



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLEANDRİNİN ALDOSTERON
VARLIĞINDA ÇEŞİTLİ KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK
ETKİSİ

ECZ. HALE NUR YERLİKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI
2014

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLEANDRİNİN ALDOSTERON VARLIĞINDA ÇEŞİTLİ
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİ

ECZ. HALE NUR YERLİKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. BÜLENT SARAÇ

SİVAS
2014

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

ye

ye

ye

ye (Danışman)

ONAY

Bu tez çalışması,26/11//2014 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri yeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali ÇELİKSÖZ

SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24-09-2008 tarihli ve 7 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

OLEANDRİNİN ALDOSTERON VARLIĞINDA ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİ

Ecz. Hale Nur YERLİKAYA

Yüksek Lisans Tezi, Farmakoloji (Tıp) Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bülent SARAÇ

2014, 51 sayfa

Bu çalışmada Nerium oleander (zakkum) bitkisinden elde edilen ve bir kardiyak glikozit olan oleandrinin A549 akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücreleri üzerinde tek başına ve aldosteron varlığında farklı konsantrasyon ve sürelerde gösterdiği sitotoksik etki incelenmiştir. Na⁺K⁺ ATPaz alfa 3 altünitesine selektif olarak bağlanıp bu enzimi inhibe eden oleandrinin sitotoksik etkinliğini arttırmak için Na⁺K⁺ ATPaz alfa 3 altünitesinin transkripsiyonunu spesifik olarak indükleyen aldosteron kullanılmıştır. Bu sayede daha düşük konsantrasyondaki oleandrin çözeltisi ile daha yüksek sitotoksik etkinlik görmek amaçlanmıştır.

Deneyle MCF7 ve A549 hücre kültürünün yapılması, hücre sayımı, oleandrin ve aldosteronlu ortamda inkübasyon ve XTT yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak P değeri 0,05 ten küçük alınarak yorumlanmıştır.

Yapılan deneylerin sonucunda oleandrinin tek başına A549 akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkinlik gösterdiği, aldosteron varlığında özellikle A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlenmiştir (P<0,05). Oleandrinin sitotoksik etkinliğinin konsantrasyon ve zamanla doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından T-565 nolu dosya olarak desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kanser, oleandrin, aldosteron, sitotoksikite

SUMMARY

CYTOTOXIC EFFECT OF OLEANDRIN ON VARIOUS CANCER CELLS WITH ALDOSTERONE PRESENTS

Ecz. Hale Nur YERLİKAYA

Master of Science Thesis, Department of Pharmacology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Bülent SARAÇ

2014, 51 pages

In this study oleandrin's which is a cardiac glycoside and obtained from Nerium oleander plants, cytotoxic effect was researched on A549 lung cancer and MCF7 breast cancer as separately and with aldosterone existence in different concentration and time. Aldosterone which is specifically induce Na^+/K^+ ATPase alpha 3 subunits transcription, was used to increase oleandrin's which is selectively binds and inhibits to Na^+/K^+ ATPase alpha 3 subunits cytotoxic activity. By this means, be aimed to observe higher cytotoxic activity with lesser concentration oleandrin solution

Experiments were done as doing MCF7 and A549 cell culture, cell counting, incubation with oleandrin and using XTT procedure. Results are explained statistical as P less den 0,05

At the results of experiments, Oleandrin' s show that meaningful cytotoxic effect statistical on A549 lung cancer and MCF7 breast cancer by separately and its effect increased with aldosterone existence especially on A549 lung cancer ($P < 0,05$). Cytotoxic effect of oleandrin was observed that increase in correlation with concentration and time.

This study was supported by Research Support Unit of Cumhuriyet University as the Project no : T565

Key words: Cancer, oleandrin, aldosteron, cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Danışmanım Doç. Dr. Bülent SARAÇ' a tez sürecim boyunca yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Prof. Dr. İhsan BAĞCIVAN ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTUN'a, deneylerimde bana en üst düzey katkıyı veren Ar. Gör. Merve ERGÜL 'e,

İlim sahibi olabilmemiz için çocuklarını her daim destekleyen, sayelerinde bugünlere geldiğim canım anne ve babama, Nerium oleander (zakkum) üzerine çalışmam için beni teşvik eden Abdurrahman dedeme, iyi günde kötü günde her zaman yanımda olduklarını bildiğim ablam ve kardeşime, her zaman yar ve yardımcı olan eşim Hayrettin YERLİKAYA' ya, bu tezi yazarken karnımda, sunarken kucağımda olan, hayatımıza bambaşka bir tat ve heyecan katan oğlum ILGAZ' a desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
GRAFİKLER LİSTESİ	IX
RESİMLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XI
KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 Kanser	2
2.2 Apoptozis	2
2.3 Na ⁺ /K ⁺ ATPaz Enzimi	3
2.3.1 Na ⁺ /K ⁺ - ATPaz Enzim Fonksiyonları	3
2.3.2 Na ⁺ /K ⁺ ATPaz Enzim İzozimleri	4
2.3.3 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz enzimi izozim dağılımı	6
2.3.4 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz enzimi regülasyonu	7
2.4 Kardiyak glikozitler	8
2.4.1 Kardiyak Glikozitlerin Kimyasal Yapısı	9
2.4.2 Kardiyak glikozitlerin Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz ile Yapı Etki ilişkileri	11
2.4.3 Kardiyak glikozitlerin etki mekanizması ve farmakolojik etkileri	11
2.4.4 Kardiyak glikozitlerin yan etkileri	12
2.4.5 Nerium oleander ve Oleandrin	12
2.5 Aldosteron	16
2.5.1 Aldosteronun etkileri	16
2.5.2 Aldosteron salgılanmasının düzenlenmesi	16
2.5.3 Aldosteronun moleküler düzeydeki etkileri	16
3 MATERYAL VE METOD	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar	17
3.1.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler	17
3.1.3 Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler	17
Metod	18
3.1.4 Besiyeri hazırlanması	18
3.1.5 Hücrelerin pasajlanması	18
3.1.6 Neubauer lamı ve hücre sayımı	18
3.1.7 Hücrelerin plakelere ekilmesi, oleandrin ve aldosteronla muamele edilmesi	19
3.1.8 XTT testi:	21
3.1.9 İstatistiksel Analiz:	22
4 SONUÇLAR	23
5 TARTIŞMA	32
6 KAYNAKÇA	33
ÖZGEÇMİŞ	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1 Na ⁺ -K ⁺ -ATPaz enzimi alfa-beta alt birimi yapı ve fonksiyonunun şematik olarak gösterilmesi (Gustavo Blanco, 1998).	3
Şekil 2-2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz'ın mekanizması (N Bauer et al, 2005).	4
Şekil 2-3 Alfa ve Beta alt ünitelerinin hücre zarı üzerindeki topolojik şemaları (Gustavo Blanco, 1998)	5
Şekil 2-4 Kardenolit 23 c	9
Şekil 2-5 Bufadienolit 24 c.....	9
Şekil 2-6 Digitoksigenol ve uzarigenolün kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2-7 Bazı ozların kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2-8: Kardiyak glikozitlerin etki mekanizması	12
Şekil 3-1 Neubauer sayım lamı.	19
Şekil 3-2 XTT'nin formazana dönüşümü.	21

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 4-1: Oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarının MCF7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini 24, 48 ve 72. Saatlerde değerlendirilmesi	23
Grafik 4-2: Oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarının A549 küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilmesi	24
Grafik 4-3: Aldosteronun 300nM ve 600 nM konsantrasyonlarının A549 küçük hücreli akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin 24 saatte değerlendirilmesi.....	24
Grafik 4-4: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 24 saatteki değerlendirilmesi.....	25
Grafik 4-5: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 48 saatteki değerlendirilmesi.....	26
Grafik 4-6: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 72. saatteki değerlendirilmesi.....	27
Grafik 4-7: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 24 saatteki değerlendirilmesi.....	28
Grafik 4-8: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 48 saatteki değerlendirilmesi.....	29
Grafik 4-9: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 72 saatteki değerlendirilmesi.....	30
Grafik 4-10; Aldosteron varlığında oleandrin uygulamasının MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin 24, 48 ve 72. Saatlerdeki değerlendirilmesinin özet grafiği.	31
Grafik 4-11: Aldosteron varlığında oleandrin uygulamasının A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin 24, 48 ve 72. Saatlerdeki değerlendirilmesinin özet grafiği.	31

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Nerium oleander bitkisinin toprak üstü kısmı (Wikipedia)	13
Resim 2: Nerium oleander' in patentli ekstraktı Anvirzel' in hücre düzeyindeki etkileri (Nerium Biotech)	14

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1 96 kuyucuklu platede konsantrasyon dağılımı. (A= Aldosteron, Ole= Oleandrin) 20

KISALTMALAR DİZİNİ

-OH	Hidroksil grubu
AEO	Ankara Eczacı Odası
AÜECZF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium (
FBS	Fetal Bovine Serum
K ⁺	Potasyum iyonu
Na ⁺	Sodyum iyonu
PBS	Phosphate buffered saline
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

1 GİRİŞ

Kanser, gelişmiş ülkelerde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sıklıkta görülen ölüm nedenidir (Kayaalp, 2005). Kanser kemoterapisinde amaç, kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek sitotoksik etki sağlamaktır. İdeal olan, bu sitotoksik etkinin sadece malign hücelere spesifik olmasıdır fakat kullanımda olan ilaçlar hem sağlıklı hücreleri hem de kanser hücrelerini etkilemektedir. Kullanımda bir çok kemoterapötik ajan bulunmasına rağmen halen etkili bir spesifik bir tedavi bulunamamış olup yeni ilaç arayışları tüm dünyada devam etmektedir.

Nerium oleander ve başlıca etken maddesi olan oleandrin, son zamanlarda popüler bir araştırma konusu olmuştur. Bir çok deney ve araştırma yapılmasına rağmen çeşitli kanser türleri üzerindeki sitotoksik etkinliğinin ne derece olduğu halen aydınlatılamamıştır. Kemoterapide rutin tedavi seçenekleri arasına henüz girmemiş olsa da geleceğin umut vadeden bir bileşimidir. Gün geçtikçe farklı kanser çeşitlerinde, farklı ilaçlarla kombine halde, farklı konsantrasyon ve sürelerde denenerek oleandrin hakkında daha çok bilgi edinilmektedir.

Günümüzde erkeklerde en sık akciğer kanseri, kadınlarda ise en sık meme kanserine rastlanmaktadır. Bu nedenle çalışmalarımızda A549 akciğer kanseri hücreleri ve MCF7 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Oleandrinin sitotoksik etkinliğini hücre zarında bulunan Na^+/K^+ -ATPaz enzimi alfa 3 altünitesi üzerinden gösterdiğini ele alarak, bu altünitenin transkripsiyonunu arttırmak ve böylece oleandrinin daha düşük dozda daha yüksek sitotoksik etki göstermesini sağlamak amacıyla farklı konsantrasyonlardaki oleandrin, aldosteron varlığında denenmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kelime anlamı olarak kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren kötü urlara denir. Genel anlamda ise kanser vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan 100'den fazla hastalık grubudur. (www.kanser.gov.tr, 2012)

Kanserin akciğer kanseri, anal kanal kanseri, anüs kanseri, böbrek kanseri, cilt kanseri, meme kanseri, rahim kanseri, ince bağırsak kanseri, kalın bağırsak kanseri, kan kanseri, karaciğer kanseri, melanoma, özefagus kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, safra yolu kanseri, safra kesesi kanseri, serviks (rahim ağzı) kanseri, mide kanseri gibi birçok çeşidi vardır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür (World Health Organization, 2004). Kadınlarda en sık görülen kanser çeşidi ise meme kanseridir. Ortalama olarak her 8 kadından biri bu kansere yakalanmaktadır. Akciğer kanserinden sonra dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanserdir.

Kanser hastalarının çok az bir kısmı tek başına cerrahi ve/veya radyoterapi tedavisi ile iyileşebilmektedirler. Geri kalanların büyük bölümüne sistemik kemoterapi uygulanmaktadır. Bu hastaların küçük bölümünde (yaklaşık %10) kanserin tipi nedeniyle kemoterapi ile tam şifa sağlanabilmekte veya hastalığın remisyonu uzatılabilmektedir. Ancak hastaların çoğunda ilaç tedavisi hastalığı sadece baskılamakta ve komplikasyonlar ölüme neden olmaktadır (Howland & Mycek, 2009).

