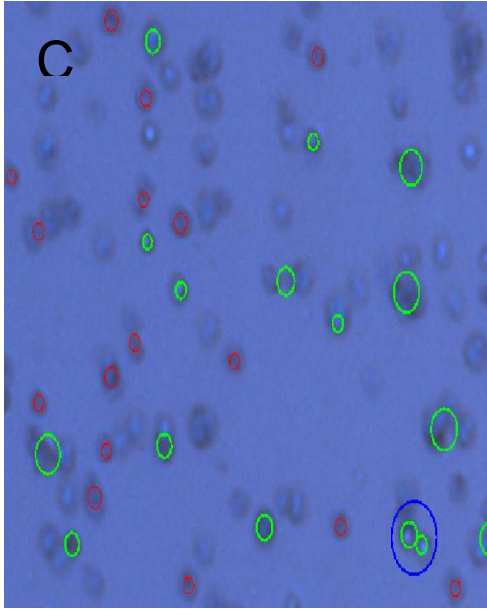
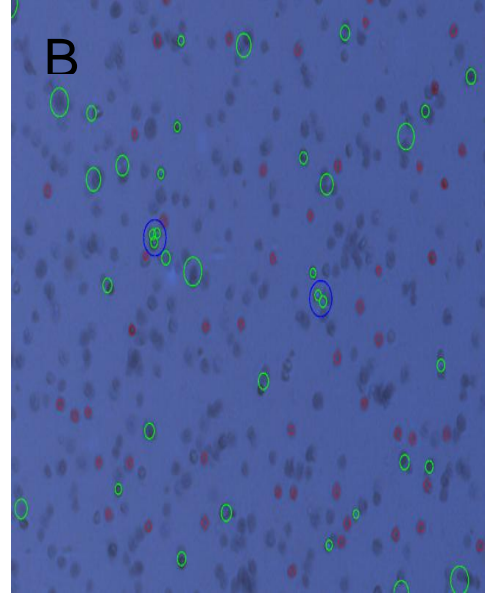
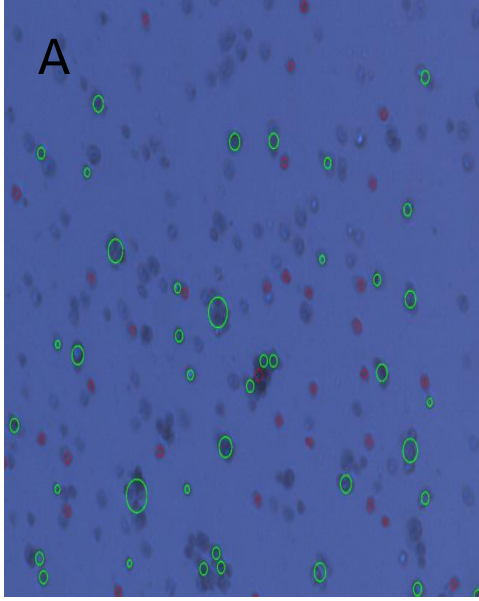
Adı	Ortalama Canlı hücre sayısı	Ortalama Ölü hücre sayısı	Toplam hücre sayısı	Canlı hücre konsantrasyonu	Ölü hücre konsantrasyonu	Toplam hücre konsantrasyonu	Canlılık (%)
Grup 1	211	211	422	0.625×10^6	0.625×10^6	1.250×10^6	50
Grup 2	238	258	496	0.713×10^6	0.773×10^6	1.486×10^6	48
Kontrol	254	208	462	0.721×10^6	0.591×10^6	1.312×10^6	55

Gruplar arasında EAT hücrelerinin canlılık yüzdelerinin azalışı Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. T.S. Deneme Süresince Gruplardaki EAT Hücrelerinin Canlılık Yüzdesi

Deneme sonunda elde edilen T.Ö. gruplara ait hücre görüntüleri Resim 4.4. A, B ve C’ de verilmiştir.



Resim 4.4. T.S. gruplara ait hücre görüntüleri **A:** T.S. 1. Gruba ait, **B:** T.S. 2. Gruba ait, **C:** T.S. Kontrol grubuna ait tripan mavisi ile boyanmış EAT hücrelerinin görünümü (Yeşil daireler ile işaretlenmiş olanlar canlı EAT hücrelerini, kırmızı daireler ile işaretlenmiş olanlar ölü EAT hücrelerini göstermektedir. Mavi daireler ise agregasyonu işaret etmektedir) (x400)

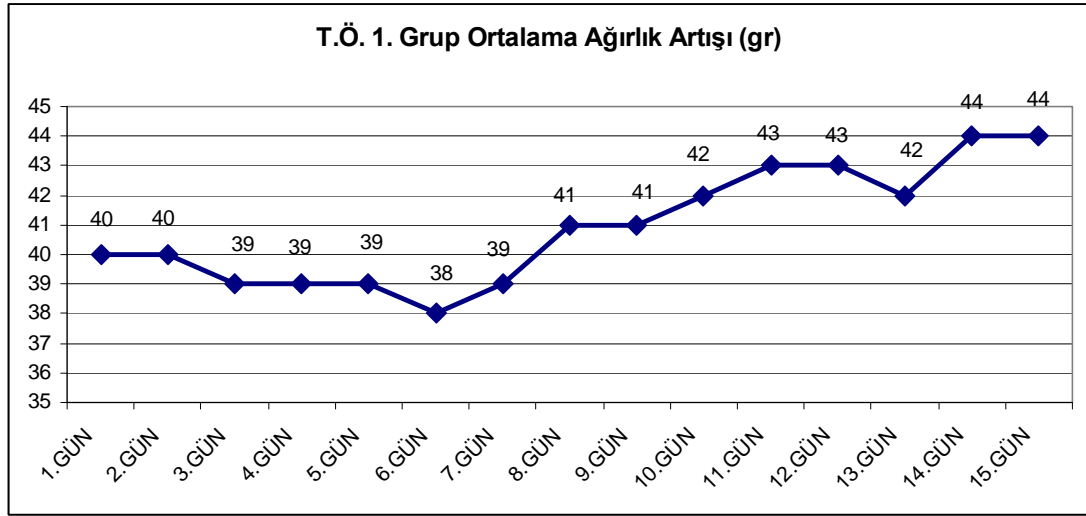
EAT hücresi canlılık yüzdeleri bakımından T.Ö. ve T.S. gruplar karşılaştırıldığında T.Ö. gruplara nazaran T.S. gruplarda hücre canlılık yüzdeleri daha yüksek

bulunmuştur. T.Ö. ve T.S. 1 Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$) 2. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

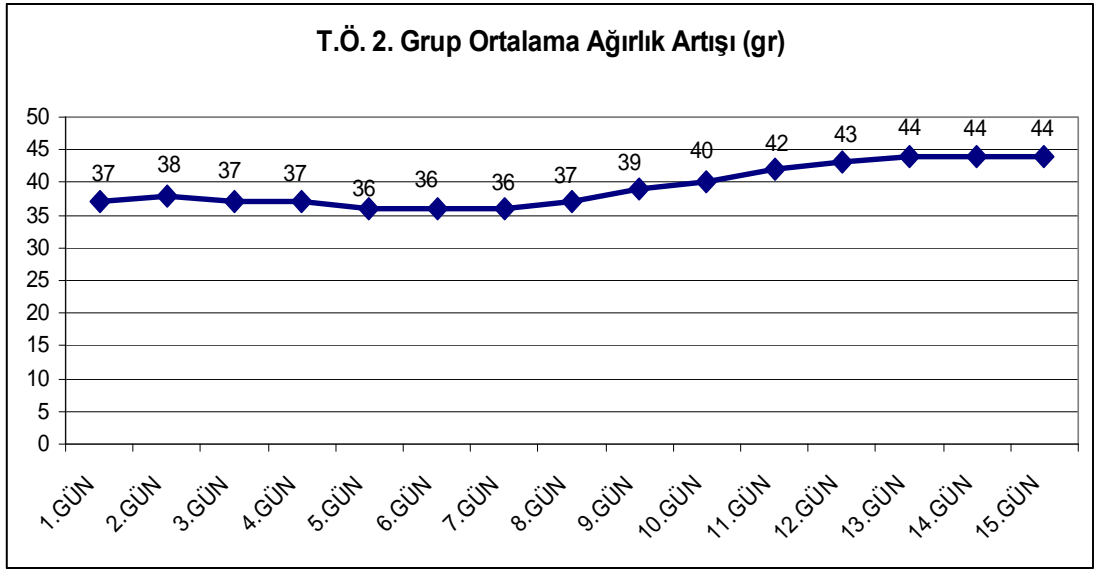
4.3. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda Ağırlık Değişimi

Gruplara ait ağırlık değişimleri dikkate alındığında tümör inokule edilmemiş olan sağlıklı kontrol grubu dışında tüm grupların vücut ağırlıklarında belirgin bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Buna göre, deneme gruplarının başlangıç ve son kilo değerleri kıyaslandığında en az kilo artışı T.Ö. 1. Grup ve 3. Grupta görülmüştür. Ancak T.Ö. deneme grupları arasındaki bu fark anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte T.Ö. kontrol grubunda deneme gruplarına göre anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$)

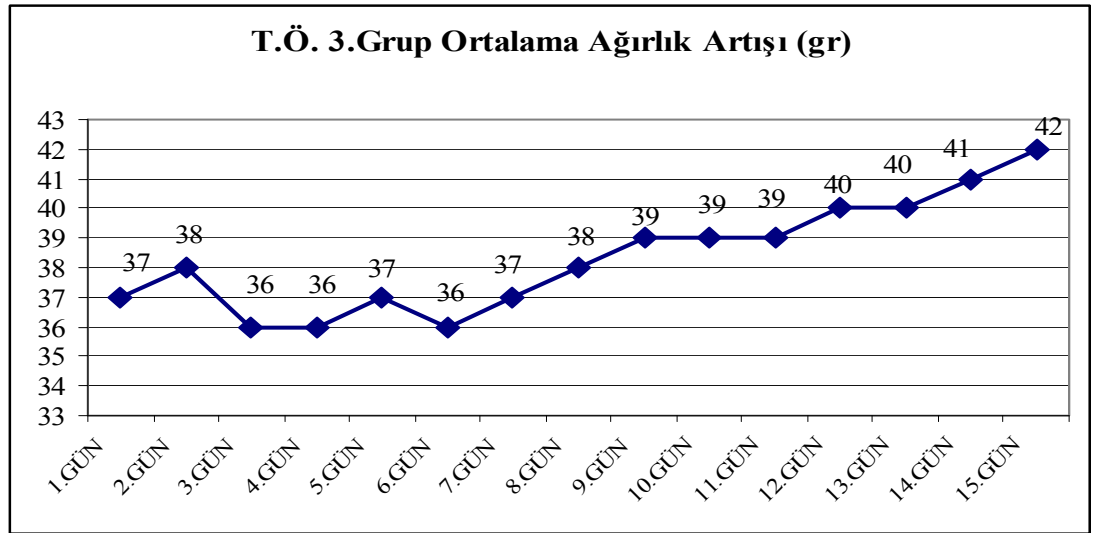
Her bir gruba ait ağırlık ortalamaları Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, ve 4.7' de verilmiştir.