2.2 Apoptozis

Apoptozis, programlanmış hücre ölümü demektir. Vücuttaki anormalleşmiş veya ihtiyaç duyulmayan hücrelerden kurtulmanın doğal yoludur. Organizmanın yaşamı için gerekli ve yararlı olan bir süreçtir.

Vücudumuzdaki sağlıklı hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptir. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne kadar bölüneceğini ve zamanı gelince çevreye zarar vermeden programlı olarak ölmesini bilir (www.kanser.gov.tr, 2012). Bazen DNA'sı hasar görmüş bir hücre kontrolden çıkar ve bölünmeye devam eder. Çoğalan hücreler farklı büyüklükteki iyi veya kötü huylu tümörleri oluştururlar. İyi huylu (selim) tümörler genellikle hayatı tehdit etmezler ve alınabilirler, vücutta başka bir yere dağılmazlar. Kötü huylu (habis) tümörler ise vücudun diğer bölgelerine geçebilir, yeni koloniler oluşturabilir ve hayatı tehdit edebilirler.

Apoptozis sinyali alan bir hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar. Benzer bir şekilde sitoplazma da yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünür. Bu parçalara apoptotik cisimcikler de denilir. Apoptotik cisimcikler; yüzeylerinde yeni sinyal verici yapılar ortaya çıkarır

ve bu sinyalin uyarısı ile yakınlarındaki hücre tarafından(bunlar genelde histiyosit'lerdir) fagosite edilerek ortadan kaldırılır (Lipponen P, 1994) (Wyllie AH, 1980).

Apoptozis'in organizmadaki temel fonksiyonları şunlardır:

- Embriyonal gelişim, örneğin insanlarda parmak aralarının şekillenmesi ya da göz kapakları arasındaki boşluğun şekillenmesi.
- Kadınlarda menstrual siklusda endometrial hücrelerinin (uterus'un iç katmanındaki epiteller) yıkımı.
- DNA hasarı alan hücrelerin yıkımı.
- Tümöral hücrelerin ortadan kaldırılması.
- Virus ile infekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılması.

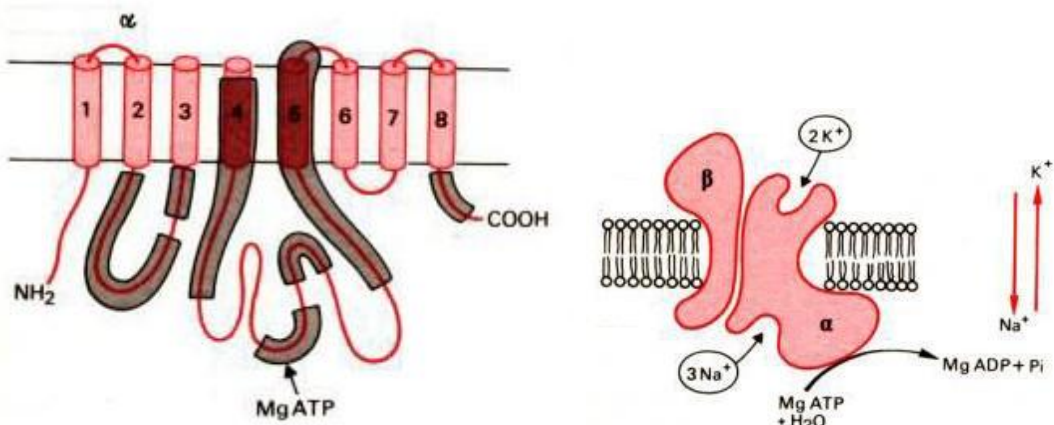
2.3 Na⁺/K⁺ ATPaz Enzimi

Na⁺/K⁺ ATPaz (Na pompası) ilk kez 1957 yılında Skou tarafından enerji dönüştürücü bir pompa olarak tanımlanmıştır (Stryer, 1996).

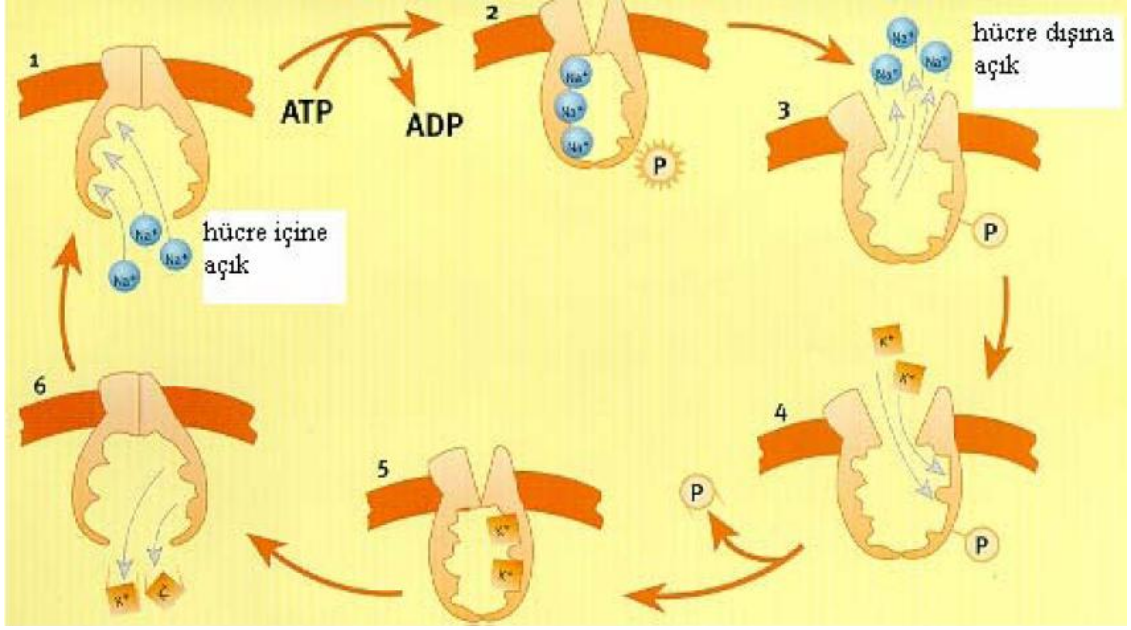
Memeli hücrelerinde intraselüler sıvıda K⁺ gradienti, ekstraselüler sıvıda Na⁺ gradienti yüksektir. Hücre dışındaki K⁺'nin hücre içine alınması ve hücre içindeki Na⁺'nın hücre dışına atılması işlemini gerçekleştiren Na⁺/K⁺ -ATPaz, işlevsel olarak transmembranal bir proteindir. (Yang P, 2009). Bu aktiviteyi gerçekleştirebilmek için ATP' ye ihtiyacı vardır. Hatta bu sistemin dinlenme durumundaki bir bireyde vücudun kullandığı toplam Adenozin-5' Trifosfat'ın (ATP) üçte birini kullandığı gösterilmiştir (Stryer, 1996).

2.3.1 Na⁺/K⁺ - ATPaz Enzim Fonksiyonları

Na⁺/K⁺ -ATPaz, hücrenin ozmotik dengesinin sağlanmasında, dokularda dinlenme durumundaki membran potansiyelinin düzenlenmesinde, kas ve sinirlerde uyarılabilirlik özelliklerinin sağlanmasında rol almaktadır (Gustavo Blanco, 1998).



Şekil 2-1 Na⁺-K⁺ATPaz enzimi alfa-beta alt birimi yapı ve fonksiyonunun şematik olarak gösterilmesi (Gustavo Blanco, 1998).



Şekil 2-2 Na⁺/K⁺-ATPaz'ın mekanizması (N Bauer et al, 2005).;

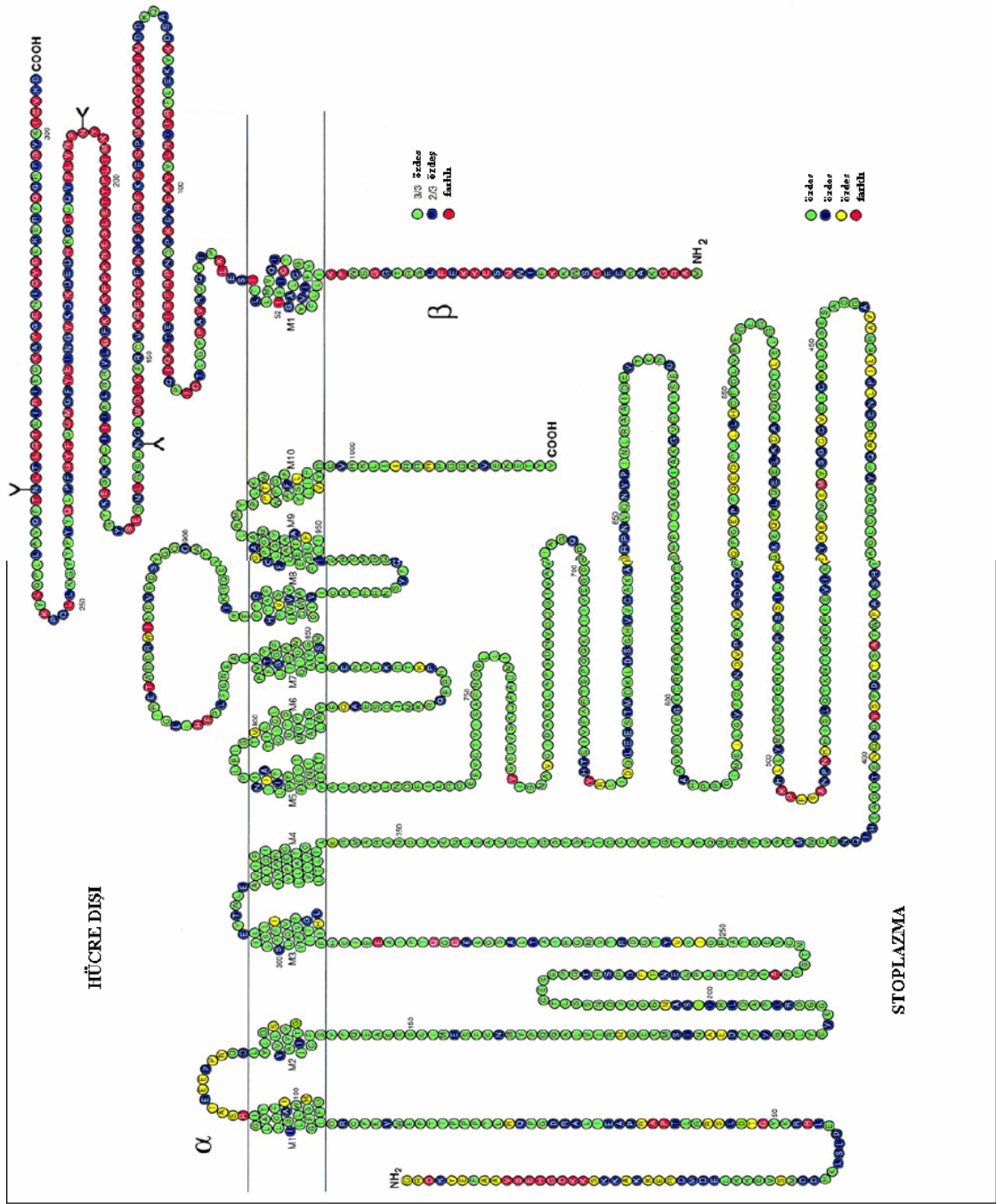
İyon alışverişinin her döngüsünde bir ATP hidrolize uğramakta, 3 Na⁺ hücre dışına, 2 K⁺ da hücre içine taşınmaktadır. Bu iyon geçişi olmadığı sürece ATP hidrolizi de gerçekleşmemektedir. (Stryer, 1996).

Bitkilerden elde edilen bazı steroidler Na⁺/K⁺-ATPaz enzimini inhibe edebilmektedirler. Bunlar kardiyotonik steroidler olarak da bilinen digitoksin, ouabain, oleandrin gibi ilaçlardır. Söz konusu kardiyotonik steroidlerin hücre zarının ekstraselüler kısmından Na⁺/K⁺-ATPaz enziminin alfa altbirimine bağlanarak bu enzimi inhibe ettikleri gösterilmiştir (Stryer, 1996) (Braunwald, 1992).