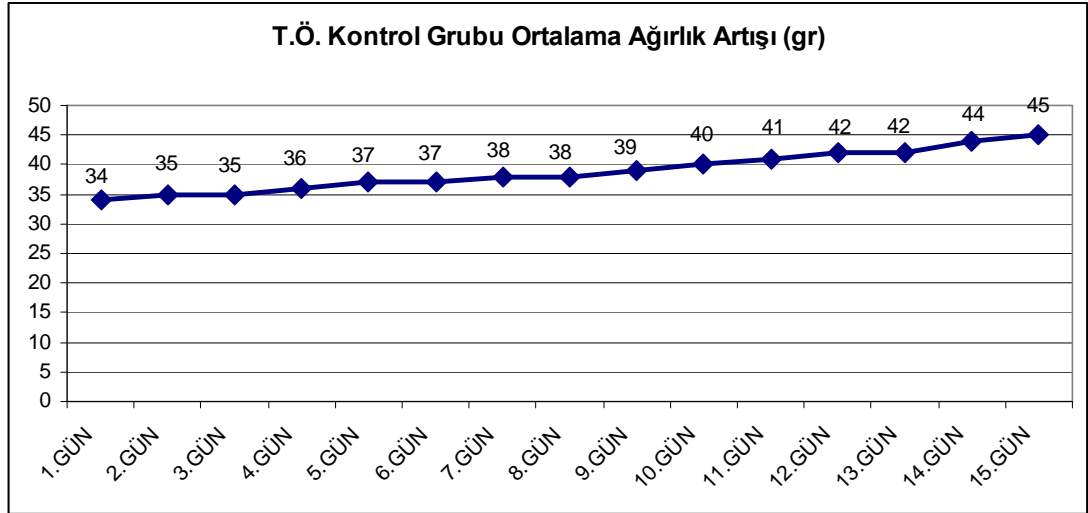
Şekil 4.3. T.Ö 1.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği



Şekil 4.4. T.Ö. 2.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği



Şekil 4.5. T.Ö 3.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği

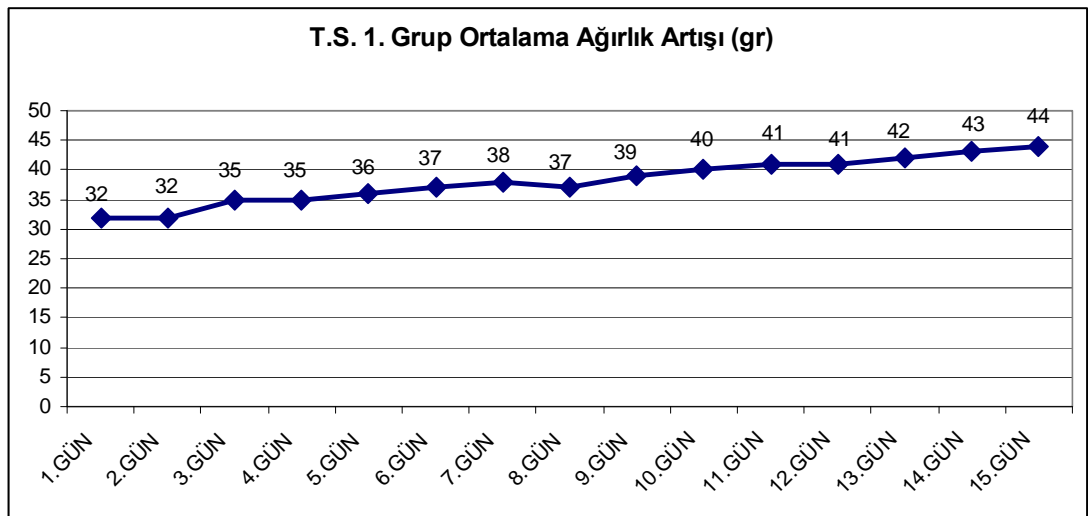


Şekil 4.6. T.Ö. Kontrol Grubu Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması

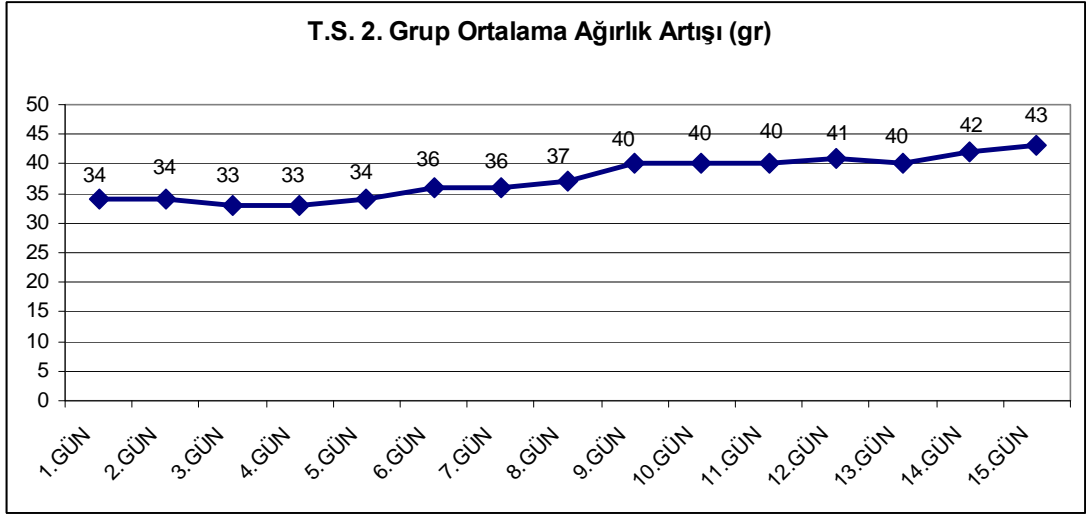
4.4. Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda Ağırlık Değişimi

T.S. deneme grupları arasında yer alan 3. Grupta % 90 mortalite görüldüğünden bu grup değerlendirmeye alınmamıştır. Tüm gruplardaki başlangıç ve son ağırlık değişimleri değerlendirildiğinde, sağlıklı kontrol grubu haricinde tüm grupların ağırlıklarında belirgin bir artış görülmüştür ($p < 0,05$). Buna göre, en fazla kilo artışı T.S. kontrol grubuyla benzer olarak 1. Grupta görülürken; bu iki gruba nazaran T.S. 2. Grupta daha az kilo artışı tespit edilmiştir. Fakat gruplar arasında bu fark anlamlı değildir ($p > 0,05$).

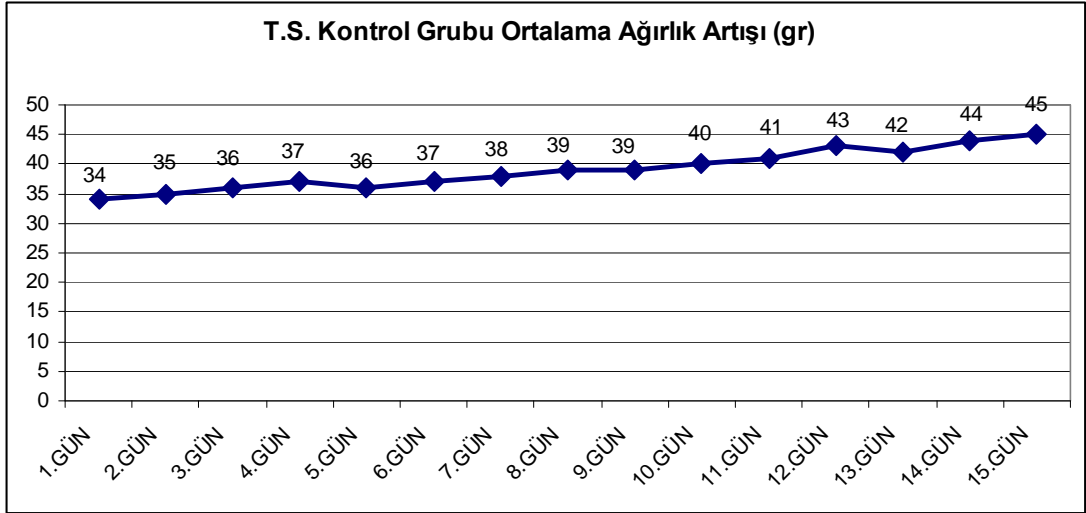
Her bir gruba ait ağırlık ortalamaları Şekil 4.7., 4.8., 4.9., ve 4.10' de verilmiştir.



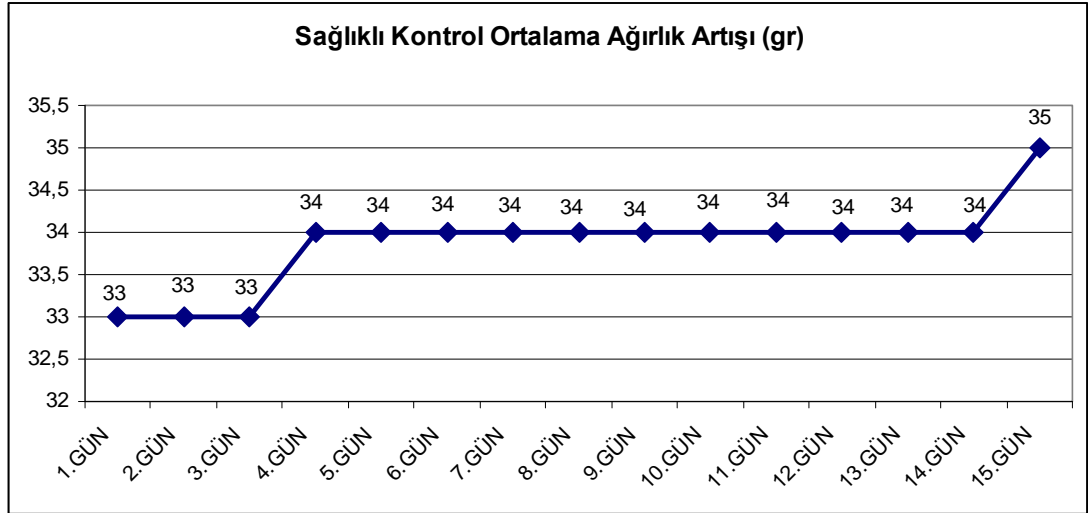
Şekil 4.7. T.S 1.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği



Şekil 4.8. T.S. 2.Grup Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği



Şekil 4.9. T.S Kontrol Grubu Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği



Şekil 4.10. Sağlıklı Kontrol Grubu Hayvanlarda Ağırlık artışı ortalaması grafiği

T.Ö. ve T.S. gruplar karşılaştırıldığında T.Ö. gruplara nazaran T.S. gruplarda ağırlık artışı daha yüksek bulunmuştur. T.Ö. ve T.S. 1 Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,05$). 2. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$)

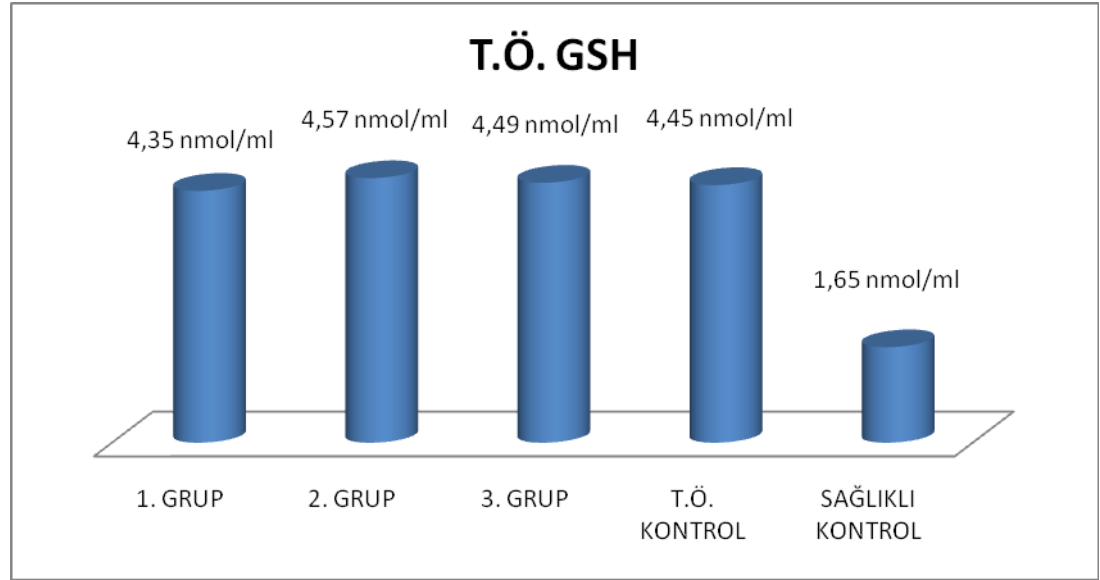
4.5.Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda GSH ve MDA Değişimi

Tüm hayvanlardan toplanan serumlardan oksidan Malondialdehit (MDA) ve antioksidan Redükte Glutatyon (GSH) parametrelerine bakılmıştır. Buna göre, sağlıklı kontrol grubuyla kıyaslandığında T.Ö. gruplarında MDA ve GSH düzeylerinde anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0,05$). T.Ö. grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, GSH düzeyleri farklı bulunmazken ($p>0,05$), 1.Gruba ait MDA düzeyinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,05$).