2.3.2 Na⁺/K⁺ ATPaz Enzim İzozimleri

Na⁺-K⁺ -ATPaz proteininin alfa, beta ve gamma alt birimlerinden oluştuğu açıklanmıştır (Therien AG et al., 1997). Na⁺-K⁺ ATPaz proteini yapısal olarak katalitik alfa ve glikozile beta ve gama altünitesinden oluşan heterodimer bir yapıdır. Alfa altünitesi ATP, Na⁺, K⁺ ve kardiyak glikozitler için bağlanma alanıdır. Beta altünitesi ise alfa altünitesini stabilize eder, regülatör roldedir.

Alfa alt biriminin şimdiye kadar alfa1, alfa2, alfa3 ve alfa4 olarak belirlenmiş 4 şekli mevcuttur: Alfa1 alt biriminin tüm canlı türlerinde temel alt birim olduğu düşünülmektedir (F Verdonck, 2003). Beta alt birimlerinin ise beta1, beta2 ve beta3 şekillerinin olduğu bildirilmiştir (F Verdonck, 2003) (Gustavo Blanco, 1998). Normal hücrelerde görülen bu varyasyon kanser hücrelerinde de görülür (Yang P, 2009).



Şekil 2-3 Alfa ve Beta alt ünitelerinin hücre zarı üzerindeki topolojik Şemaları (Gustavo Blanco, 1998)

Alfa altbirimi 112.000 dalton moleköl ağırlığı ile oldukça geniş bir membran proteinidir. Na⁺-K⁺ ATPaz enziminin katalitik ve transport özelliklerinden sorumludur. (Lingrel JB, 1994) (Mercer, 1993). En az sekiz transmembranal heliksten meydana gelmekte ve zarın sitozolik tarafında ATPazı kapsamaktadır; ekstrasellüler tarafta ise kardiyotonik steroidlerin bağlanması için bir bölgenin bulunduğu rapor edilmiştir (Zijian Xie, 2003) (Tripodi & al, 1996).

Farklı alfa altbirimlerinin herbiri farklı fonksiyonel özellikler taşımaktadır ve temel farklarından biri kardiyak glikozidler tarafından değişik derecelerde inhibe edilmeleridir. Yüksek

veya düşük afiniteli izoformlar bu özelliklerine bağlı olarak nitelendirilmektedirler (F Verdonck, 2003).

Beta altbirimi ise glikozilasyonunun derecesine bağlı olarak farklı dokularda 40.000 ila 60.000 dalton arasında molekül ağırlığına sahiptir. Tek transmembran heliks şeklinde bir glikoprotein olup, transport aktivitesi içermediği gösterilmiştir (Zijian Xie, 2003) (Stryer L., 1996). Beta altbiriminin, enzimin normal aktivitesi için esansiyel olduğu ve Na^+ ve K^+ iyonlarının Na^+-K^+ ATPaz enzimine affinitelerinin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Buna ek olarak omurgalı hücrelerde beta altünitesi alfa polipeptidin doğru katlanmasının stabilizasyonunda rol oynar (Gustavo Blanco, 1998) (Blanco G, 1994) (Chow DC, 1995) (McDonough AA, 1990) . İnsanlarda beta altünitesinin her üç izoformu da yüksek afinitelidir ancak en hassas şekilleri alfa1beta1 ve alfa3beta1 olarak tanımlanmıştır. Glikozitlere farklı derecelerde ilgi göstermeleri dışında bu izoformlar eksternal K^+ ya ve internal Na^+ ya olan farklı afiniteleriyle de birbirlerinden farklılık göstermektedir (F Verdonck, 2003).

Gamma altünitesi olarak adlandırılan üçüncü protein, enzim preparasyonlarının saflaştırılmasında tanımlanmıştır. Gama altünitesinin, 8.000-14.000 dalton ağırlığında küçük ve hidrofobik bir polipeptit olduğu ifade edilmektedir. Gama altüniteleri arasındaki homolojinin yüksek olması nedeniyle bu altünitenin Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi için gerekli olabileceği ileri sürülmüştür. Ek olarak gama altünitesinin Na^+-K^+ ATPaz fonksiyonunu modifiye edebildiğine dair deliller vardır. Gama altünitesinin Na^+-K^+ ATPaz fonksiyonundaki kesin rolü daha ileri çalışmalara gereksinim duyar (Reaves, 1980).

2.3.3 Na^+/K^+ -ATPaz enzimi izozim dağılımı

Kardiyak dokuda alfa 1, alfa 2 ve alfa 3 izoformlarının bulunduğu, temel kardiyak beta altbiriminin ise beta1 olduğu bilinmektedir. İnsan ventriküler kasında alfa 1 %55, alfa 2 %18, alfa 3 ise %27 oranında bulunduğu gösterilmiştir (F Verdonck, 2003). Bu izoformların varlığı, kobaylarda kardiyotonik steroidlere verilen yanıtlardaki farklılıklardan yola çıkılarak tanımlanmıştır (Gustavo Blanco, 1998).

Alfa ve beta altünitelerinin farklı genlerden eksprese edilmeleri dışında Na^+-K^+ ATPazın farklı izoformlara sahip olmasının başka nedenlerinin de olabileceği bildirilmiştir (Gustavo Blanco, 1998). Bazı hücrelerde Na^+-K^+ ATPaz enzimi transkripsiyon aşamasında farklılıklar göstermektedir. Ayrıca alfa ve beta altbirimlerinin değişik kombinasyonlarla bir araya gelmelerinin de farklı heterodimerlerin oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir. Pineal bezde hem alfa 1 beta 2 hem de alfa 3 beta 2 formları bulunabilmektedir. Santral sinir sistemi hücreleri, gözün silier epitel hücreleri ve koroid pleksus, birçok farklı alfa - beta altbirim kombinasyonlarını bir arada bulundurabilmektedir. Na^+-K^+ ATPaz enziminin dörtlü yapısının enzimatik fonksiyonlar üzerine ne gibi bir etkisinin olabileceği henüz tam olarak açıklanamamıştır (Gustavo Blanco, 1998).

Alfa1 beta1 birleşimi neredeyse her dokuda bulunabildiği, fakat en çok böbrekte etkili olduğu gösterilmiştir. Alfa 2 ve alfa 3 şekillerinin renal kortekste, medullada ve papillada bulunduğu gösterilmiştir, fakat her ikisinin birlikte böbrekteki alfa1beta1 şekillerinin yalnızca %0,

1' i kadar bulunduğu rapor edilmiştir. Alfa 4 testise özeldir, alfa 2 en çok adipositlerde, kaslarda, kalpte ve beyinde bulunurken alfa 3' ün ise sinir dokularında daha fazla bulunduğu belirtilmiştir. Sinir hücreleri temel olarak alfa 3 bulundururken glial hücrelerin alfa 2 içermekte olduğu, beta 2 izoformunun iskelet kasında, pineal bezde ve sinir dokuda bulunurken beta 3' ün ise testiste, retinada, karaciğerde ve akciğerde farklı oranlarda bulunduğu gösterilmiştir (Gustavo Blanco, 1998).

Nöron hücreleri tek izozim veya farklı alfa ve beta heterodimer kombinasyonlarından oluşan çoklu izozimleri içermektedirler ayrıca nöronlar alfa 3 polipeptidin başlıca kaynağıdır (Gustavo Blanco, 1998).

Gamma alt biriminin ise böbrek gibi bazı dokularda bulunduğu ve dokuya özel Na^+-K^+ ATPaz enzim dengeleyicisi olduğu gösterilmiştir (Therien AG et al., 1997).

Buna ilaveten Na^+-K^+ ATPaz izoformların ekspresyon örnekleri, gelişimin yanı sıra hormonal regülasyona bağlıdır ve hastalık sürecinde değişebilir (Gustavo Blanco, 1998).

2.3.4 Na^+/K^+ -ATPaz enzimi regülasyonu

Na^+ pompası izozimleri hormonlar tarafından farklı olarak düzenlenebilir. Hormonlar tarafından özel bir izoformun ekspresyonunun düzenlenmesiyle aksiyonlar ortaya çıkabilir veya bir bireyin Na^+-K^+ ATPaz enzimlerinin aktivitesini direkt olarak etkileyebilir (Ewart & Klip, 1995) Örneğin rat iskelet kasında insülin, plazma membranına intrasellüler depolanma öncesi Na^+/K^+ -ATPaz alfa 2' nin hızlı translokasyonuna yolaçabilir Bunun sonucunda, hücre yüzeyine ilave fonksiyonel Na^+ pompalarının gereksinimi ve Na^+-K^+ ATPaz enzim aktivitesi artar. İlaveten Na^+-K^+ ATPaz izoformlarının normal ekspresyonu patolojik durumlar tarafından da değiştirilebilir. Örneğin birkaç kardiyak hastalıkta kalbin Na^+-K^+ ATPaz izoform kompozisyonu değişmiş bulunmuştur. Bu değişiklikler, hastalık esnasında değişen homeostazın yeniden şekillenmesinde hücrenel girişimi yansıtabilir (Hundal, Marette, Mitsumoto, Ramlal, Blostein, & Klip, 1992).

Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinin regülasyonu farklı hücrenel mekanizmalar tarafından, plazma membranındaki mevcut enzim moleküllerinin sayısının modülasyonu veya hücre yüzeyinde hazır bulunan Na^+-K^+ ATPaz' ın aktivitesinin değiştirilmesiyle gerçekteştirilebilir. Alternatif olarak hücre yüzeyindeki Na^+ pompasının aktivitesi Na^+ pompası fonksiyonunda hızlı düzenlenme sağlanmasıyla hücre yüzeyinde direkt olarak regüle edilebilir. Bu hızlı yanıt karışan birkaç etken vardır. İntrasellüler Na^+ konsantrasyonu, intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonu ve endojen Ouabain, Na^+ pompası aktivitesinin kısa dönem düzenleyicileridir (Ewart & Klip, 1995).

Na^+-K^+ ATPaz alfa 1 aktivitesinin kısa süreli regülasyonu için, Na^+ iyonu girişiyle Na^+ iyonu konsantrasyonunun artması, fosforilasyon, defosforilasyon, altünitelerin plazma membranına translokasyonu ya da sodyuma ilginin artması ile sonuçlanan bir mekanizma ileri sürülmektedir. Bu altünitenin uzun süreli regülasyonuna gen transkripsiyonu, translasyonu ve protein degradasyonundaki değişikliklerin neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu değişiklikler proteinkinaz ve fosfatazın inhibisyon veya aktivasyonunu içeren kompleks intrasellüler sinyal ağı üzerinde gerçekteşir (Sweeney & Klip, 1998).

Aldosteron, böbrek toplayıcı kanal epitel hücrelerindeki mineralokortikoid reseptörünü aktive ederek reseptör dimerinin aldosterona özgül genlerin düzenleyici bölgesindeki aldosteron yanıt elementi denilen baz ardışımlarına bağlanarak aldosteronla indüklenen proteinlerin (AİP) sentezini artırır. Ekspresyonu artan proteinler arasında, kanal epitelinin luminal (apikal) membranına gidecek olan amiloride duyarlı sessiz $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz molekülleri bulunur. Aldosteronun etkisiyle sitoplazmadaki bu sessiz proteinlerin membrana translokasyonu fonksiyonel hale gelmeleri hızlanır. Böylece luminal membrandan sodyum geçişi ve bazolateral membrandan peritubuler kapilerlere Na^+ pompalanması artar (Kayaalp, 2005).

Geering K. ve arkadaşları $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPazı aldosteronla indüklenen protein olarak tanımlamışlardır (Geering, Girardet, Bron, Kraehenbuhl, & Rossier, 1982). $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz, sentezi aldosteron ile indüklenen ve aldosteron antagonisti olan spironolakton ile inhibe edilen bir proteindir (Verrey, et al., 1987). Aldosteron ile 6-96 saat inkübe edilmiş hücrelerde α ve β altünitelerinin sitoplazmik mRNA' larında ve protein sentezlerinde 2-3 kat artış görülmüştür (Verrey, et al., 1987).

Farman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada aldosteronun rat hipokampusünde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz alfa 3 altünitesinin sentezini selektif olarak arttırdığını bildirmektedirler (Ferman, Bonvalet, & Seckl, 1994). Grillo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise aldosteronun adrenalektomize ratlarda beyindeki alfa 3 ve beta 1 altünitelerinin sentezini arttırdığı görülmüştür (Grillo, Piroli, Lima, McEwen, & Nicola, 1997)

2.4 Kardiyak glikozitler

Kardiyak heterozitler, kalp yetmezliğinde kullanılan pozitif inotrop ve negatif kronotrop etkili bileşiklerdir.

Scrophulariaceae familyasından başta *Digitalis purpurea* olmak üzere birçok *Digitalis* türlerinde, Apocynaceae (*Strophanthus*, *Acocanthera*, *Nerium* vs.), Asclepiadaceae (*Asclepias*, *Gomphocarpus*, *Periploca* vs), Ranunculaceae (*Adonis*, *Helleborus*) ve Moraceae, Cruciferae, Papilionaceae, Tiliaceae gibi birçok familyada, çoğu kalp kuvvetlendirici olarak etki eden birçok kardiyoaaktif tür bulunmaktadır (Tanker & Tanker, 1991).

Tüm bu türler kardiyoaaktif glikozit taşımalarına rağmen, tıpta sadece *Digitalis purpurea*' dan (mor çiçekli yüksük otu) elde edilen digitoksin ve *Digitalis lanata*' dan (beyaz yüksük otu) elde edilen digoksinden yararlanılır.

Digitalis türleri, yapraklarında flavanoitleri, saponinleri ve digital glikozitleri taşırlar. Digital glikozitler, 21 karbonlu bir iskelete sahip olan pregnan tipi aglikonları ve oz kısımlarında 2-deoksiozları (D-digitaloz, D-diginoz, L-oleandroz) bulunduran bileşiklerdir.

Kardiyak glikozitler miyokarda $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPaz}$ pompasına bağlanarak bu pompayı inhibe ederler ve hücre içi Na^+ konsantrasyonunu artırırlar. Bunun sonucunda sitozolik Ca^{+2} seviyesi de artar ve kasılma gücünde iyileşme görülür.

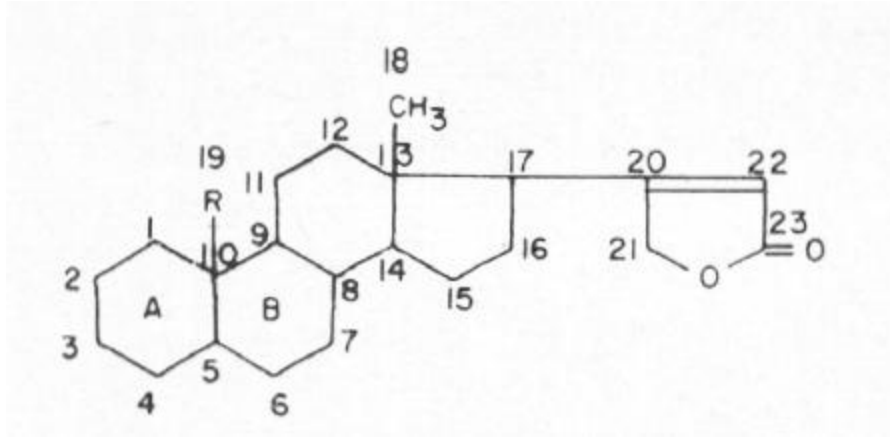
Kardiyak glikozitlerin bağlanma afiniteleri alfa altünite çeşidine göre değişmektedir. Alfa 1 alfa 2 ye göre daha az afiniteye sahipken, alfa 3 100 kat daha yüksek afiniteye sahiptir. (Yang P, 2009) (Blanco, 2005) (Rajasekaran SR, 2005) Optimal glikozid bağlanması için ortamda Na^+ ,

Mg⁺² ve ATP bulunmalıdır; ekstrasellüler K⁺ varlığı ise bu bağlanmayı engellemektedir (Braunwald, 1992).

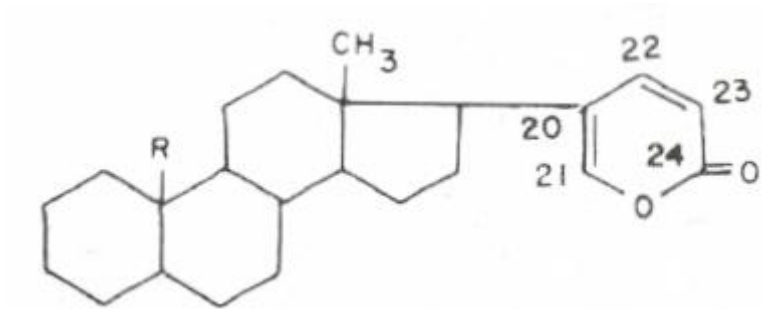
2.4.1 Kardiyak Glikozitlerin Kimyasal Yapısı

Kardiyak glikozitler kimyasal yapı itibariyle heterozit yapısındadır ve aglikonları büyük bir konstitüsyon yakınlığı gösterir (Tanker & Tanker, 1991).

Kardiyoaktif heterozitlerin aglikonları steroid yapısındadır ve siklopentanofenantren halkası ihtiva eder. Bu sisteme bir de lakton halkası bağlanmıştır. Heterozitlerin çoğu 5 üyeli doymamış bir lakton halkası taşır ve 23 karbonludur. Urginea ve Helleborus türlerindeki heterozitlerde doymamış 6'lı bir lakton halkası mevcuttur ve bunlar 24 karbonludur. 23 karbonlu olanlara "kardenolit", 24 karbonlulara "bufadienolit" adı verilir. Bunlara ilaveten doğada 14-21 epoksi kardenolite de rastlanmıştır (Tanker & Tanker, 1991).



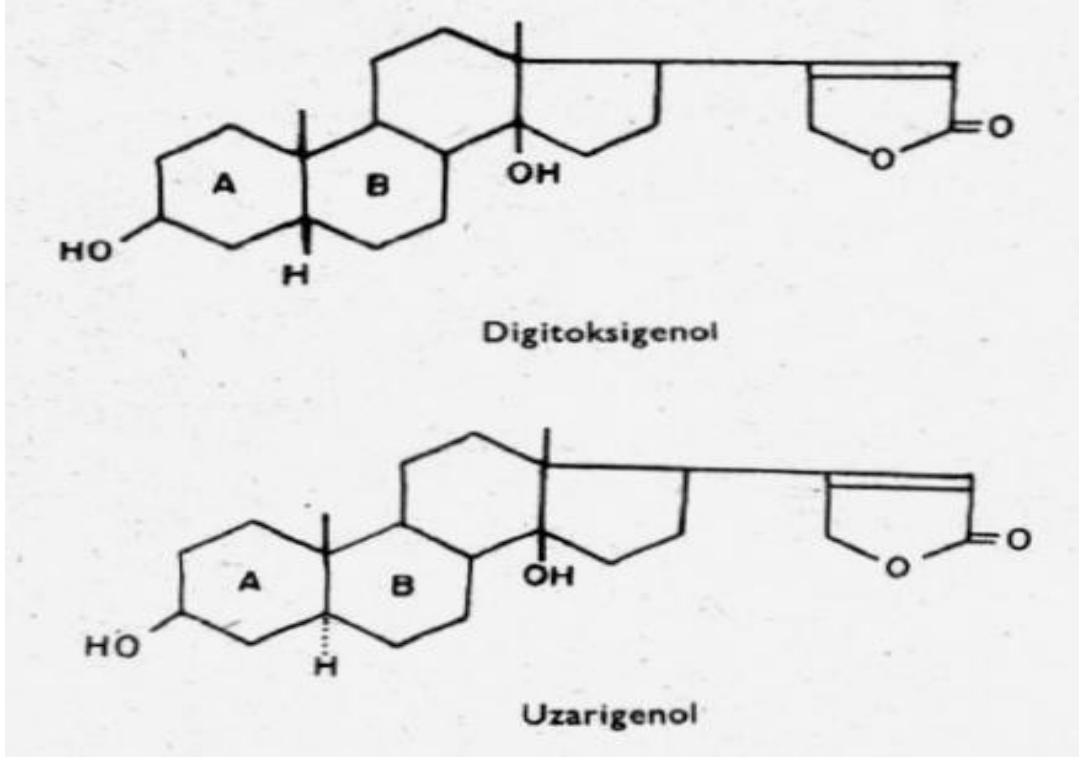
Şekil 2-4 Kardenolit 23 c



Şekil 2-5 Bufadienolit 24 c

Kardiyoaktif hererozitlerin aglikonunda siklopentanofenantren halkası en az iki - OH grubu taşır. Bu -OH gruplarından biri 3. karbon atomuna, diğeri ise genellikle 14. karbon atomuna bağlıdır. - OH grupları ikiden fazla ise diğeri 5, 11 veya 16 konumunda yer alır. Ozlar bir holozit zinciri halinde 3. karbon atomundaki -OH grubuna bağlanır. Siklopentanofenantren halkasındaki 10. karbona bağlı R radikali, -CH₃ -CH₂OH veya -CHO gruplarıdır. Siklopentanofenantren iskeletinde A ve B halkalarının teşkil ettiği düzleme nazaran 5. ve 10. karbon atomlarındaki sübstitüentler cis yada trans olabilirler. Bu iki konfigürasyon izomerinden cis olanlar

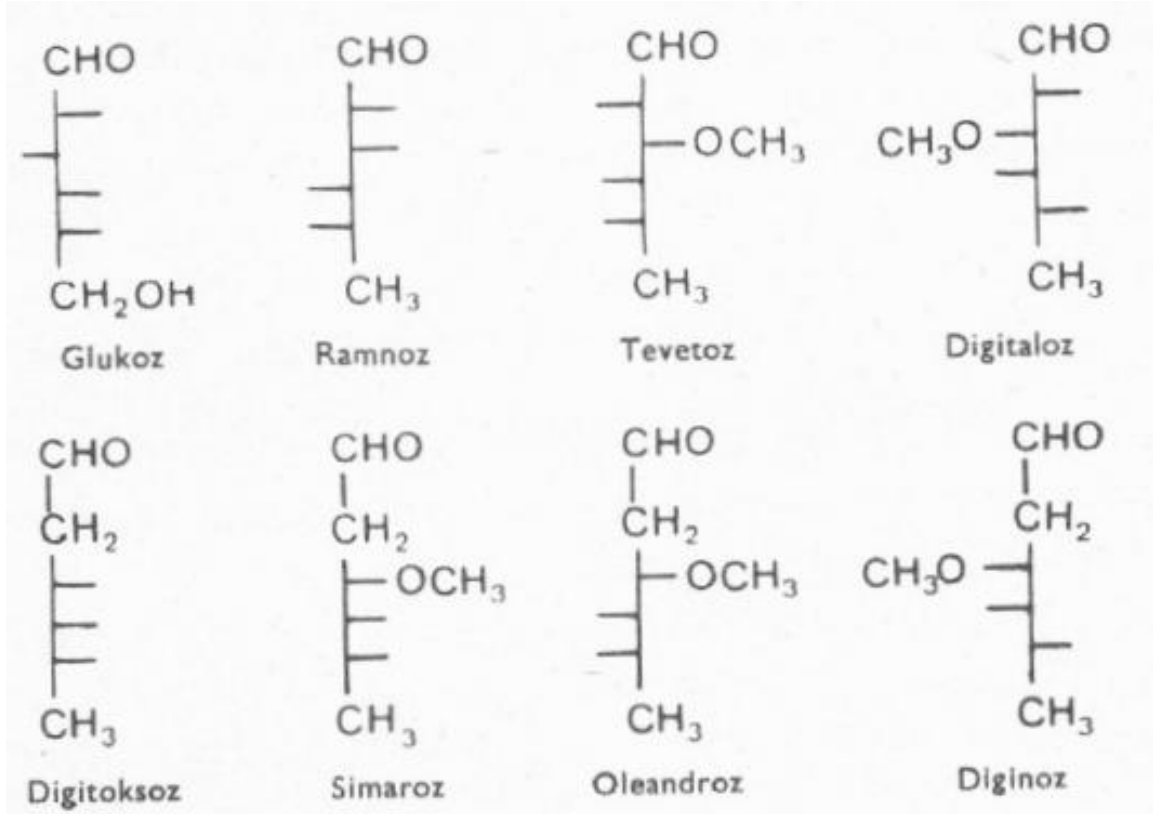
kardiyoaktiftir. Nitekim aynı süstitüentleri ihtiva ettikleri ve aynı molekül yapısında oldukları hal de digitoksigenol'un cis izomeri kardiyoaktif olmasına rağmen trans izomeri uzarigenol, bağırsak kontraksiyonunu inhibe ettiğinden antidiyareik olarak etki eder (Tanker & Tanker, 1991).