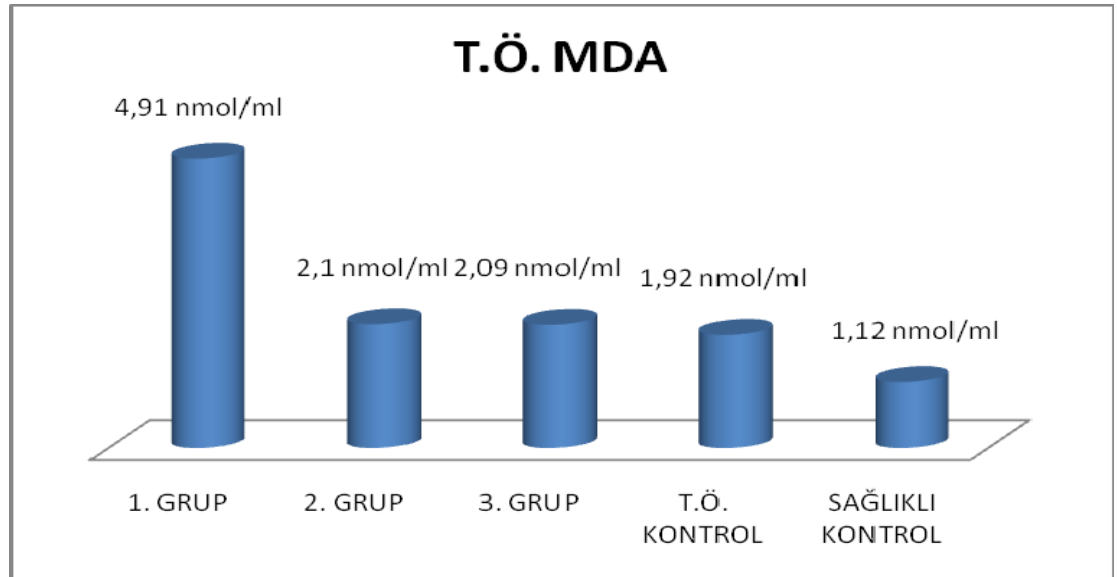
Deneme gruplarına ait GSH ve MDA parametrelerinin ortalama değerleri Tablo 4.5'de, GSH ve MDA parametrelerindeki değişim ise Şekil 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.5. T.Ö. Deneme Gruplarına ait GSH ve MDA Değerleri

Gruplar	Ortalama GSH Değerleri	Ortalama MDA Değerleri
1. Grup	4,35 nmol/ml	4,91 nmol/ml
2. Grup	4,57 nmol/ml	2,10 nmol/ml
3. Grup	4,49 nmol/ml	2,09 nmol/ml
T.Ö. Kontrol	4,45 nmol/ml	1,92 nmol/ml
Sağlıklı Kontrol	1,65 nmol/ml	1,12 nmol/ml



Şekil 4.11. T.Ö. Deneme Gruplarına ait GSH değerlerinin Grafiks gösterimi



Şekil 4.12. T.Ö. Deneme Gruplarına ait MDA değerlerinin Grafiks gösterimi

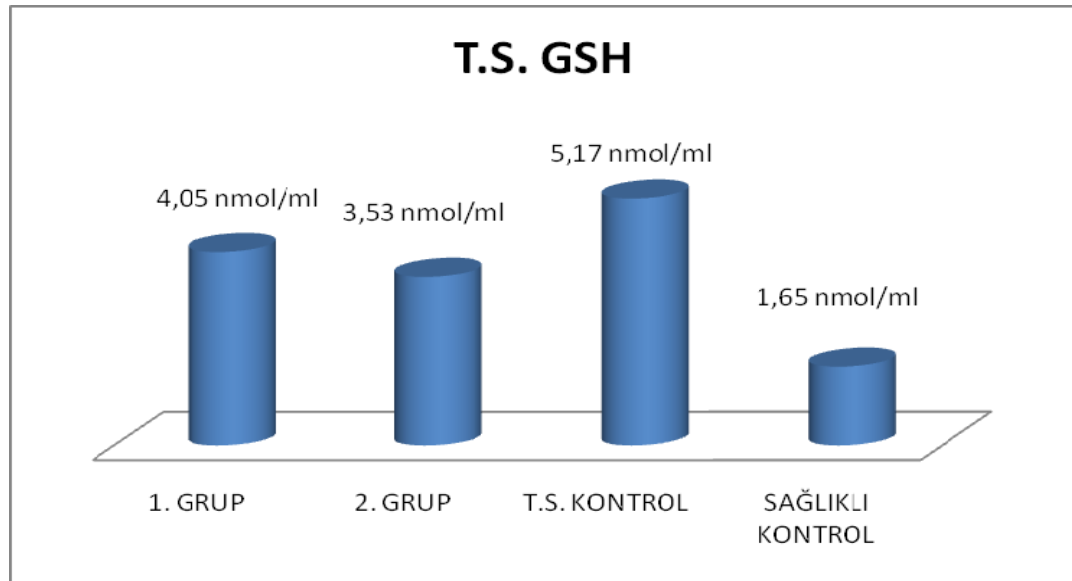
4.6.Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda GSH ve MDA Değişimi

T.S. 3. Grupta % 90 mortalite görüldüğünden bu grup değerlendirmeye alınmamıştır. Sağlıklı Kontrol Grubuyla kıyaslandığında tüm T.S. gruplarının MDA ve GSH düzeylerinde artış bulunmuştur ($p<0,05$). T.S. deneme gruplarına ait MDA değerlerinde kontrole göre bir artış saptanmıştır ($p<0,05$). Bununla birlikte, T.S. deneme gruplarına ait GSH değerlerinde ise, kontrole göre bir azalma gözlenirken bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

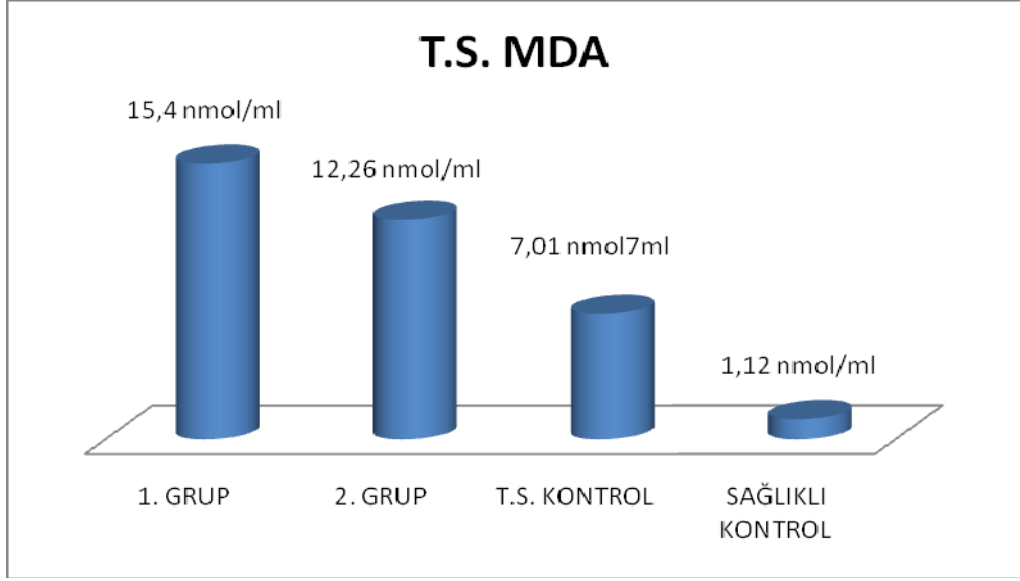
Deneme gruplarına ait GSH ve MDA parametrelerinin ortalama değerleri Tablo 4.6'da, GSH ve MDA parametrelerine ait değerlerin değişimi ise Şekil 4.13. ve 4.14'de verilmiştir.

Tablo 4.6. T.S. Deneme Gruplarına ait GSH ve MDA Değerleri

Gruplar	Ortalama GSH Değerleri	Ortalama MDA Değerleri
1.Grup	4,05 nmol/ml	15,40 nmol/ml
2. Grup	3,53 nmol/ml	12,26 nmol/ml
T.S. Kontrol	5,17 nmol/ml	7,01 nmol/ml
Sağlıklı Kontrol	1,65 nmol/ml	1,12 nmol/ml



Şekil 4.13. T.S. Deneme Gruplarına ait GSH değerlerinin Grafiks gösterimi



Şekil 4.14. T.S. Deneme Gruplarına ait MDA değerlerinin Grafiks gösterimi

T.Ö. ve T.S. gruplarının MDA ve GSH düzeyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında MDA düzeyleri anlamlı bir artış gösterirken ($p < 0,05$); GSH düzeylerinde farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

4.7. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda Patolojik Değerlendirmeler

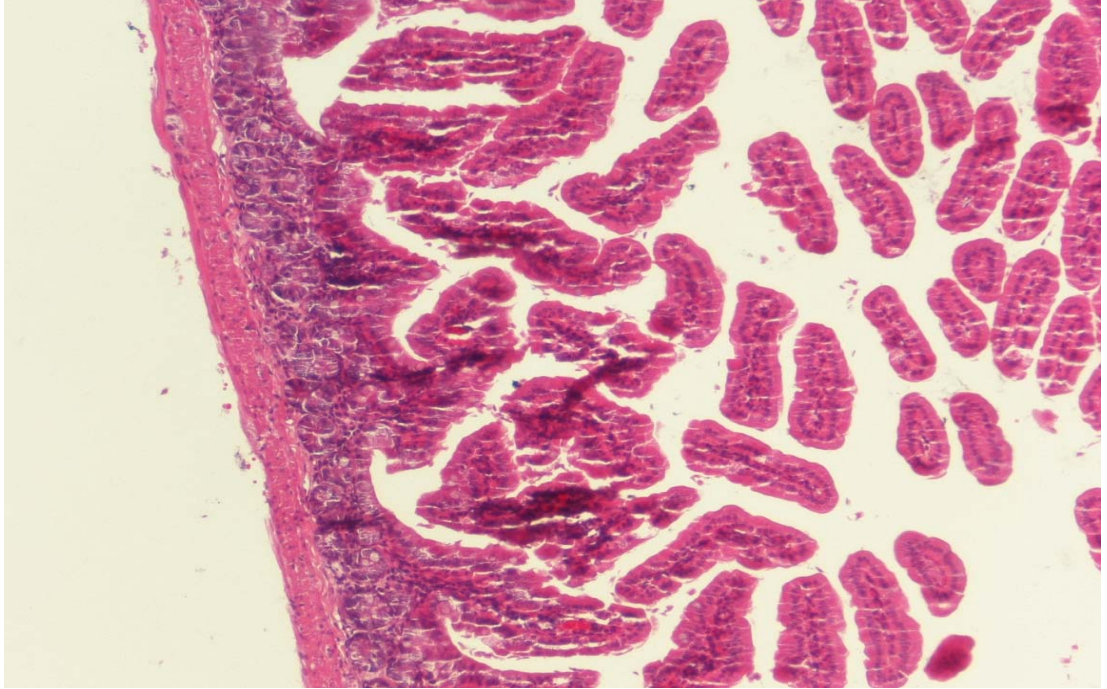
Deneme bitiminde sakrifiye edilen hayvanların ince ve kalın barsak histopatolojik değerlendirmeleri neticesinde; Sağlıklı Kontrol Grubuna ait dokularda herhangi bir patolojik duruma rastlanmamıştır. T.Ö. 1. Gruba ait doku preparatlarında kalın bağırsak ince bağırsak dokularının %40'ında tümörün serozal yüzeyde invaze olduğu tespit edilirken, geriye kalan %60'ında ise tümör invazyonuna rastlanmamıştır.

T.Ö. 2. Gruba ait kalın bağırsak dokularının %30'unda ince bağırsak dokularının %35'inde tümörün serozal yüzeyde invaze olduğu tespit edilirken, geriye kalan kalın bağırsak ve ince bağırsak dokularında ise tümör invazyonuna rastlanmamıştır.