Şekil 2-6 Digitoksigenol ve uzarigenolün kimyasal yapısı

Kardiyoaktif özellik bir de etilenik lakton halkasına bağlıdır. Katalitik hidrojenleme ile lakton halkası doyurulur veya alkali hidrolizle bu halka açılırsa maddenin kalp üzerindeki etkisi kaybolur.

Kardiyoaktif heterozitler iki veya daha fazla oz taşımaktadır. Bunlardan en çok rastlananlar glukoz, ramnoz ve bu tip heretozitlere özel olan tevetoz, digitaloz, digitoksoz, simaroz, oleandroz ve diginoz'dur.



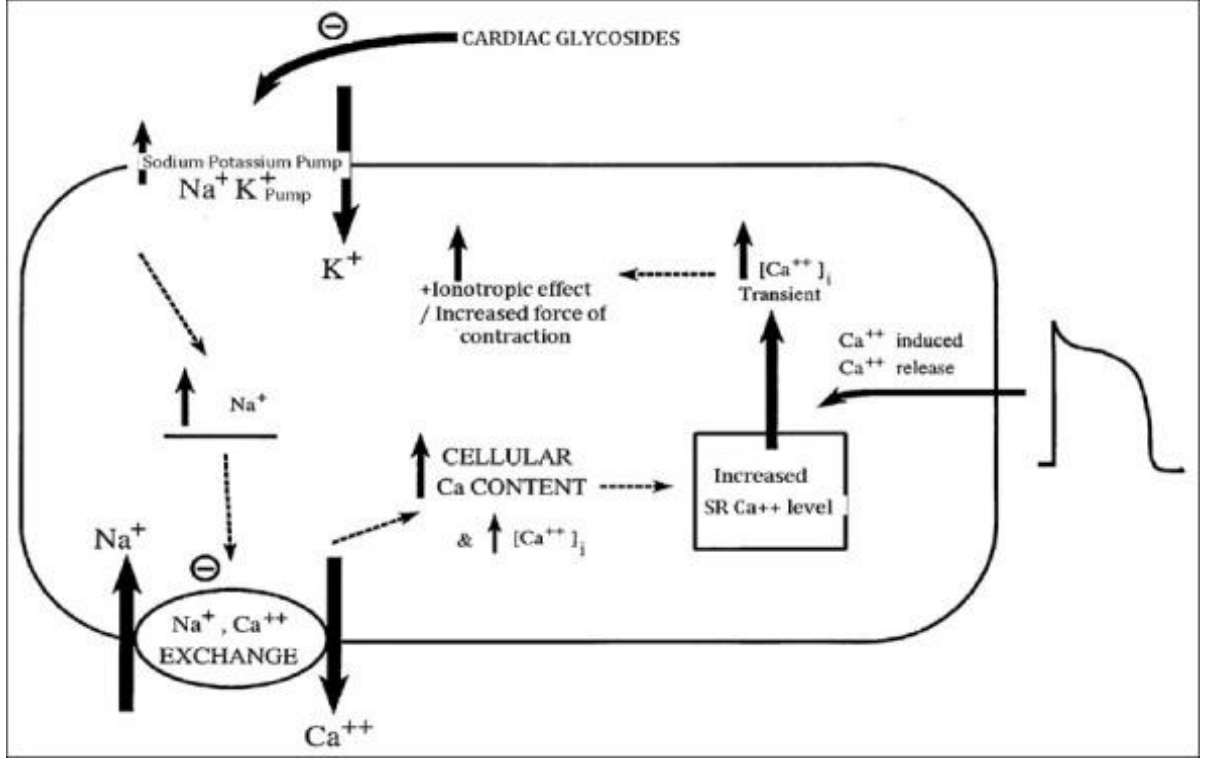
Şekil 2-7 Bazı ozların kimyasal yapısı

2.4.2 Kardiyak glikozitlerin Na⁺/K⁺-ATPaz ile Yapı Etki ilişkileri

- 1) Halka konformasyonu bir başka deyişle halkaların kenetlenmesi cis-trans-cis şeklinde olmalıdır. Bu durumda aktivite maksimum olur.
- 2) A-B halkalarının kenetlenmesi trans olduğunda aktivite azalır (uzarigenol_antidiyareik).
- 3) 3. ve 14.C' da en az 2 tane β -OH bulunmalıdır.
- 4) 17. C' da β konumunda bir lakton halkası olmalıdır.
- 5) 3. C atomu üzerindeki -OH grubuna bağlı oz ve oz zinciri olmalıdır. Bu zincir glikozitin çözünürlüğü üzerine etki ederek, aktivitede dolaylı rol oynar.
- 6) Aktiviteden asıl sorumlu kısım aglikondur.

2.4.3 Kardiyak glikozitlerin etki mekanizması ve farmakolojik etkileri

Kardiyak glikozitler Na-K ATPaz pompasının alfa 1 alt ünitelerine düşük afiniteyle, alfa 3 alt ünitelerine ise alfa 1' e göre 100 kat daha yüksek bir afiniteyle bağlanarak Na⁺ ve K⁺ alışverişini inhibe ederler (Blanco, 2005) (Rajasekaran SR, 2005). Hücre içi Na⁺ konsantrasyonu artar ve bunun sonucunda hücre içi sitozolik Ca⁺² seviyesi artar. Artan sitozolik Ca⁺² ile daha kuvvetli bir kasılma sağlanır (Rose & Valdes, 1994).



Şekil 2.2-8: Kardiyak glikozitlerin etki mekanizması

Kardiyak glikozitler bu farmakolojik özellikleri nedeniyle kalp kasının daha kuvvetli kasılmasını sağladıkları için konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılırlar (Kjeldsen, Norgaard, & Gheorghide, 2002). Bunun yanında son araştırmalar bu bileşiklerin antikanser ilaç olarak da kullanılabileceklerini gösteriyor (Newman, et al., 2007) (Ergun, 1992) (Karaca, 2008).

2.4.4 Kardiyak glikozitlerin yan etkileri

Kardiyak heterozitlerin yan etkileri ve zehirlenmelerin başlıca belirtileri şunlardır; aşırı salivasyon, hipotansiyon, hipotermi, midriazis, inkoordinasyon, depresyon, konfüzyonlar, bulanık görme, renk algılama bozukluğu, bitkinlik, solunum güçlüğü ve siyanoz, taşikardi ve aritmi tarzında kalp yetmezliği, tam kalp bloğu, anoreksi, bulantı, kusma şeklindedir (Howland & Mycek, 2009). Solunum ve kalp yetmezliği sonucu koma ve ölüm görülür. (Ergun, 1992)

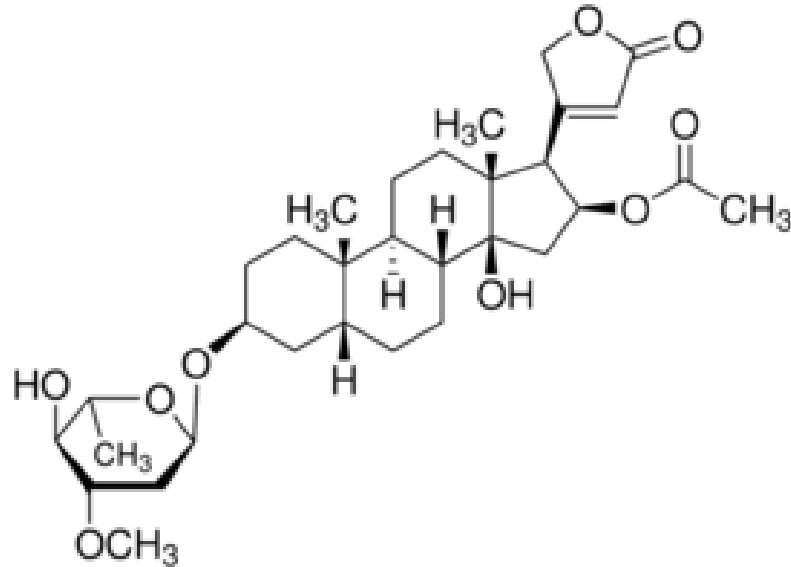
2.4.5 Nerium oleander ve Oleandrin

Nerium oleander (zakkum), Apocynaceae familyasından koyu pembe renkli çiçek açan bir akdeniz bitkisidir. Anadolu'da özellikle batı ve güney bölgelerde oldukça yaygındır. Oleandrin ise Nerium oleander (zakkum) bitkisinden elde edilen bir kardiyak glikozittir (Tanker & Tanker, 1991).



Resim 1: Nerium oleander bitkisinin toprak üstü kısmı (Wikipedia)

Bitkinin yaprakları oleandrozit adı verilen heterozidi içerir (% 0.5). Bu madde oleandriyenol ile oleandrozun (dezoksimetilpentoz metil eteri) meydana getirdiği bir heterozittir. Oleandrozit oral yolla, kardiyotonik ve diüretik olarak kullanılır (Tanker & Tanker, 1991).



Şekil 2-9 Oleandrozit formül

Nerium oleander çok eski çağlardan beri dünyanın çeşitli bölgelerinde, halk arasında değişik hazırlanma şekilleri ile çeşitli hastalıkları tedavi etmede kullanılmıştır (Siddiqui, Siddiqui, Begum,

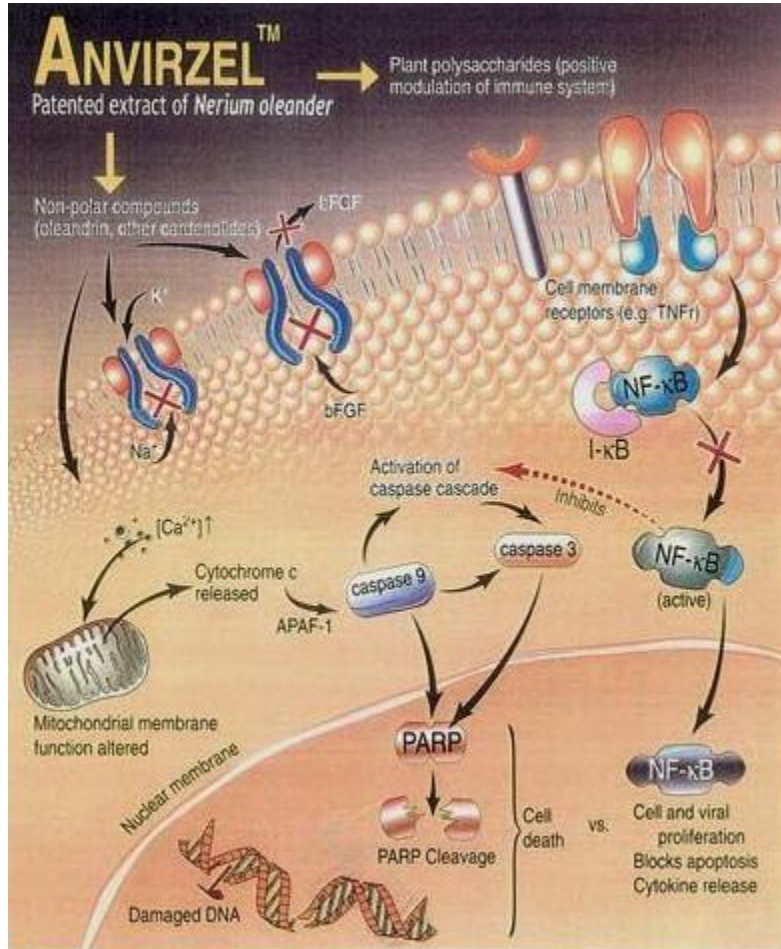
Hafeez, & Kanerocin, 1989) Bitkinin toksik özellikleri Hipokrates'ten beri bilinmekte olup, çok eski çağlarda yunan yazarlar tarafından belirtilmiştir (Szabuniewicz, McCrady, & Camp, 1971) (Watt & Breyer-Brandwijk, 1962).

Nerium oleander ekstraktı kanser tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. İlk olarak 8.yy' da arap hekimleri tarafından kanser tedavisinde kullanılmıştır (American Cancer Society's Guide to Complementary and Alternative cancer Methods, 2001)

Yakın geçmişte yapılan bazı araştırmalarda Apocynaceae familyasının N.oleanderi de kapsayan birkaç türünün kanser tedavisinde etkin olduğu belirtilmekte ve dünyanın değişik bölgelerinde, halk arasında bazı kanser türlerinde kullanıldığına işaret etmektedir (Elkiey, Elmoghazy, Salem, & Karawya, 1970) (Hartwell, 1967).

Digital grubunun tipik kardiyak etkilerine sahip olan oleandrinin digitoksinden iki üç kat daha aktif olduğu, organizmada daha az biriktiği, çok kolaylıkla atıldığı ve tavşanda vazokonstriksiyon oluşturduğu rapor edilmiştir (Watt & Breyer-Brandwijk, 1962).

Türk hekimlerinden de Opr. Dr. Ziya Önel, Nerium oleander yapraklarından hazırladığı bir sulu ekstraktı kullanarak bazı kanser türlerinde başarılı sonuçlar aldığını belirtmiştir. (Baytop, 1999) (Karaca, 2008) Bu bitkinin uluslararası patenti Amerika Birleşik Devletlerinde anvirzel adı ile alınmıştır (Newman, et al., 2001).



Resim 2: Nerium oleander' in patentli ekstraktı Anvirzel' in hücre düzeyindeki etkileri (Nerium Biotech)

Newman ve arkadaşları oleandrinin PANC-1 hücrelerindeki antiproliferatif etkinliğinin adriamisininden 60 kat daha fazla olduğunu göstermiş ve oleandrinin insan pankreas hücreleri üzerindeki apoptotik ve otofajik etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada oleandrinin PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde hücre siklusunun apoptozla alakalı olan G₁ ve S döneminde belirgin bir etki göstermediğini ama otofajiyile alakalı olan G₂/M döneminde etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Newman, et al., 2007).

Aynı çalışmada 20 nM ve 50 nM konsantrasyonlardaki oleandrinle muamelede PANC-1 hücrelerinin mitokondrilerinin morfolojisinin bozulduğunu, hücrede otofajinin başlayarak mitokondrinin parçalandığını göstermişlerdir.

Kumar ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları çalışmada oleandrinin potent bir sitotoksik ajan olarak belirtmişler, bu özelliği nükleer faktör kappa B' yi (NF-κB) inhibe ederek, fibroblast growth faktör-2 yi etkileyerek, apoptozisi başlatan Fas gen ekspresyonunu artırarak, mitokondri parçalanmasına ve tümör hücrelerinin hasarına neden olan süperoksit radikallerini düzenleyerek, tümörün yayılmasına neden olan interlökin-8'i inhibe ederek ve tümör hücresinde otofajiyi uyararak gösterdiğini belirtmişlerdir (Kumar, De, Mishra, & Mishra, 2013).

Oleandrinin kanser hücrelerindeki Na⁺-K⁺- ATPaz alfa 3 izoformuna spesifik olarak bağlandığı ve ve alfa 3 izoform sentezinin alfa 1 izoform sentezinden fazla olduğu kanser hücrelerinde oleandrinin proliferasyonu daha iyi inhibe ettiği görülmüştür (Yang P, 2009) (Nerium Biotech).

Yang ve arkadaşları oleandrinin antiproliferatif etkisini, Na⁺-K⁺- ATPaz alfa3 altünitesinin hücresel lokasyonunu değiştirerek gözlemler. Oleandrinin, Na⁺-K⁺- ATPaz alfa3 ünitesi hücre çekirdeğine yakın bulunan hücrelerde, Na⁺-K⁺- ATPaz alfa3 altünitesi sitoplazmaya yakın bulunan hücrelere göre 3 kat daha fazla antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Yang, et al., 2014).

Tüm bu bilgilerden yola çıkılırsa Nerium oleander'den elde edilen ve bir kardiyak glikozit olan oleandrinin, Na⁺-K⁺- ATPaz alfa3 altünitesine yüksek afiniteyle bağlanıp hücre içi birçok yolağı etkileyerek antiproliferatif ve sitotoksik etkinliğini gösterdiği söylenebilir.

Etkilediği hücre içi yolları şöyle sıralayabiliriz ;

- Hücrede otofajinin aktivasyonu ve mitokondrinin parçalanması (Newman, et al., 2007) (Newman RA, 2006)
- Süperoksit radikalleriyle tümör hücresine zarar verme (Kumar, De, Mishra, & Mishra, 2013)
- Kaspas/kaskad sisteminin aktivasyonu (McConkey DJ, 2000),
- Transkripsiyon faktörü NF- κB' nin inhibisyonu (Manna SK, 2000),
- Fas aktivasyonu (Sreenivasan Y, 2006),
- Tümör hücrelerinin proliferasyonu, apoptozisin önlenmesi, metastaz ve tümörlü hücrenin invazyonundan sorumlu olan Akt'nin fosforilasyonunun inhibisyonudur (Raghavendia PB, 2007) (Vivanco I, 2002).
- IL-8 inhibisyonu (Kumar, De, Mishra, & Mishra, 2013)

2.5 Aldosteron

2.5.1 Aldosteronun etkileri

Aldosteron, Na^+ reabsorbsiyonunu düzenleyerek ekstraselüler hacmi ve kan basıncını kontrol eden mineralokortikoid bir hormondur (Summa, et al., 2001).

Aldosteronun hedef organı böbrekler olup distal tubulusların distal kısmındaki ve insanda özellikle toplayıcı kanalların kortikal kısmındaki tubulus hücrelerini kendine özgü reseptörler aracılığı ile etkiler. Bu hücrelerde birbirine kenetli bir şekilde meydana gelen Na reabsorbsiyonu olayını ve buna karşılık lümene K^+ ve H^+ atılması olayını hızlandırır. Böbreğe göre daha ufak ölçüde Na^+ itrah eden dış salgı bezlerinin duktuslarında da aynı etkiyi gösterir. Böbrekler ve dış salgı bezleri ile ilgili etkinlikleri sayesinde aldosteron, değişen ortam koşullarına ve su ve tuz alımındaki veya kaybındaki değişmelere uygun olarak su ve tuz tutulmasını, K^+ ve proton kaybını sağlar (Kayaalp, 2005)

2.5.2 Aldosteron salgılanmasının düzenlenmesi

Aldosteron, renin-anjiyotensin sisteminin ve ACTH'nin kontrolü altında adrenal korteksin zona glomerülosa hücrelerinden salıverilir. Aldosteron salgısı kontrolsüz bir şekilde arttığında vücutta fazla miktarda Na ve su tutulur; ödem, hipervolemi ve hipertansiyon gelişebilir. Ayrıca hipokalemi ve metabolik alkaloz oluşur. (Kayaalp, 2005)

Hipovolemi, dehidratasyon, kanama, kalp yetmezliği, cerrahi girişimler, karaciğer sirozu gibi durumlarda ise aldosteron salgılanması artar (Kayaalp, 2005)

2.5.3 Aldosteronun moleküler düzeydeki etkileri

Aldosteron, böbrek toplayıcı kanal epitel hücrelerindeki mineralokortikoid reseptörünü aktive ederek reseptör dimerinin aldosterona özgül genlerin düzenleyici bölgesindeki aldosteron yanıt elementi denilen baz ardışımlarına bağlanarak aldosteronla indüklenen proteinlerin (AİP) sentezini artırır. Ekspresyonu artan proteinler arasında, kanal epitelinin luminal (apikal) membranına gidecek olan amiloride duyarlı sessiz Na^+/K^+ -ATPaz molekülleri bulunur. Aldosteronun etkisiyle sitoplazmadaki bu sessiz proteinlerin membrana translokasyonu ile fonksiyonel hale gelmeleri hızlanır. Böylece luminal membrandan sodyum geçişi ve bazolateral membrandan peritübüler kapilerlere Na^+ pompalanması artar (Kayaalp, 2005).

3 MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 19/03/2013 tarih ve 2013-03/39 numaralı kararla onaylanmıştır.

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

- Steril çalışma kabini
- İnkübatör
- Santrifüj
- Mikroskop
- Otomatik mikropipet
- mL' lik disposable pipet (Pipetaid ile uyumlu) CORNING 50/Pkt.
- 10 mL' lik disposable pipet (Pipet aid ile uyumlu) CORNING 50/Pkt.
- Doku Kültür Flaskı – non pyrogenic – 250 mL, 75 cm², angled neck (filter cap) – DNase, RNase free CORNING 5/Pkt
- Doku kültür flaskı – non pyrogenic – 25 cm², angled neck (filter cap) – DNase, RNase free CORNING 20/Pkt.
- Mikropipet ucu 25 µL (Gilson mikropipet ile uyumlu, beyaz, seviyeli, steril, kutulu)
- Mikropipet ucu 250 µL (Gilson mikropipet ile uyumlu, sarı, seviyeli, steril, kutulu)
- Mikropipet ucu 1250 µL (Gilson mikropipet ile uyumlu, mavi, seviyeli, steril, kutulu)
- XTT proliferasyon kiti 2500 testlik

3.1.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler

- Aldosteron CAS : 52-39-1
- Oleandrin

3.1.3 Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler

- Fetal Bovine Serum - Heat Inactivated-BIO. IND. 100 ml
- Trypsin – EDTA Solution – With Phenol Red – Mycoplasma tested –100 ml BIO. IND.
- Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) – with 1,0 g/l D-Glucose – with L-Glutamine – with sodium bicarbonate – 1 L SİGMA D5796
- Phosphate buffered saline (PBS) (PH 7.2) Hücre kültürü uyumlu (BIO. IND. 500 ml)
- L-Glutamine–Penicillin–Streptomycin solution 10x5 SİGMA G6784

Metod

Bu çalışmada A549 küçük hücreli akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır.

3.1.4 Besiyeri hazırlanması

Besiyeri hazırlanırken şu oranlara dikkat edilmiştir:

DMEM	%89
FBS	%10
Penicilline/ Streptomisin	%1

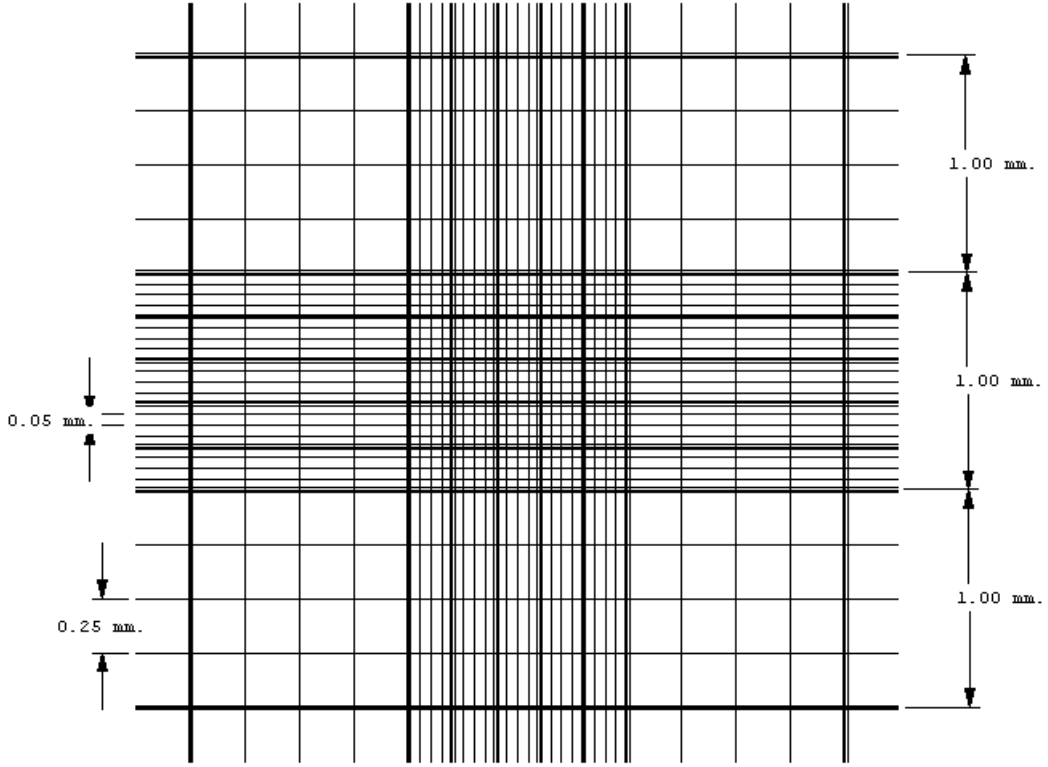
3.1.5 Hücrelerin pasajlanması

Bu işlem kanser hücrelerini canlı tutmak için 2-3 günde bir rutin olarak yapılmıştır.