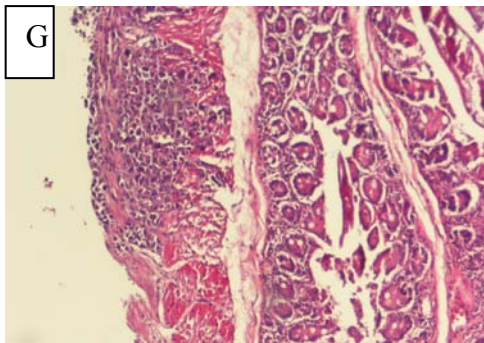
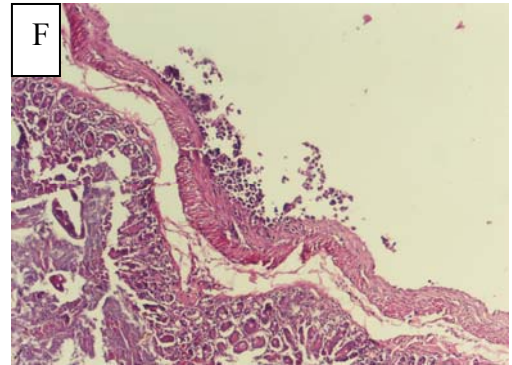
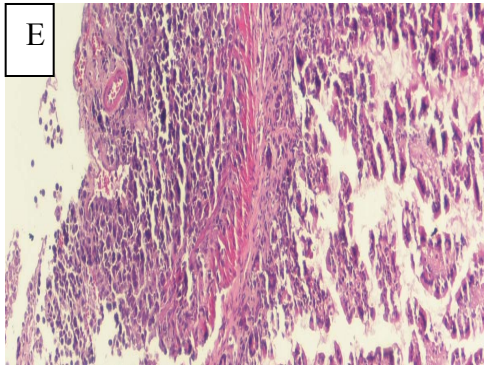
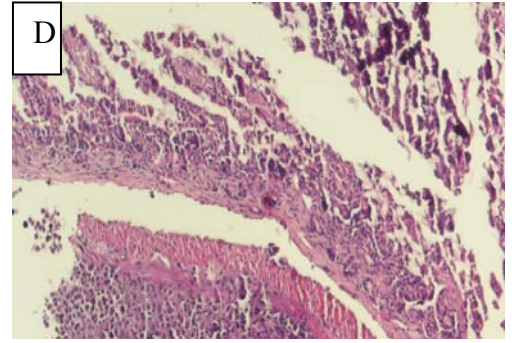
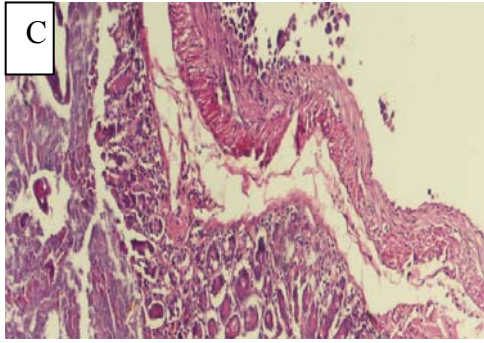
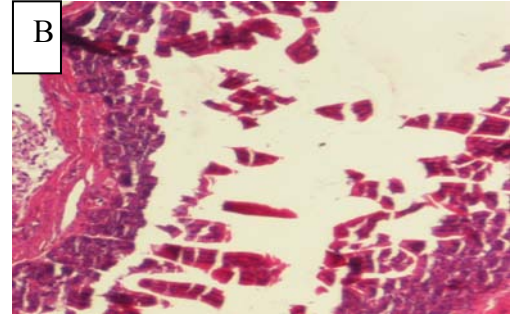
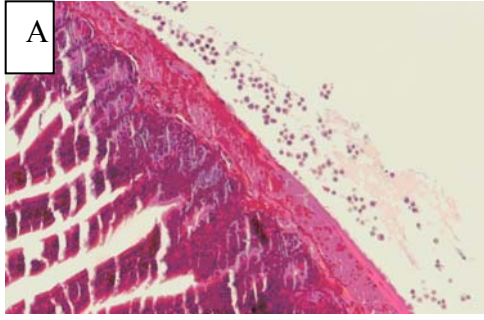
T.Ö. 3. Gruba ait kalın bağırsak ve ince bağırsak dokularının %50'sinde tümörün serozal yüzeyde invaze olduğu tespit edilirken, geriye kalan kalın bağırsak ve ince bağırsak dokularında ise tümör invazyonuna rastlanmamıştır.

T.Ö. kontrol grubuna ait kalın bağırsak dokularının tamamının ve ince bağırsak dokularının ise %40'ının tümör hücreleri tarafından yaygın invazyonu gözlenmiştir. Geriye kalan %60 ince bağırsak dokularında ise tümör invazyonu gözlenmemiştir. Tümörün bu dokulara invazyonu peritondan gerçekleştiği için yayılımı da genel olarak seroza tabakasından iç tabakalara doğru olmuştur. Kontrol grubundaki hayvanlara ait bu iki dokuda tümörün daha çok seroza ve muscularis propria kısımlarına yayılmış olduğu tespit edilmiştir.

Sağlıklı Kontrol doku örneği Resim 4.5' de ve T.Ö. gruplara ait doku preparatlarının örnek resimleri, Resim 4.6, A, B, C, D, E, F ve G'de verilmiştir.



Resim 4.5. Sağlıklı Kontrol Grubuna ait kalın bağırsak dokusu (x100)



Resim 4.6. T.Ö. gruplara ait doku preparatlarının örnek resimleri **A:** T.Ö.1. Gruba ait serozal invaze olmuş kalın bağırsak dokusu **B:** T.Ö.1. Gruba ait serozal invaze olmuş ince bağırsak dokusu **C:** T.Ö. 2. Gruba ait serozal invaze olmuş kalın bağırsak dokusu **D:** T.Ö. 2. Gruba ait serozal invaze ince bağırsak dokusu **E:** T.Ö. 3. Gruba ait serozal invaze ince bağırsak dokusu **F:** T.Ö. Kontrol Grubuna ait serozal invaze kalın bağırsak dokusu **G:** T.Ö. Kontrol Grubuna ait muskularis propria invaze ince bağırsak dokusu (x100)

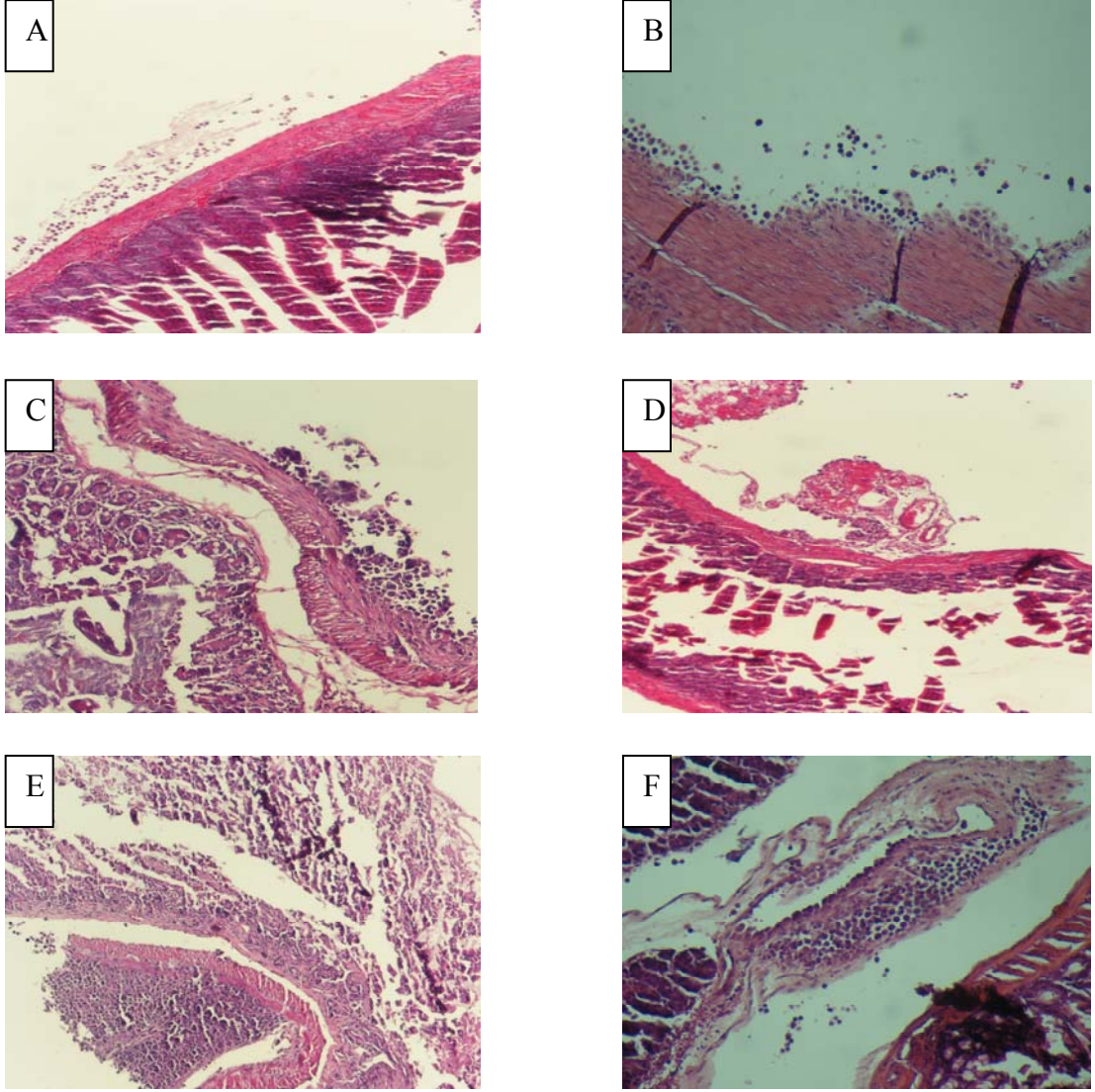
4.8.Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda Patolojik Değerlendirmeler

T.S. 3. Grupta % 90 mortalite görüldüğünden değerlendirmeye alınmamıştır. T.S. 1. Gruba ait kalın bağırsak dokularının %50'inde ince bağırsak dokularının %40' unda tümörün serozal yüzeyde invaze olduğu tespit edilirken, geriye kalan kalın bağırsak ve ince bağırsak dokularında ise tümör invazyonuna rastlanmamıştır.

T.S. 2. Gruba ait kalın bağırsak dokularının %40'ında ince bağırsak dokularının %30' unda tümörün serozal yüzeyde invaze olduğu tespit edilirken, geriye kalan kalın bağırsak ve ince bağırsak dokularında ise tümör invazyonuna rastlanmamıştır.

T.S. Kontrol Grubuna ait kalın bağırsak dokularının tamamında kalın ince bağırsak dokularının %60'ında tümörün serozal yüzeyde invaze olduğu tespit edilirken, geriye kalan ince bağırsak dokularında ise tümör invazyonuna rastlanmamıştır.

T.S. gruplara ait doku preparatlarının örnek resimleri, Resim 4.7, A, B, C, D, E ve F'de verilmiştir.



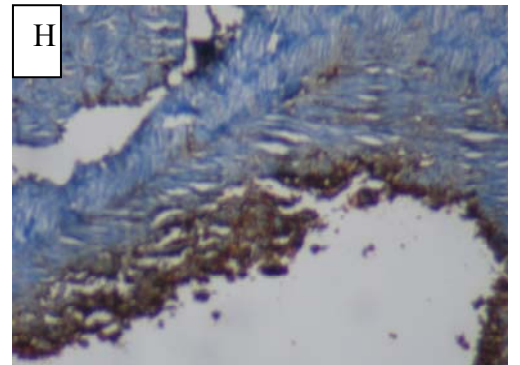
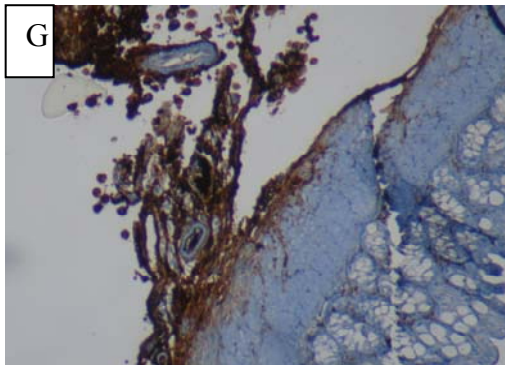
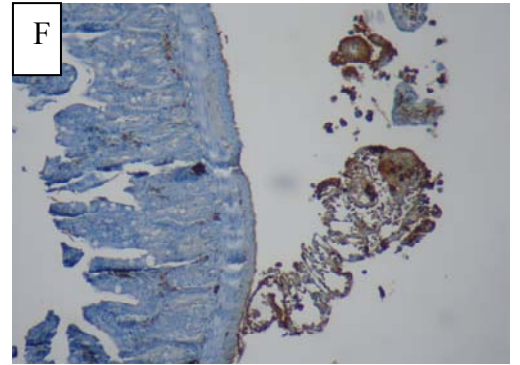
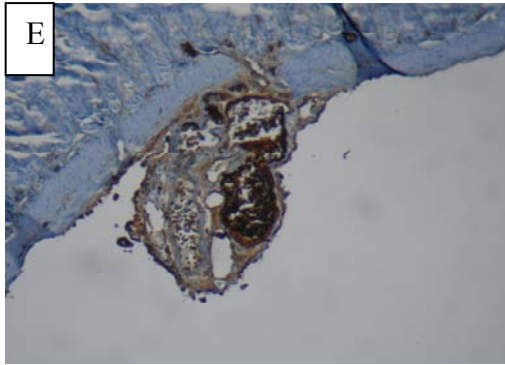
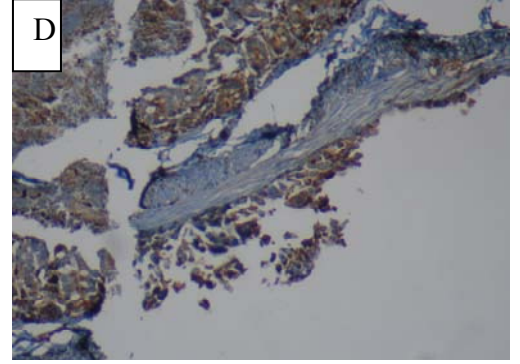
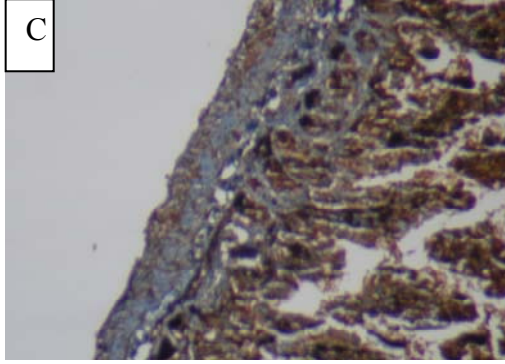
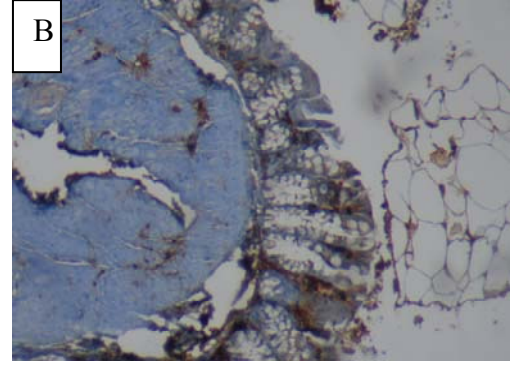
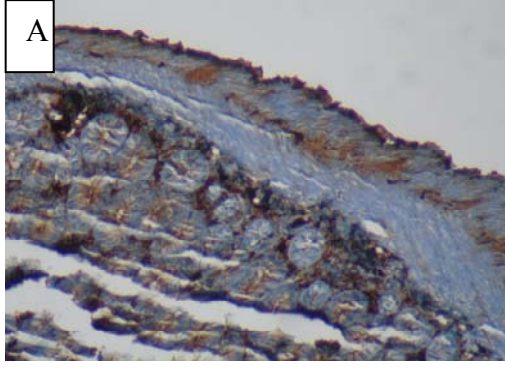
Resim 4.7. T.S. gruplara ait doku preparatlarının örnek resimleri **A:** T.S.1. Gruba ait serozal invaze olmuş kalın bağırsak dokusu **B:** T.S.1. Gruba ait serozal invaze olmuş ince bağırsak dokusu **C:** T.S. 2. Gruba ait serozal invaze olmuş kalın bağırsak dokusu **D:** T.S. 2. Gruba ait serozal invaze ince bağırsak dokusu **E:** T.S. Kontrol Grubuna ait serozal invaze kalın bağırsak dokusu **F:** T.S. Kontrol Grubuna ait serozal invaze ince bağırsak dokusu (x100)

4.9. Y-27632 Maddesi T.Ö. Uygulanan Gruplarda İmmünohistokimyasal Bulgular

İnce ve kalın bağırsak dokularının ROCK-2 immünohistokimyasal boyanması sonucunda T.Ö. 1. Grupta orta dereceli (skor 2), 2. Grupta minimal (skor 1), 3. Grupta minimal (skor 1) ve T.Ö. Kontrol Grubunda ise güçlü (skor 3) boyanma görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, T.Ö. deneme gruplarının ince bağırsak ve kalın bağırsak dokularında, T.Ö. Kontrol Grubuna oranla ROCK-2 boyanma oranı

anlamli olarak azalmiştir ($p < 0,05$). Bunun yanısıra T.Ö. deneme gruplarındaki bu azalma anlamli bir fark yaratmamıştır ($p > 0,05$).

T.Ö. gruplara ait doku preparatlarının ROCK2 immün boyanma örnek resimleri, Resim 4.8, A, B, C, D, E, F, G ve H’de verilmiştir.

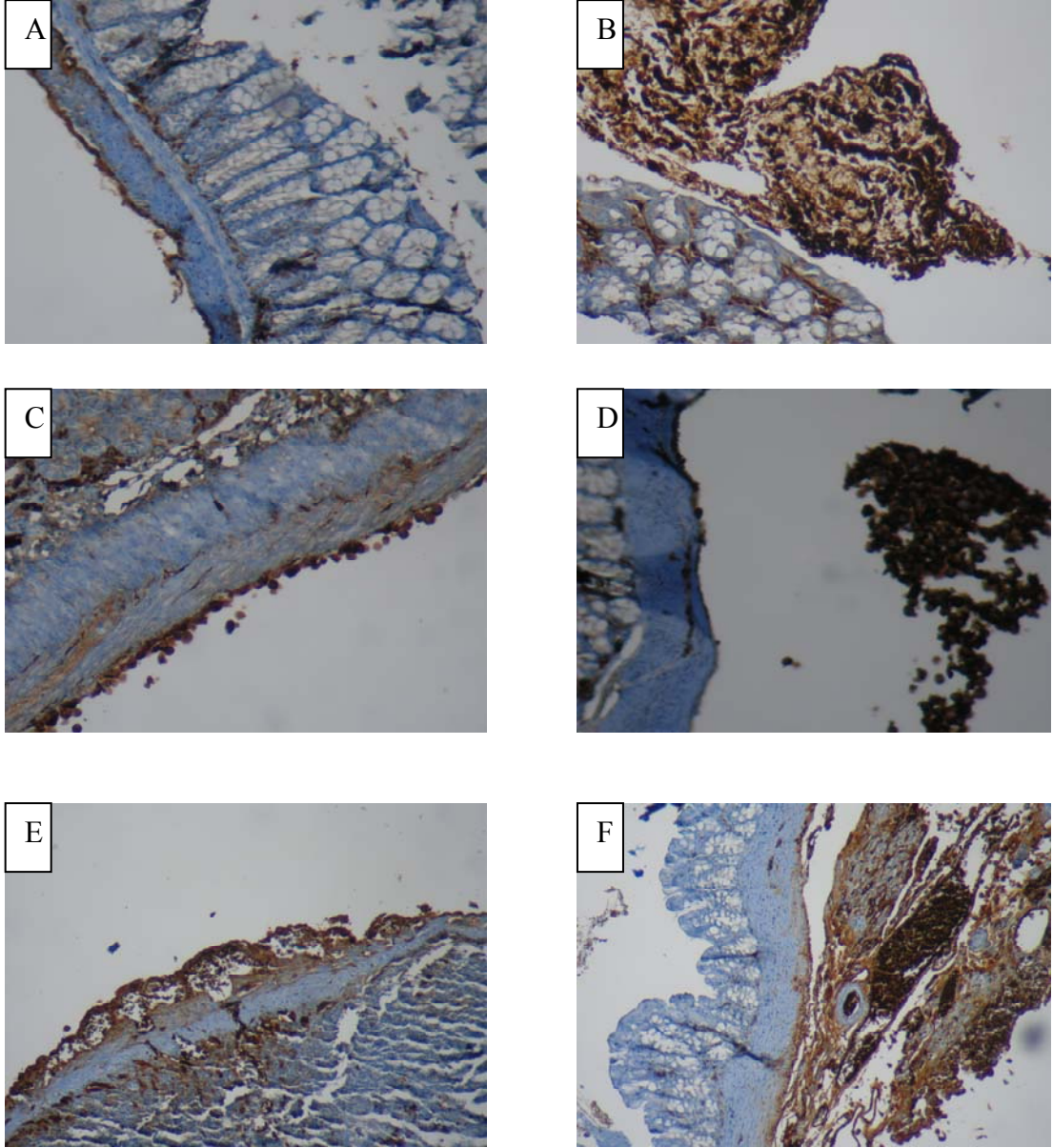


Resim 4.8. T.Ö. gruplara ait doku preparatlarının ROCK2 immün boyanma örnek resimleri **A:** T.Ö. 1.Gruba ait ince bağırsak **B:** T.Ö.1. Gruba ait kalın bağırsak **C:** T.Ö. 2.Gruba ait ince bağırsak **D:** T.Ö.2. Gruba ait kalın bağırsak **E:** T.Ö. 3.Gruba ait ince bağırsak **F:** T.Ö.3. Gruba ait kalın bağırsak **G:** T.Ö. Kontrol Grubuna ait ince bağırsak **H:** T.Ö.Kontrol Grubuna ait kalın bağırsak (x100)

4.10. Y-27632 Maddesi T.S. Uygulanan Gruplarda İmmünohistokimyasal Bulgular

T.S. gruplardan 3. Grupta % 90 mortalite görüldüğünden değerlendirmeye alınmamıştır. 1. Grupta orta dereceli (skor 2), 2. Grupta minimal (skor 1) ve Kontrol Grubunda ise güçlü (skor 3) boyanma görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, T.S. deneme gruplarının ince bağırsak ve kalın bağırsak dokularında ROCK-2 boyanma oranı T.S. Kontrol Grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir azalma kaydedilmiştir ($p<0,05$). T.S. deneme gruplarının kendi aralarında karşılaştırılması sonucu bu farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

T.S. gruplara ait kalın ve ince bağırsak doku preparatlarının immün boyanma örnek resimleri, Resim 4.9, A, B, C, D, E ve F' de verilmiştir.



Resim 4.9. T.S. gruplara ait doku preparatlarının ROCK2 immün boyanma örnek resimleri **A:** T.S. 1.Gruba ait ince bağırsak **B:** T.S.1. Gruba ait kalın bağırsak **C:** T.S. 2.Gruba ait ince bağırsak **D:** T.S.2. Gruba ait kalın bağırsak **E:** T.S. Kontrol Grubuna ait ince bağırsak **F:** T.S.Kontrol Grubuna ait kalın bağırsak (x100)

T.Ö. ve T.S. deneme gruplarının ve kontrol gruplarının ROCK-2 immünohistokimyasal boyama skorları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, içerisinde bulunduğumuz modern çağın en ciddi hastalığı olup, insan ölümlerine yol açan nedenler arasında önemli bir yere sahiptir. Gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde de ön sıralarda yer almaktadır. Günümüzde kanser ile mücadelede çok ciddi çabalar ve yüksek miktarlarda bütçeler harcanmaktadır (Hulka ve Stark, 1995).

Son yıllarda yaygın olarak kullanılan ve yüksek bütçeler gerektiren moleküler tekniklerin, metabolizma cevabında meydana getirdiği eksikliğe karşın, günümüz kanser araştırmalarında hayvan modellerinden yararlanmak önemli bir yer tutmaktadır. Buna paralel olarak hayvan modellerinden yararlanmanın beraberinde deneysel kanser modellerinin kullanımı da artmıştır.

Deneysel kanser araştırmalarının yapıldığı üç yüzyıllık dönem içinde özellikle kimyasal karsinojenler ile spontan veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Kanser araştırmalarında kullanılan spontan veya indüklenen tümör modelleri için çok sayıda hayvan, fazla miktarda maddi olanak ve uzun zaman gerektiğinden, birçok araştırmacı tarafından daha az tercih edilmişlerdir. Dolayısıyla özellikle 1950'li yıllardan sonra transplante edilebilen tümörlerin oluşturduğu modellerin tercih edildiği kanser araştırmaları ön plana çıkmaktadır (Zeybek, 1996).

Çalışmamızda mevcut deneysel tümör modelleri arasından transplante edilebilen EAT seçilmiştir. Seçilen tümör modeli, deney hayvanının türü, cinsiyeti ve yaşı referans alınan literatüre uygun olarak belirlenmiştir (Zeybek, 1996). Aynı zamanda kanser gelişim sürecinde etkili olan dişilik hormonlarının etkisinin bertaraf edilmesi amacıyla *Swiss albino* soyu (30-40 gr ağırlığında 8-10 haftalık) erkek fareler tercih edilmiştir.

Geçmişten bu yana klinik ve deneysel amaçlı kanser araştırmalarında pek çok metot kullanılmaktadır. Bugün kanseri önlemede en umut verici metot, kemoterapidir. Kanserın ilaçla tedavisi anlamına gelen kemoterapinin ana ilkesi tümör hücrelerine, hastanın normal hücrelerinden daha fazla etki ederek normal hücrelere zarar vermeden veya minimum düzeyde etki ederek tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya onları yok etmektir (Kayaalp, 1996). Dolayısıyla amaç, kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek letal toksik etki sağlamaktır.

Bilim adamları kanserle ilgili çalışmalarında ideal ilacı, yani normal hücreye en az düzeyde etki yapan ilacı bulmak odağında yoğunlaşmışlardır (Gümüşhan, 2002). Bu amaçla kullanılmak üzere binlerce kimyasal madde incelenmiştir. Ancak çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılan bu kimyasal maddelerden bugün sadece çok azı kanser kemoterapisinde ilaç olarak kullanılmaktadır (Öner, 1985). Son yıllarda bu doğrultuda kanserle ilgili çalışmalarda özellikle sinyal ileti yolları üzerinde durulmaktadır. Sinyal ileti proteinlerinden Rho proteinlerinin inhibisyonunun, yeni antikanser ilaçların gelişimi için ümit vaat eden hedefler gibi görüldüğü düşünülmektedir (Fritz ve Kaina, 2006).

Araştırmacıların farklı zamanlarda yaptıkları çalışmalarda, Rho proteinleri ve efektörlerinden biri olan Rho-kinazın, hücre hareketi ve migrasyonunda, hücrelerin birbirine ve matrikse olan adezyonunda, hücre siklusunun düzenlenmesinde ve apoptoziste anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Kimura vd., 1996 ; Fukata vd., 1999). Diğer taraftan Rho/Rho kinaz yolağının aktivasyonunun, tümör hücre invazyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Ying vd., 2006). Bütün bu fonksiyonlar esasında kanser gelişmesi ve progresi için oldukça önemlidir.