- 1) Deneyden önce steril çalışma kabini 10 dk UV ışığa maruz bırakılarak sterilizasyon sağlanır.
- 2) İnkübatörde %5 CO₂ %95 nem ve 37 °C de bekletilen flasklar hafifçe çalkalanarak ölü hücrelerin besiyerine geçmesi sağlanır.
- 3) Hücre ortamına mikroskopla bakılarak canlı hücrelerin yüzeye yapışarak iplik şeklinde çıkıntılar oluşturduğu ve ölü hücrelerin besi ortamında yüzdüğü gözlenir.
- 4) Steril bir pipetle hücre tabakasının olduğu yüzeye dokunmadan besiyeri ortamdan çekilir ve böylece ölü hücreler ortamdan uzaklaştırılır.
- 5) Hücre tabakasına pipet değdirmeden ortam PBS ile yıkanır.
- 6) Yeni bir pipet ile ortama tripsin çözeltisi konulur, 2-3 dk çalkalanarak canlı hücrelerin yapışıkları yüzeyden kalkması sağlanır.
- 7) Flaska DMEM medyumunu eklenerek tripsin inaktif hale getirilir, çözelti ikiye bölünerek santrifüj tüplerine aktarılır ve 800 rpm de 5 dk santrifüj edilir.
- 8) Tüpün dibinde 1 ml bırakılarak süpernatant kısmı atılır, tüplere yeni ortam eklenerek hücreler süspansiyon edilir ve yeni flasklara aktarılır.
- 9) Flaskların üstüne hücre hattı adı, pasaj tarihi ve pasaj numarası yazılarak inkübatöre yerleştirilir.

3.1.6 Neubauer lamı ve hücre sayımı

- 1) Hücre pasajlanması sırasında santrifüj sonrasında, üst kısımdaki süpernatant atılıp, dipte kalan hücreler üzerine 1 mL besiyeri eklenmiştir.
- 2) Hücre sayımı için hücre solüsyonundan 50 µL alınıp, üzerine 50 µL Tripan mavisi boyası ekleyip ve hücre canlılığını belirlemek için Neubauer lamında sayım yapılmıştır.



Şekil 3-1 Neubauer sayım lamı.

3.1.7 Hücrelerin platelere ekilmesi, oleandrin ve aldosteronla muamemele edilmesi

- 1) 1., 2. ve 3. gün için 96 kuyucuklu plate'ler ayrı ayrı hazırlanacaktır ve % canlılık değerlerini belirlemek üzere oleandrin ve aldosteron+oleandrin değişik konsantrasyonları XTT testi için 3 farklı sıra (her konsantrasyon için 3 farklı değer olacak şekilde) ve tripan mavisini boya testi için bir sıra ayrılacaktır.
- 2) Neubauer lamında sayılan hücreler gerekli dilüsyon yapıldıktan sonra, hazırlanan 96 kuyucuklu platelere her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilecektir.
- 3) Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenecektir ve hazırlanan 3 günlük deney düzeneğinin ilk sırası ilaç uygulanmamış kontrol grubu olarak ayrılacaktır.
- 4) Daha önce aldosteronla yapılan deneyler doğrultusunda 300 nM konsantrasyonda aldosteron kullanılmasının ve 24 saat inkübe edilmesinin deney şartlarımız için optimal olduğu kabul edilmiştir. Bu nedenle 7, 8, 9, 10, 11 ve 12. sütunlara 300 nM aldosteron eklenerek 24 saat beklenecektir. Bu sürenin sonunda diğer kuyucuklara 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda oleandrin çözeltisi uygulanacaktır.

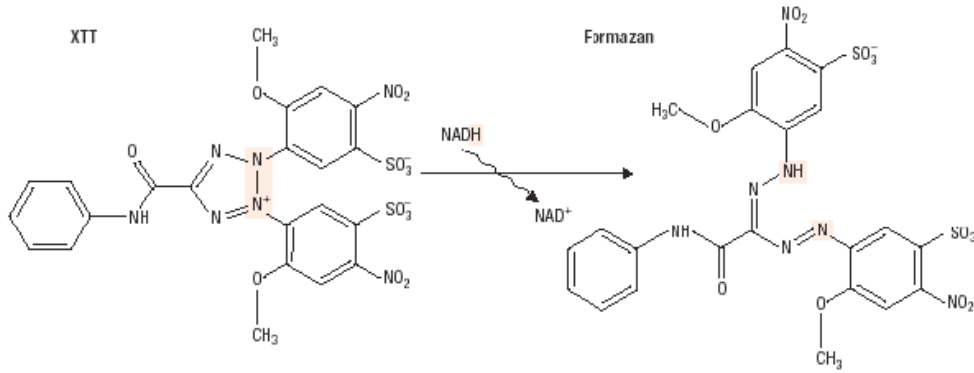
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control	Cell control
B	Ole 100 nM	Ole 50 nM	Ole 25 nM	Ole 10 nM	Ole 5 nM	Ole 2,5 nM	A+ Ole 100 nM	A+ Ole 50 nM	A+ Ole 25 nM	A+ Ole 10 nM	A+ Ole 5 nM	A+ Ole 2,5 nM
C	Ole 100 nM	Ole 50 nM	Ole 25 nM	Ole 10 nM	Ole 5 nM	Ole 2,5 nM	A+ Ole 100 nM	A+ Ole 50 nM	A+ Ole 25 nM	A+ Ole 10 nM	A+ Ole 5 nM	A+ Ole 2,5 nM
D	Ole 100 nM	Ole 50 nM	Ole 25 nM	Ole 10 nM	Ole 5 nM	Ole 2,5 nM	A+ Ole 100 nM	A+ Ole 50 nM	A+ Ole 25 nM	A+ Ole 10 nM	A+ Ole 5 nM	A+ Ole 2,5 nM
E	Ole 100 nM	Ole 50 nM	Ole 25 nM	Ole 10 nM	Ole 5 nM	Ole 2,5 nM	A+ Ole 100 nM	A+ Ole 50 nM	A+ Ole 25 nM	A+ Ole 10 nM	A+ Ole 5 nM	A+ Ole 2,5 nM
F	Ole 100 nM	Ole 50 nM	Ole 25 nM	Ole 10 nM	Ole 5 nM	Ole 2,5 nM	A+ Ole 100 nM	A+ Ole 50 nM	A+ Ole 25 nM	A+ Ole 10 nM	A+ Ole 5 nM	A+ Ole 2,5 nM
G	Ole 100 nM	Ole 50 nM	Ole 25 nM	Ole 10 nM	Ole 5 nM	Ole 2,5 nM	A+ Ole 100 nM	A+ Ole 50 nM	A+ Ole 25 nM	A+ Ole 10 nM	A+ Ole 5 nM	A+ Ole 2,5 nM
H												

Tablo 3-1 96 kuyucuklu platede konsantrasyon dağılımı. (A= Aldosteron, Ole= Oleandrin)

3.1.8 XTT testi:

Tetrozolyum tuzları prensibine dayanan kolorimetrik bir metot olan XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide), proliferasyon ölçümü prosedürünü geniş ölçüde kolaylaştırmıştır. Bu kit hücre proliferasyonun çeşitli büyüme faktörleri ve besin bileşenleri ile ikili olarak ölçümü prensibine dayanmaktadır.

Yöntem Prensipleri: Metabolik olarak aktif olan hücrelerin sarı tetrazolyum tuzu olan XTT'nin turuncu formazan boyasına dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır. Bu dönüşüm sadece canlı hücrelerde meydana gelmektedir. Formazan boyası sulu çözeltilerde çözünebilir ve direk olarak mikropalak okuyucu ile ölçülebilir.



Şekil 3-2 XTT'nin formazana dönüşümü.

Yöntem, 96 kuyucuklu platelerde kültüre edilen hücrelerin, XTT solüsyonuyla 4-24 saat inkübe edilmesi sonucu oluşan turuncu formazan boyasının spektrofotometrik olarak mikropalak okuyucu ile ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir. Kuyucuklardaki canlı hücre sayısı ile mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi arasında doğru orantı vardır. Buna bağlı olarak oluşan turuncu formazan boyası absorpsiyon ile gözlenir.

Bir kardiyak glikozit olan oleandrinin tek başına ve aldosteron ile birlikte uygulanmasının A549 akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesi ve canlılık yüzdeleri "Cell Proliferation Kit" kullanarak XTT testi ve Tripan mavisi boya testi ile belirlenecektir. Bunun için, 96 kuyucuklu plate'ler kullanılarak 24-72 saatlik bir deney düzeneği kurulacaktır.

XTT kit içerisinde, XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) ajanı ve aktivasyon ajanı yer almaktadır. Reaktifler 50/1 XTT ajanı (Labelling reagent)/ aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlanır. XTT bir tetrazolium tuzu olmakla beraber metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondride bulunan dehidrogenaz enzimiyle parçalanarak suda çözünebilir formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılıdır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan turuncu renk yoğunluğuna bağlı olarak, mikropalak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunarak hücre canlılığı belirlenir.

XTT ve Tripan Mavisi Boyası Testi Protokolü:

- 1) 1. günlük deney düzeneği için, hücreye belirlenen farklı ilaç konsantrasyonları uygulandıktan 24 saat sonra, XTT testi için ayrılan kuyucukların her birine hazırlanan

XTT solüsyonundan 50 µL eklenecektir. Madde eklenmesinden yaklaşık 4 saat sonra plate'in her bir kuyucuğunun absorbans değeri (OD) mikropalak okuyucuda 450 nm ve 630 nm dalga boylarında ölçülecektir.

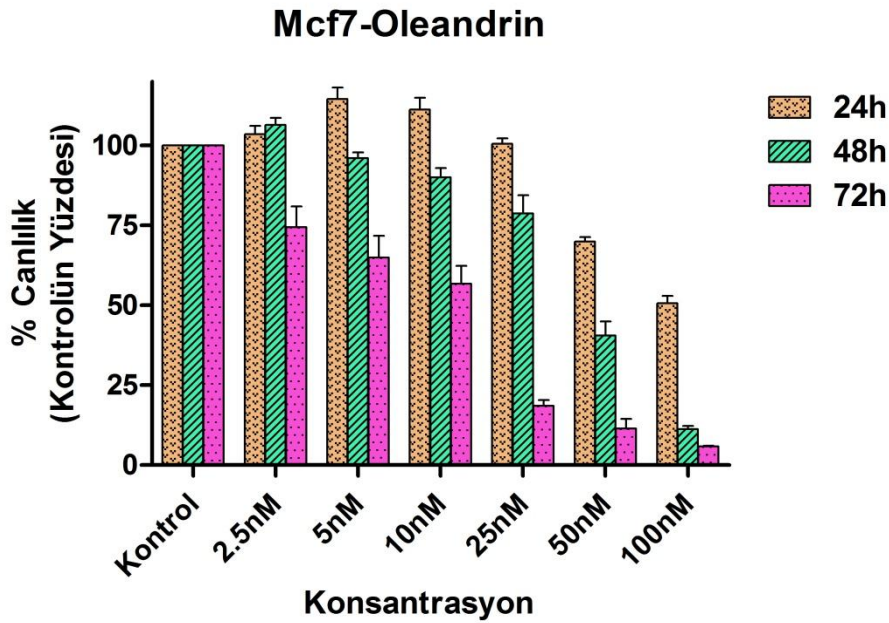
- 2) Aynı işlem, madde verilmesinden 48 ve 72 saat sonra 2. ve 3. günlük plate'ler için tekrarlanacaktır.
- 3) Plate'lerde bulunan tripan mavisi boyası testi için ayrılan kuyucuklarda bulunan serumlu besi ortamı enjektör yardımıyla çekilirken, ortamdaki serumu uzaklaştırmak için 50 µL serumsuz ortam hücrelerin kurumasına izin vermeden kuyucuklara ilave edilecektir. Aynı şekilde serumlu ortam çekilip, 50 µL tripsin ilave edilerek inkübatörde 5 dakika bekletilecektir. Tripsin ile kaldırılan hücrelerin üzerine 100 µL serumlu besiyeri eklenerek hücreler süspansiyon haline getirildi. Süspansiyondan 50 µL alınarak, 50 µL tripan mavisi boyası ile karıştırılıp Neubauer lamında hücre sayımı yapılacaktır.
- 4) XTT testi ve tripan mavisi boya testi sonuçlarına göre, oleandrin ve aldosteron+oleandrinin A549 akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücrelerindeki % canlılık değerleri belirlenecektir.