Rho kinazın bu etkisiyle yola çıkan araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda Rho kinaz inhibisyonuyla bu hücresele fonksiyonların azaltıldığı ve kanser hücrelerinde metastazın baskılandığını göstermişlerdir (Takamura vd., 2001; Ying vd., 2006).

Rho kinaz enzimini inhibe eden ajanlar arasında, Y-27632 (trans-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4 piridinilsikloheksankarboksamid dihidroklorid), fasudil (HA-1077), hidroksifasudil, Y32885, Y-39983, H-1152P, SLx-2119, azabenzimidazol-

aminofurazanlar (GSK–269962A ve SB77 2077 gibi) ve Wf–536 gibi birçok madde bulunmaktadır (Shi ve Wei, 2007).

Çalışmamızda kanser oluşumu ve gelişiminde önemli olan tümör hücrelerinin invazyonunda ve invaze olan tümör hücrelerinin çoğalıp metastaz oluşturmaları için gerekli olan anjiogenezi uyaran Rho-kinazın inhibitörlerinden biri olan Y-27632 maddesinin *Swiss Albino* türü farelerde oluşturulan sıvı Ehrlich ascites tümörüne (EAT) olan antitümöral etkisi araştırılmıştır.

Çalışma süresince tüm deney hayvanlarının ağırlık değişimlerinin kaydedilmesiyle elde edilen değerlere göre; T.Ö. ve T.S. deneme ve kontrol grupları ile tümör inokulasyonu yapılmayan Sağlıklı Kontrol Grubu ağırlık değerleri karşılaştırıldığında, kilo artışında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). Ağırlık artışlarındaki bu fark hayvanlardaki tümör yükünden kaynaklanmaktadır. T.Ö. deneme grupları ile T.Ö. kontrol Grubu arasındaki ağırlık artışı karşılaştırıldığında ise, T.Ö. kontrol Grubunda anlamlı olarak artış olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Denemenin diğer ayağını oluşturan tümör sonrası uygulamada ise, T.S. deneme gruplarıyla T.S. Kontrol Grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Dolayısıyla, tümör öncesi deneme gruplarındaki kilo artışının kontrole ve tümör sonrası gruplara göre daha az olmasını göz önüne alarak, tümör öncesi uygulamada tümör inhibisyonunun olduğu sonucuna varabiliriz. Ancak T.S. 3. Grupta % 90 mortalite görüldüğünden uyguladığımız Y-27632 maddesinin 10 mg/kg/gün olan dozunun toksik etki oluşturduğunu düşünmekteyiz.

Tümör gelişimini belirlemek için çalışmamızın başlangıcında %98,1 canlılık gösteren 1×10^6 EAT hücresine kıyasla gruplar arasında EAT hücresi canlılık yüzdeleri karşılaştırılmıştır. Buna göre T.Ö. deneme grupları ve T.Ö. Kontrol Grubu EAT hücresi canlılık yüzdelerinin, deneme başlangıcında verilen EAT hücresi canlılık yüzdesine göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum hayvanların peritonunda çoğalan asit sıvısının EAT hücrelerinin çoğalmasını baskılamasından kaynaklanmaktadır. Bunun aksine T.S. deneme grupları ve T.S. Kontrol Grubu EAT hücresi canlılık yüzdeleri, deneme başlangıcında verilen EAT hücresi canlılık yüzde değerleriyle kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır

($p>0,05$). Buradan yola çıkarak Y-27632 maddesinin tümör oluşumu öncesi uygulanmasının tümör gelişimi üzerine daha etkili olduğu sonucu doğmuştur.

Toplanan serumlardan oksidan Malondialdehit (MDA) ve antioksidan Redükte Glutasyon (GSH) parametrelerinin T.Ö. ve T.S. deneme grupları ile Sağlıklı Kontrol Grubu arasında anlamlı oluşu ($p<0,05$) kanser oluşum sürecinde değişen oksidatif strese bağlıdır. Bu iki parametrenin seviyelerindeki değişim pek çok kanser çalışmasında gösterilmiştir (Gerber vd., 1998; Torun vd., 1995).

T.Ö. ve T.S. deneme gruplarında MDA düzeylerinin anlamlı derecede yüksek bulunuşu Y-27632 maddesinin bu oksidan parametre üzerine stimüle edici aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Diğer taraftan, bu artış T.S. gruplarda T.Ö. gruplara kıyasla daha yüksek bulunmuş ve bu durum bize yine Y-27632 maddesinin T.Ö. uygulanmasının T.S. uygulanmasına nazaran daha etkili olduğunu düşündürmektedir. Yapıcı ve arkadaşlarının (2008) özefagus yanık modelinde Y-27632 maddesinin farklı dozlarıyla yaptıkları deneysel çalışmalarında, uygulanan dozlar arasında farklılık görülmemekle birlikte MDA düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış olduğu ve dolayısıyla bu maddenin antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmaya paralel olarak Balyemez'in (2010) deneysel nekrotizan enterokolit modelinde Y-27632 maddesiyle yaptığı çalışmada MDA düzeyi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda MDA düzeyinde anlamlı artışlar tespit edilmiş olup bu durum Y-27632 maddesiyle asit sıvısı arasında antagonist bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz histopatolojik değerlendirmelere göre deneklere ait kalın bağırsak ve ince bağırsak tümör inhibisyonunu sağlayan en uygun dozun, T.Ö. ve T.S. grupların her ikisinde de 1 mg/kg Y-27632 maddesi olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, T.Ö. ve T.S. deneme gruplarında tümör tutulumlarının özellikle serozal yüzeyde olduğu, buna karşın diğer doku kısımlarında herhangi bir tümör tutulumunun olmadığı görülmüştür. Ancak, Afacan' nın (2006), Ehrlich asit tümörüyle yaptığı çalışmasında ince bağırsak kesitlerinde dokunun tüm tabakalarının (mukoza, submukoza, muskularis eksterna ve seroza) tümörle invaze olduğunu ve kalın bağırsak

preparatlarının ise kimisinde sadece seroza tabakasının kimisinde de tüm tabakaların tümörle invazyonu gözlenmiştir. Karşılaştığımız bu verilere dayanarak kanser gelişim sürecinde Rho-kinaz inhibisyonunun önemli bir rolü olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızın immünohistokimyasal değerlendirmeleri neticesinde; Y-27632 maddesinin uygulanan 3 farklı dozunun tümör öncesi ve sonrası uygulamasının, Rho-kinaz inhibisyonunun da farklı etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. EAT hücre canlılık parametrelerinden elde edilen sonuçlara paralel olarak T.Ö. madde uygulamasının T.S. na göre daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fakat gruplar arasındaki bu fark anlamlı değildir ($p>0,05$). Tümör öncesi ve sonrası arasındaki Rho-kinaz inhibisyon farkından yola çıkarak kanser gelişim sürecinin ilerleyen evrelerinde artmış olan enzim aktivitesine bağlı olarak uygulanan dozların etkilerinin farklı olduğu sonucu doğmuştur.

Fukata ve arkadaşlarının (1999) çalışmaları sonucu bildirdikleri gibi Rho/Rho kinaz yolağının, hücre adezyonu, migrasyonu, şekil değişiklikleri ve sitokinezde etkili olduğu, farklı araştırmacılar tarafından da (Takamura vd., 2001; Ying vd., 2006) bu etkilerin Rho-kinaz inhibisyonuyla azaltıldığı bildirilmiştir. Yine Nakajima (2003b) ve arkadaşları tarafından B16 melanoma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, *in vivo* da Rho kinaz inhibitörlerinden biri olan WF- 536 maddesinin tümör hücresi invazyon ve migrasyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte yüksek metastatik özelliğe sahip HCC hücre hattında ROCK sinyal yolunun metastatik özelliği arttırdığı ve Y- 27632 inhibisyonu sonucu kanser gelişiminin ve intrahepatik metastaz gelişiminin yavaşlatıldığı bildirilmiştir (Xue vd., 2007). Bu çalışmalara paralel olarak çalışmamızda, kanser gelişim sürecinde önemli olan tümör invazyonunun, tümör göçünün ve metastaz oluşumunun anlamlı olarak inhibe edildiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak sinyal iletiminde yer alan moleküllerin ve sinyal yollarının karsinogenezdeki rollerinin ortaya konması ve bu yollara özgül inhibitör ajanlar ile yapılan klinik çalışmalar, kanser tedavisinde yeni ufukların açılmasını sağlayabilir (Doğan ve Güç, 2004).

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlara bağlı olarak Y-27632 maddesinin 1 mg/kg dozunun, biyokimyasal ve histopatolojik verilere bağlı olarak da uygulanan diğer dozların tümör gelişimini yavaşlatıcı aktivite göstermiş olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak bu maddenin kanser tedavisinde etkin terapötik madde olarak kullanımı için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Afacan, I.D., (2006). Ehrlich Asit Tümörü Taşıyan Balb/C Irkı Farelerde *Plantago major* L. Ekstraktının Antitümöral Etkisinin İn Vivo Olarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Gaziantep

Aktaş, E. (1996). Ehrlich Asit Sıvısının L-Hücrelerinin Çoğalma Hızına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.

Altun, S. (1996). Normal, Tümöral ve Rejeneratif Büyümler Arasındaki Kinetik İlişkiler. *Traditional Journal of Biology*, Tübitak, **20(3)**, 153-173.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biochemistry*, **271**, 20246–20249.

Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Advances in Medical sciences*, **275**, 1308–1311.

Amano, M., Fukata, Y., Kaibuchi, K. (1998). Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by the small GTPase Rho and its targets. *Trends Cardiovasc Medical*, **8**, 162-168.

Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Kaneko, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. (1999). The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *Journal of Biological chemistry*, **274** 32418–32424.

Amano, M., Fukato, Y., Kaibuchi, K. (2000). Regulation and function of Rho-associated kinase. *Experimental Cell Research*, **261**, 44-51.

Ark M, Yilmaz N, Yazici G, Kubat H, Aktas S. (2005). Rho-associated protein kinase II (rock II) expression in normal and preeclamptic human placentas. *Placenta*, **26**,81-8.

Balyemez, G. (2010). Deneysel Nekrotizan Enterokolit Modelinde Bir Rho –kinaz Enzim İnhibitörü Olan Y-27632 ile Tedavinin Barsak Hasarı Üzerindeki Etkileri. Uzmanlık tezi, Gaziantep Üniv. Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı. Gaziantep.

Bao, W., Hu, E., Tao, L., vd. (2004). Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, **61**, 548-558.

Benekli, M., Xia, Z., Donohue, KA., vd. (2002). Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood*, **99**, 252-7.

Benekli, M., Baer, MR., Baumann, H., Wetzler, M. (2003). Signal Transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*, **101**, 2940-54.

Beutler, E., Duran, O., Kelly, B.M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *Aldrich Chem. Company*, **61(5)**, 882-888.

Biederer, C., Ries, S., Brandts, CH., McCormick, F. (2002). Replication selective viruses for cancer therapy. *International Journal of Molecular Medicine*, **80**, 163-75.

Bivalacqua, TJ., Champion, HC., Usta, MF., vd. (2004). Rho/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: A mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 9121-9126.

Blain, S., Massagué, J. (2002). Breast cancer banishes p27 from nucleus. *Nature Medicine*, **8**, 1076-8.

Blalock, W.L., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., vd. (2003). Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: Identification of an Achilles heel in leukemia. *Leukemia*, **17** 1058-67.

Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signaling. *Nature*, **411**, 355-64.

Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Shao, L., Zhu, D., Chen, Y.W. (1999). Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **43**, 269-87.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., vd. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, **19**, 2474 88.

Buhl, A.M, Johnson, N.L, Dahanasekaran, N. (1995)G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *Journal of Biological chemistry*, **270**, 24631-24634.

Burns, E.R. (1968). Initiation of DNA Synthesis in Ehrlich Ascites Tumor Cells in Their Plateau Phase of Growth. *Cancer Research*, **28**, 1191-1196.

Büyükafşar, K., Levent, A. (2003). Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and neurotransmitter release in the mouse gastric fundus. *Biochemistry Research*, **303**, 777– 781.

Büyükafşar, K., Levent, A., Ark, M. (2003). Expression of Rho-kinase and its functional role in the contractile activity of mouse vas deferens. *British Journal of Pharmacology*, **140**, 743– 749.

Büyükafşar, K., Ün, İ. (2003). Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil on the corpus cavernosum from diabetic mice. *European Journal of Pharmacolog*, **472**, 235-238.

Cantley, LC., Neel, BG. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3 kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 4240-5.

Cantley, L., Carpenter, C.L. (2008). Cell Signaling. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA;eds.Cancer. 8 th ed. *Philadelphia:Lippicott - Williams&Wilkins*, 67-78.

Casey, P.J., Seabra MC. (1996). Protein prenyl transferases. *Journal of Biological chemistry*, **271**, 5289-5292.

Ceylan H, Yapici S, Tutar E, Ceylan NO, Tarakçioğlu M, Demiryurek AT. (2010). Protective Effects of Dexpanthenol and Y-27632 on Stricture Formation in a Rat Model of Caustic Esophageal Injury. *Journal of Surgical Research*, 1-7.

Chang, F., Lee, JT., Navolanic, PM., vd. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, **17**, 590-603.

Chang, J., Xie, M., Shah, V.R., Schneider, M.D., Entman, M.L., Wei, L.,Schwartz, R.J. (2006). Activation of Rhoassociated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **103**, 14495–14500.

Chitale K, Webb RC. (2002). Microtubule depolymerization facilitates contraction of rat aorta via activation of Rho-kinase. *Vascular Pharmacol* **38**, 157-161.

Çoban, İ., Baştürk, O., Levi, E., Alper, M., Adsayı, V. (2010). Pak-1 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Tissue Microarray Study. *Turkish Journal of Pathology*,**26**, 7-13.

Demiryürek, S., Kara, AF., Celik, A., Tarakçioğlu, M., Bağci, C., Demiryürek, AT. (2005). Effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *European Journal of Pharmacology*, **527**, 129-40.

Demiryürek, S., Kara, AF., Celik, A., Tarakçioğlu, M., Bağci, C., Demiryürek, AT. (2005b). Effects of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Biochemiscal Pharmacol*, **69**, 49-58.

Derici, E. (2007). Rho Kinaz ve Siklooksijenaz İnhibitörleriyle Siklofosfamid Kombinasyonlarının Çeşitli Tümör Hücre Serilerine Etkisi. Doktora Tezi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Mersin.

Dhanasekaran, N., Dermott, J.M. (1996). Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal*, **8**, 235-245.

Doğan, AL., Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **35**, 34-42.

Druker, BJ., Talpaz, M., Resta, DJ. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **344**, 1031-7.

Ekinci, G. (2000). Katı Ehrlich Ascites Tümörünün Büyüme Kinetiği, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Elman, GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archs Biochem Biophys*, **82**, 70-77.

Frame, MC. (2002). Src in cancer: Deregulation and consequences for cell behavior. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, **1602**, 114-30.

Fritz, G., Kaina, B. (2006). Rho GTPases: Promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, **6**, 561–571.

Fu, X., Gong, MC., Jia, T., Somlyo, AV., Somlyo, AP. (1998). The effects of the Rho kinase on arachidonic acid-, GTPγS-, and phorbol ester-induced Ca²⁺-sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett*, **440**, 183-187.

Fukata, Y., Oshiro, N., Kinoshita, N., Kawano, Y., Matsuoka, Y., Bennett, V., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *Journal of Cell Biology*, **145**, 347–361.

Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. (2001). Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sciences*, **22**, 32–39.

Gerber, M., Astre, C., Segala, C., Saintot, M., Scali, J., Lafontaine, JS., Grenier, J., Pusol, H. (1998). Tumour progression and oxidant-antioxidant status. *Cancer letters*, **14**, 211-214.

Gohla, A., Harhammer, R., Schultz, G., (1998). The G-protein G13 but not 12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *The Journal of Biological chemistry*, **273**, 4653-4659.

Grune, T., Siems, W., Uhlig, R., Jakstadt, M. (1992). Adenine Metabolism of Ehrlich Mouse Ascites Cells in Proliferating and Resting Phases of Tumor Growth. *Biochemical.*, **26(2)**, 199-209

Gümüşhan, H. (2002). İ.P., İ.V., S.C., Yollarla Uygulanan Adriamycin'in Ehrlich Asit Tümörü (EAT) Taşıyan Farelere Etkileri Üzerine Bir Çalışma, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa.

Han, S. (2005). Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell proliferation by suppressing p21 gene expression via signals involving Erk and Rho kinase. *Cancer Lett*, **219**, 71–81.

Hanahan, D., Weinberg, RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.

Hirano, K. (2007). Current topicks in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *Journal of Pharmacological Sciences*, **104**, 109-115.

Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., vd. (1998). Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *Journal of Cell Biology*, **141**, 1625-1636.

Hirsch, FR., Scagliotti, GV., Langer, CJ. (2003). Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: Perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer*, **41**, 29-42.

Hristozov, D., Gadjeva, V., Vlaykova, T., Dimitrov, VG. (2001). Evaluation of oxidative stress in patients with cancer. *Arch. Physiol. Biochemistry*, **109**, 331-336.

Hulka, BS., Stark, AT. (1995) .Breast cancer: cause and prevention. *Lancet*, **346**, 883-887.

Hyvelin, J.M., Howell, K., Nichol, A., Costello, C.M., Preston, R.J., McLoughlin, P. (2005). Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation, *Cira Research*, **97** 185-91.

Ihara, E., McDonald, JA. (2007). The regulation of mouth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase. *Canadin Journal of Physiology and Pharmacology*, **85**, 79-87.

Ikeda, H., Nagashima, K., Yanase, M. (2003). Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285**, 880-886.

Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y., Narumiya, S. (1997). p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett*, **404**, 118-124.

Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. (1999). An essential part of Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Medicine*, **5**, 221-225.

Janssen, L.J., Lu-Chao, H., Netherton, S. (2001). Excitation-contraction coupling in pulmonary vascular smooth muscle involves tyrosine kinase and Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Molecular Physiology*, **280**, 666-674.

Jalink, K., Van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., Moolenaar, R.H. (1994). Inhibition of lysophosphatidate and thrombin induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP binding protein Rho. *Journal of Cell Biology*, **126**, 801-810.

Jones, R.J., Brunton, V.G., Frame, M.C. (2000). Adhesion-linked kinase in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3- kinase. *European Journal of Cancer*, **36**, 1595-606.

Kaleoğlu, Ö., İşli, N. (1977). Ehrlich-Lettre Asit Tümörü, *Tip Fakültesi Mecmuası*, **40**, 978-984.

Kalender, E. M., Demiryürek, Ş., Öztuzcu, S., Kızılyer, A., Demiryürek, A. T., Balakan, O., Camcı, C. (2011). Investigation of the association between ROCK1 gene Lys222Glu ve Arg1262Gln polymorphisms and breast cancer. *Free Journal Management System*, **17(2)**, 77-81.

Kamai, T., Sumi, S., Tsujii, T., Honda, M., Yamanishi, T., Yoshida, K.I. (2002). The Rho/Rho- kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumor, *BJU International*, **89**, 449-53

Kaneko, T., Amano, M., Maeda, A., Goto, H., Takahashi, K., Ito, M., Kaibuchi, K. (2000). Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**, 110–116.

Kaplan, H. M. (2007). Statin Utgulanen Farelerin Aorta ve Korpus Kavernozum Dokularında Rho-kinaz Enziminin Ekspresyonu ve Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilimdalı. Çukurova.

Kapsus, H. (1985). Lipid peroxidation: Mechanism, analysis, enzymology and biologic relevance. *Oxidative Stress*'de. Ed Sies H. London: *Academic Press*

Karp, JE., Lancet, JE., Kaukmann, SH., vd. (2001). Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: A phase I clinical- laboratory correlative trial. *Blood*, **97**, 3361-9.

Kawada, N., Seki, S., Kuroki, T., Kaneda, K. (1999). ROCK inhibitor Y-27632 attenuates stellate cell contraction and portal pressure increase induced by endothelin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **266**, 296-300.

Kayaalp, O. (1996). *Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe Taş Kitapçılık, ISBN: 975-7731-23-4, 79-322, Ankara.

Kim, JA. (2003). Targeted therapies for the treatment of cancer. *American Journal of Surgery*, **186**, 264-8.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**, 245–248.

Klages, B., Brandt, U., Simon, MI., Schultz, G., Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase- mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *Journal of Cell Biology*, **144**, 745-754.

Klein, G. (1951). Comparative Studies of Mouse Tumors with Respect to Their Capacity for Growth as ‘‘Ascites Tumors’’ and Their Average Nucleic Acid Content Per Cell. *Experimental Cell Research*, **2**, 518-573.

Kobayashi, S. (2002). Sphingosylphosphorylcholine is a novel Messenger for Rho kinase- mediated Ca^{2+} sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Research*, **91**, 112–119

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, **351** 289-305.

Köksel, O., Yıldırım, C., Tiftik, RN., Kubat, H., Tamer, L., Cinel, L., Kaplan, MB., Değirmenci, U., Özdülger, A., Büyükafşar, K. (2005). Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) upregulation in oleic acid-induce lung injury and its restoration by Y-27632. *European Journal of Pharmacology*, **510**, 135-142

Kuwahara, K., Saito, Y., Nakagawa, O., vd. (1999). The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in 107 neonatal rat cardiac myocytes: Possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. *FEBS Lett*, **452**, 314-318.

Lazebnik, Y.A., Medvedeva, D.N., Zenin, V.V. (1991). Reversible G2 Block in the Cell Cycle of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research*, **195**, 247-254.

Lawler, K., Foran, E., O’Sullivan, G., Long, A., Kenny, D. (2006). Mobility and invasiveness of metastatic esophageal cancer are potentated by shear stress in a ROCK- and Ras-dependent manner. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, **291**, C668-77.

Lennartz, K.J., Maurer, W., Eder, M. (1968). Autoradiographic Analysis of the Cell Cycle of Ascites Tumors (Mouse) of Various Chromosome Stemlines and Different Origin. *Z. Krebsforsch*, **71**, 267-282.

Lette, R., Paweletz, N., Werner, D., Granzow, C. (1972). Sublines of the Ehrlich-Lette Mouse Ascites Tumor, A New Tool for Experimental Cell Research. *Naturwissenschaften*, **59** 59-63.

Levent, A., Büyükafşar, K. (2004). Expression of Rho-kinase (ROCK-1 and ROCK-2) and its substantial role in the sheep ureter. *British Journal of Pharmacology*, **143**, 431-437.

Liem, AA., Chamberlain, MP., Wolf, CR., Thompson, AM. (2002). The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *European Journal of Surgical Oncology*, **28**, 679-84.

Lizuka, K., Shimizu, Y., Tsukagoshi, H., Yashi, A., Harad, T., Dobashi, K., Murozono, T., Nakazawa, T., Mori, M. (2000). Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea-pigs. *European Journal of Pharmacology*, **406**, 273-279.

Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci*, **1**, 173-180.

Madaule, P., Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell*, **41** 31-40.

Marquez, J., Sanchez-Jimenez, F., Medina, M.A., Quesada, A.R., De Castro, I.N.(1989). Nitrogen-Metabolism in Tumor-Bearing Mice. *Arch. Biochemical Biophysics*, **268**, 667-675.

Masumoto, A., Hirooka, Y., Shimokawa, H., Hironaga, K., Sataguchi, S., Takeshita, A. (2001). Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*, **1338**, 1307-1310.

Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO j*, **15**, 2208 –2216.

Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *Journal of Biochemistry*, **140**, 647–657.

McCormick, F. (1999). Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biology*, **12**, 53-6.

McCormick, F. (2000). Interactions between adenovirus proteins and the p53 pathway: The development of ONYX-015. *Sem Cancer Biology*, **10**, 453-9.

Miao, L., Calvert, J.W., Tang, J., Zhang, J.C. (2002). Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. *Life Sciences*, **71**, 1175-1185.

Miao, L., Dai, Y., Zhang, J. (2002). Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiology*, **283**, 983-989.

Miura, Y., Kikuchi, A., Musha, T., vd. (1993). Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. *Journal of Biological chemistry*, **268**, 510-515.

Mizukami, Y., Fujiki, K., Duerr, E.M., Gala, M., Jo, W.S., Zhang, X., Chung, D.C. (2006). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidy linositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *Journal of Biological chemistry*, **281**, 13957-63.

Mueller, BK., Mack, H., Teusch, N. (2005). Rho-kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Rev Drug Discover*, **4**, 387-398.

Mukai, Y., Shimokawa, H., Mataba, T., et al. (2001). Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease—a novel therapeutic target in hypertension. *The FASEB J*, **10**, 0735.

Murray, J.S. (2002) A Qualitative Exploration of Psychosocial Support for Siblings of Children With Cancer. *Journal of Pediatric Nursing*, **5**, 327-337.

Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., Narumiya, S.(1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*, **392**, 189–193.

Nakajima, M., Hayashi, K., Katayama, K., Amano, Y., Egi, Y., Goto, N., Kondo, T. (2003a). Wf-536 prevents tumor metastasis by inhibiting both tumor motility and angiogenic actions, *European Journal of Pharmacology*, **459**, 113-20

Nakajima, M., Hayashi, K., Egi, Y., Katayama, K., Amano, Y., Uehata, M., Ohtsuki, M., Fujii, A., Oshita, K., Kataoka, H., Chiba, K., Goto, N., Kondo, T.(2003b). *Effect of Wf-536, a novel ROCK inhibitor, against Metastasis of B16 Melanoma Cancer Chemother Pharmacol*, **52**, 319-24

Nakagawa, H., Yoshioka, K., Miyahara, E., Fukushima, Y., Tamura, M., Itoh, H. (2005). Intrathecal administration of Y-27632, a specific Rho-associated kinase inhibitor, for rat neoplastic meningitis. *Molecular Cancer Research*, **3**, 425-433.

Nicholson, KM., Anderson, NG. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, **14**, 381-95.

Nikolic, M. (2002).The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *International Journal of Biochemical Cell Biology*, **34**, 731-745.

Nilius, B., Voets, T., Prenen, J. (1999). Role of Rho and Rho kinase in the activation of voltage-regulated anion channels in bovine endothelial cells. *Journal of Physiology*, **516**, 67-74.

Niu, G., Wright, KL., Huang, M. (2002). Constitutive STAT3 activity upregulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, **21**, 2000-8.

Noma, K., Oyama, N., Liao, JK. (2006). Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, **290**, C661-8.

Northouse, L.L. (1988). Family issues in cancer care. *Adv. Psychosom Medical*, **18**, 82-101.

Okay, H.G. (1998). Deneysel EAT Oluşturulan Fare Karaciğer Plazmasında Nitrik Oksit Metabolizmasının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD., İstanbul.

Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cell signaling. *Cell Signal*, **11**, 545-554.

Oshiro, N., Fukata, Y., Kaibuchi, K. (1998). Phosphorylation of moesin by Rho associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvillilike structures. *Journal of Biological chemistry*, **273**, 34663-34666.

Öner, D. (1985). Ehrlich Ascites Tümör Hücrelerinde Vincristin'e Karşı Duyarlılığın Tümör Yaşı ile İlişkisi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Radyoloji ve Sağlık Fizyolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi., İstanbul.

Özyılkan, Ö. (2005). Kanser hastalarında yaşam kalitesinin önemi. http://www.bayar.edu.tr/~saykad/g_onkoloji.htm. (2010).

Park, JK., Lee, SO., Kim, YG., Kim, SH., Koh, GY., Cho, KW. (2002). Role of rho-kinase activity in angiotensin II- induced contraction of rabbit clitoral cavernosum smooth muscle. *International Journal of Impot. Research*, **14**, 472-477.

Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European Journal of Cancer*, **38**, 3-10.

Pawson, T., Raina, M., Nash, P. (2002). Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Letters*, **513**, 2-10.

Platanias, LC. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, **101**, 4667-79.

Puthier, D., Thabard, W., Rapp, M., vd. (2001). Interferon alpha extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 antiapoptotic molecule. *British Journal of Haematology*, **112** 358-63.

Rao, PV., Deng, PF., Kumar, J., Epstein, DL. (2001). Modulation of aqueous humor outflow facility by the rho-kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol and Vis Sci*, **42**, 1029-1037.

Rattan. R., Giri, S., Singh, A.K., Singh, I. (2006). Rho/ROCK pathway as a target of tumor therapy, *Journal Neurosci Research*, **83(2)**, 243-55

Rees, RW., Ralph, DJ., Royle, M., Moncada, S., Cellek, S. (2001). Y-27632, an inhibitor of Rho kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *British Journal of Pharmacology*, **133**, 455-458.

Rees, RW., Ziessen, T., Ralph, DJ., Kell, P., Moncada, S., Cellek, S. (2002). Human and rabbit cavernosal smooth muscle cells express Rho-kinase. *International Journal of Impot. Research*, **14**, 1-7.

Ries, S., Korn, WM. (2002). ONYX-015: Mechanism of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *British Journal of Cancer*, **86**, 5-11.

Rikitake Y, Liao JK. (2005). Rho GTP'ases, statins and nitric oxide. *Circ Research*, **97**, 1232-1235.

Rossowski, W.J., Cheng, B.L., Taylor, J.E., Data, R., Coy, D.H. (2002). Human ürotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, **438**, 159-170.

Sağlık bakanlığı kanserle savaş dairesi başkanlığı (2006).

Sah, V.P., Seasholtz, T.M., Sagi SA, Brown JH. (2000). The role of Rho in G-protein coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 459-489.

Sahai, E., Ishizaki, T., Narumiya, S., Treisman, R. (1999). Transformation mediated by RhoA requires activity of ROCK kinases. *Curr Bioogyl*, **9**, 136-145.

Santos, MF., McCormack, SA., Guo, Z., Okolicany, J., Zheng, Y., Johnson, LR., Tigyi, G. (1997). Rho Proteins play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution. *J. Clin. Invest*, **100**, 216–225.

Satoh, S., Utsunomiya, T., Tsurui, K., vd. (2001). Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sciences*, **69** 1441-1453.

Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate- A new oral targeted therapy. (2002). *N Engl J Med*, **346**, 683-93.

Sekulic, A., Hudson, CC., Homme, JL, et al. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen- stimulated and transformed cells. *Cancer Research*, **60**, 3504-13.

Schmidt, H., Siems, W., Müller, M., Dumdey, R., Rapoport, S.M. (1991). ATPProducing and Consuming Processes of Ehrlich Mouse Ascites Tumor Cells in Proliferating and Resting Phases. *Experimental Cell Research*, **194**, 122-127.

Senger, D.R., Gali, S.J., Dvorak, M.A., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983). Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science*, **219**, 983-985.

Shi, J., Wei, L. (2007). Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp*, **55**, 61–75

Shimokawa, H., Morishige, K., Miyata, K., Kondabashi, T., Eto, Y., Ikegaki, I., Asano, T., Kaibuchi, K., Takeshita, A. (2001). Longterm inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic lesion in a porcine model in vivo. *Cardiovascular Research*, **51**, 169-177.

Shimokawa, S., Iwashita, M., Akimoto, Y., Nagamatsu, S., Sakai, K., Hanashi, H., Kabir-Salmani, M., Yoshimura, Y. (2002). Small guanosine triphosphatase RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **87**, 5808-5816.

Shimokawa, H.Ç, Takeshita, A. (2005). Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biology*, **25**, 1767-1775.

Shimokawa, H., Rashid, M. (2007).Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sciencs*, **28**, 296-302.

Shin, I., Yakes, M., Rojo, F., vd. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature Medicine*, **8**, 1145-52.

Shirao, S., Kashiwagi, S., Sato, M., Miwa, S., Nakao, F., Kurokawa, T., Todoroki-Ikeda, N., Mogami, K., Mizukami, Y., Kuriyama, S., Haze, K., Suzuki, M., Kobayashi, S. (2002). Sphingosylphosphorylcholine is a novel Messenger for Rhokinase- mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Research*, **91**, 112–119.

Siems, W.G., Grune, T., Schmidt, H., Tikhonov, Y.V., Pimenov, M.A. (1993). Purine Nucleotide Levels in Host Tissues of Ehrlich Ascites Tumor Bearing Mice in Different Growth Phases of the Tumor. *Cancer Research*, **53**, 5143-5147.

Singer, W.D., Brown, HA., Sternweis, PC. (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem*, **66**, 475-509.

Skog, S., He, Q., Tribukait, B. (1990). Lack of Correlation Between Thymidine Kinase Activity and Changes of DNA Synthesis With Tumour Age: An In Vivo Study in Ehrlich Ascites Tumour. *Cell Tissue Kinetics*, **23**, 603-617.

Somlyo, AP., Somlyo AV. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **372**, 231-236.

Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiol*, **15** 177-185.

Somlyo, A.V. (2002). New roads leading to Ca²⁺ sensitization. *Circ Research*, **91**, 83-84.

Song, Z., Varani, J., Goldstein, I.J. (1993). Differences in Cell Surface Carbohydrates and in Laminin and Fibronectin Synthesis Between Adherent and Non-adherent Ehrlich Ascites Tumor Cells. *International Journal of Cancer*, **55**, 1029-1035.

Staal, SP. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 5034-7.

Stryer, L. (1995). Rho and Rho kinases. In: Stryer L(eds). *Biochemistry*, 4th ed. *New York: W. H. Freeman and Co*, 125-136.

Şahan-Fırat S, Tiftik RN, Nacak M, Büyükafşar K. (2005). Rho-kinase expression and its central role in ovine gallbladder contractions elicited by a variety of excitatory stimuli. *European Journal of Pharmacology*, **528**, 169-175.

Şentürk, H. (2004). The Role of Free Radical Damage in Hepato-Biliary System Diseases. *The Medical Journal of Kocatepe*, **5**, 1-8.

Taggart, MJ., Leavis, P., Feron, O., vd. (2000). Inhibition of PKC α and RhoA translocation in differentiated smooth muscle by a caveolin scaffolding domain peptide. *Experimental Cell Research*, **258**, 72-81.

Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.

Takamura, M., Sakamoto, M., Genda, T., Ichida, T., Asakura, H., Hirohashi, S. (2001). Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology*, **33**, 557-581.

Takeda, K., Jin, MB., Fujita, M., et.al. (2003). A novel inhibitor of Rho-associated protein kinase, Y-27632, ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Surgery*, **133**, 197-206.

Takemoto, M., Sun, J., Hiroki, J., Shimokawa, H., Liao, JK. (2002). Rho-kinase mediates hypoxiA induced downregulation endothelial nitric oxide sythase. *Circulation*, **106**, 57-62.

Tannock, I.F. (1969). A Comparison of Cell Proliferation Parameters in Solid and Ascites Ehrlich Tumors. *Cancer Research*, **29**, 1527-1534.

Taşkın, E.İ. (2002). Ehrlich Ascites Tümörü ile Balb-C Farelerde Oluşturulmuş Solid Tümör Modelinde Curcuminin Apoptoz Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Thorlacijs, K., Slotta, JE., Laschke, MW. (2006). Protective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment and hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *Journal of Leukocyt Biology*, **79**, 923-931.)

Traut, TW. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*, **140**, 1-22.

Torun, M., Yardım, S., Gönenç, A., Sargın, H., Menevşe, A., Simşek, B. (1995). Serum beta-carotene, vitamin E, vitamin C and malondialdehyde levels in several types of cancer. *J. Clinical. Phar.Ther*, **20**, 259-263.

Uchiyama, M., Mihara, M. (1977). Determination of malondealdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, **86** 271-8

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., vd. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, **389**, 990-994.

Vega, F.M., Ridley, A.J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology, *FEBS Lett*, **582**, 2093-2101.

Viglietto, G., Motti, ML., Bruni, P, et al. (2002). Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Medicine*, **8**, 1136-44.

Vinuela, J.E., Rodriguez, R., Gil, J., Coll, J., Concha, E., Subiza, J.L. (1991). Antigen Shedding Vs. Development of Natural Suppressor Cells As Mechanism of Tumor Escape in Mice Bearing Ehrlich Tumor. *International Journal of Cancer*, **47**, 86-91.

Vogt, PK. (2001). PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Molecular Medicine*, **7**, 482-4.

Wettschureck, N., Offermans, S. (2002). Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *International Journal of Molecular Medicine*, **80**, 629-638

Yin, L., Morishige, K., Takahashi, T., Hashimoto, K., Ogata, S., Tsutsumi, S., Takata, K., Ohta, T., Kawagoe, J., Takahashi, K., Kurachi, H. (2007). Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo, *Molecular Cancer Therapeutics*, **6**, 1517-25

Ying, H., Biroc, S.L., Li, W.W., Alicke, B., Xuan, J.A., Pagila, R., Ohashi Y, Okada T, Kamata Y, Dinter H. (2006). The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Molecular Cancer Therapeutics*, **5(9)**, 2158–64.

Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M. (1979) Lipit peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol*, **135**, 372-381.

Yoshioka, K., Matsumura, F., Akedo, H., Itoh. K. (1998). Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J Biol Chem*, **273**, 146-154.

Zeybek, Ş.Ü. (1996). En Uygun Ehrlich Ascites Tümör Modellerinin Farklı Soy ve Cinsiyetteki Farelerde Gösterilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Deneysel Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Zeybek, Ü. (2003). Deneysel Kanser Modelleri. *Kalıtısal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu*, 283-310.

Zheng, Y. (2001). Db1 family guanine nucleotide Exchange factors. *Trends Biochemical Sciences*, **26**, 724-732.

Xue, F., Zhang, J., Qiu, F., Zhang, M., Chen, X., Li, Q., Han, L., Xi, Z., Xia, Q. (2007). Rho signaling inhibitor, Y-27632, inhibits invasiveness of metastatic hepatocellular carcinoma in a mouse model, *Chin Medicine Journal*, **120**, 2304-2307

EKLER

Ek1.

Tümör Hücresi Sayımında Kullanılan Tampon Çözelti

1.Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat Tampon Çözeltisi)

8.0 gr NaCl

0.2 gr KH₂PO₄

2.9 gr Na₂HPO₄.12H₂O veya

2.3 gr Na₂HPO₄.2H₂O

1.44 gr Na₂HPO₄.2H₂O

1.15 gr Na₂HPO₄ (anhdrous)

0.2 gr KClO

2 gr NaN₃

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 °C de saklanmıştır.