3.1.9 İstatistiksel Analiz:

Absorbans olarak elde edilen veriler ortalama ve standart hata (Mean±SEM) olarak ifade edilecektir. Ortalamalar arasındaki farkın önemliliği değerlendirilirken ANOVA testi, post-hoc test olarak da Tukey testi kullanılacaktır. Parametrik test varsayımlarının yerine getirilemediği durumlarda ise Kruskal-wallis testi uygulanacaktır. P değerinin 0.05'den küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilecektir.

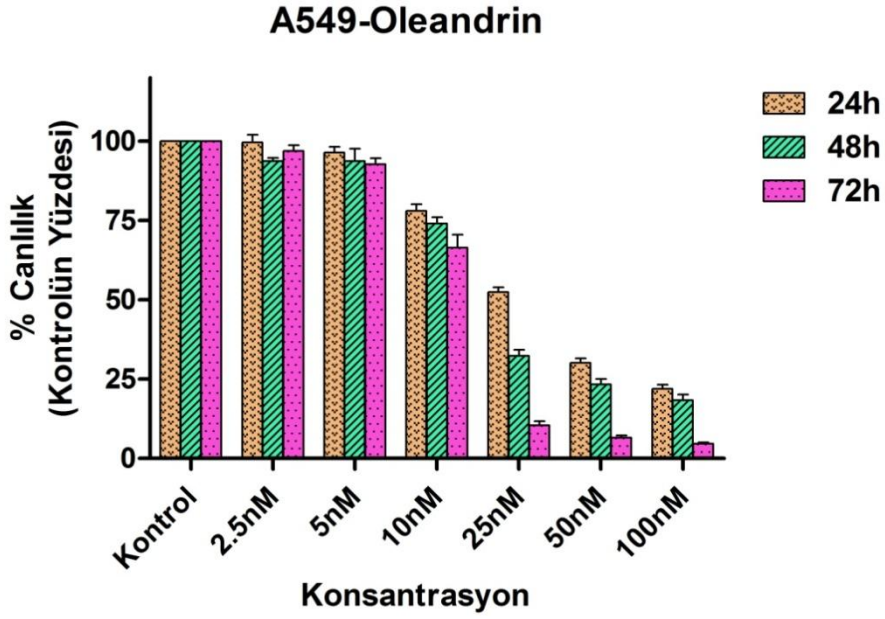
4 SONUÇLAR

Oleandrinin MCF7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla oleandrin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda MCF7 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirildi. Oleandrin 2.5nM konsantrasyonda 24 ve 48. Saatlerde etki göstermezken 72. Saatte istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksosite meydana getirmiştir. Diğer konsantrasyonlarda da oleandrin konsantrasyona bağımlı şekilde bir sitotoksosite meydana getirmiş, oleandrinin uygulanma süresi uzadıkça sitotoksik etkisi de buna paralel şekilde artmıştır.



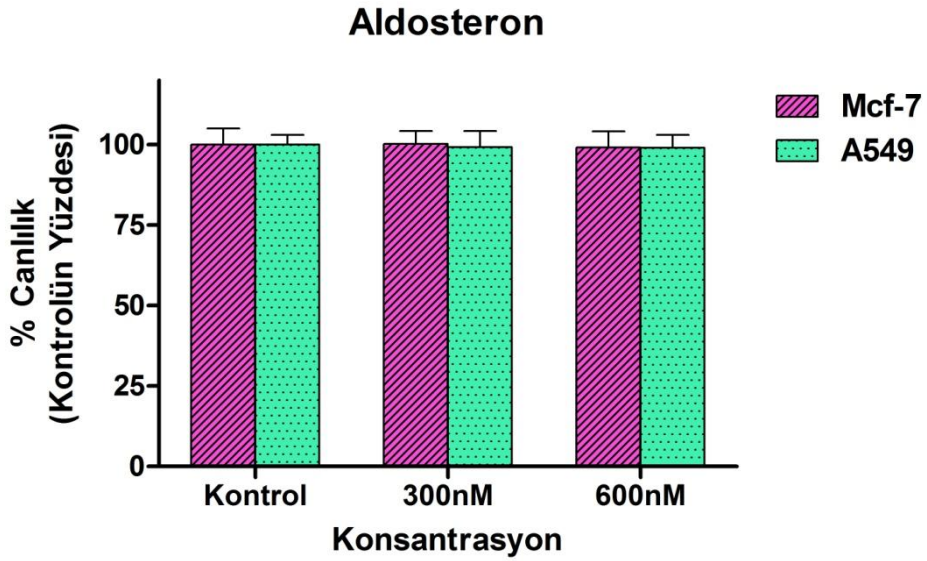
Grafik 4-1: Oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarının MCF7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini 24, 48 ve 72. Saatlerde değerlendirilmesi

Oleandrinin A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla oleandrin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda MCF7 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirildi. Oleandrin 2.5nM konsantrasyonda 24. saatte etki göstermezken 48 ve 72. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksosite meydana getirmiştir. Diğer konsantrasyonlarda da oleandrin konsantrasyona bağımlı şekilde bir sitotoksosite meydana getirmiş, oleandrinin uygulanma süresi uzadıkça sitotoksik etkisi de buna paralel şekilde artmıştır.



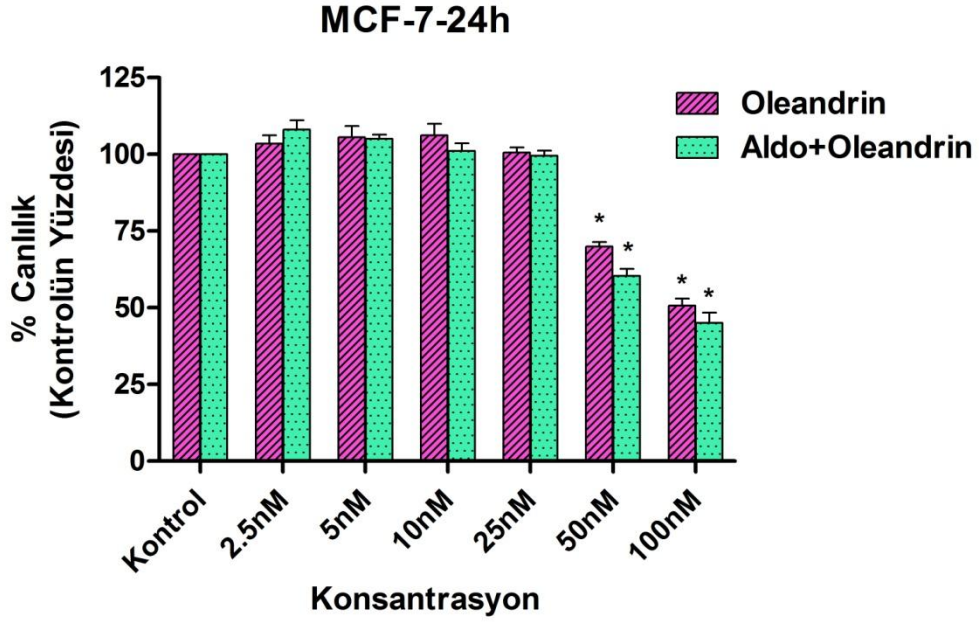
Grafik 4-2: Oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarının A549 küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilmesi

Aldosteronun MCF7 meme kanseri ve A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla aldosteron 300 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda A549 ve MCF7 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 24. Saatte değerlendirildi. 300 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda aldosteron uygulanan hücreler ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.



Grafik 4-3: Aldosteronun 300nM ve 600 nM konsantrasyonlarının A549 küçük hücreli akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin 24 saatte değerlendirilmesi

Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini değerlendirmek için oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonları tek başlarına ve ortamda 300 nM aldosteron varlığında MCF7 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 24 saat sonra değerlendirildi. Oleandrinin 50 nM konsantrasyondan itibaren kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Tek başına oleandrin uygulaması ile aldosteron varlığında oleandrin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

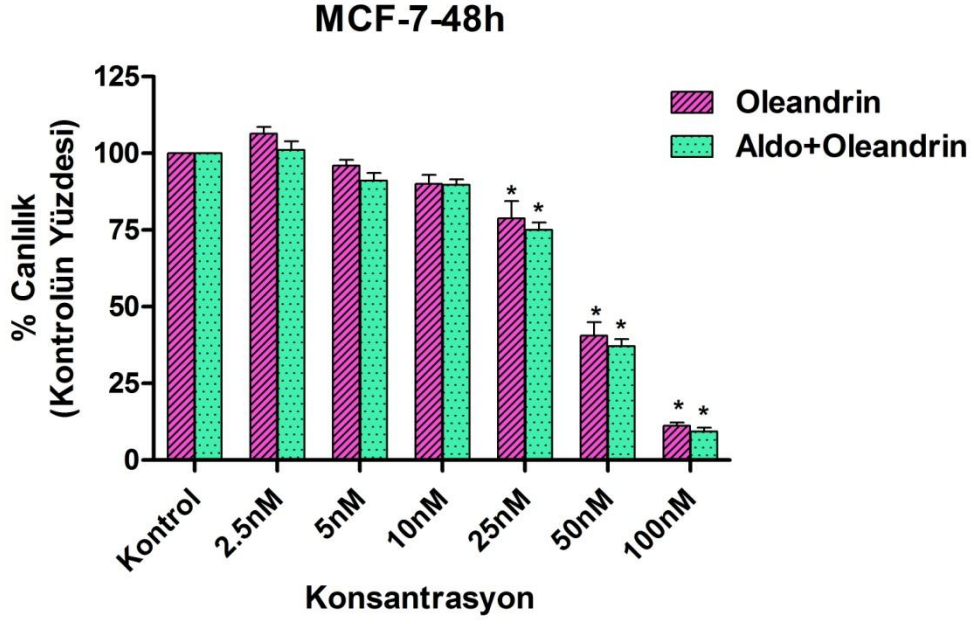


Grafik 4-4: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 24 saatteki değerlendirilmesi¹

¹ *Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı $p < 0.05$

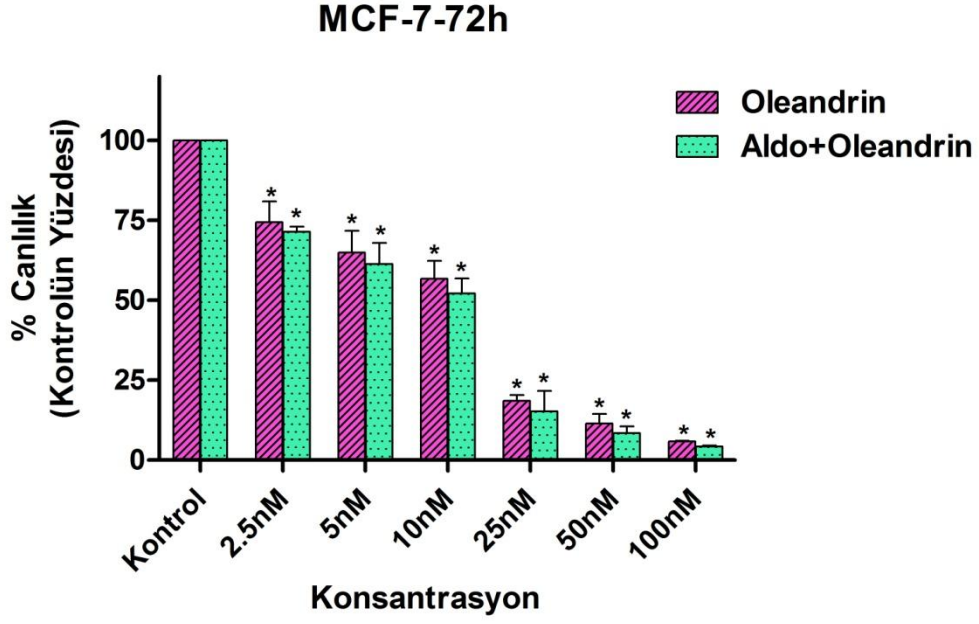
Hem kontrole hem de aynı konsantrasyonda oleandrinin tek başına uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı $p < 0.05$

Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini değerlendirmek için oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonları tek başlarına ve ortamda 300 nM aldosteron varlığında MCF7 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 48 saat sonra değerlendirildi. Oleandrinin 25 nM konsantrasyondan itibaren kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Tek başına oleandrin uygulaması ile aldosteron varlığında oleandrin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.



Grafik 4-5: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 48 saatteki değerlendirilmesi.

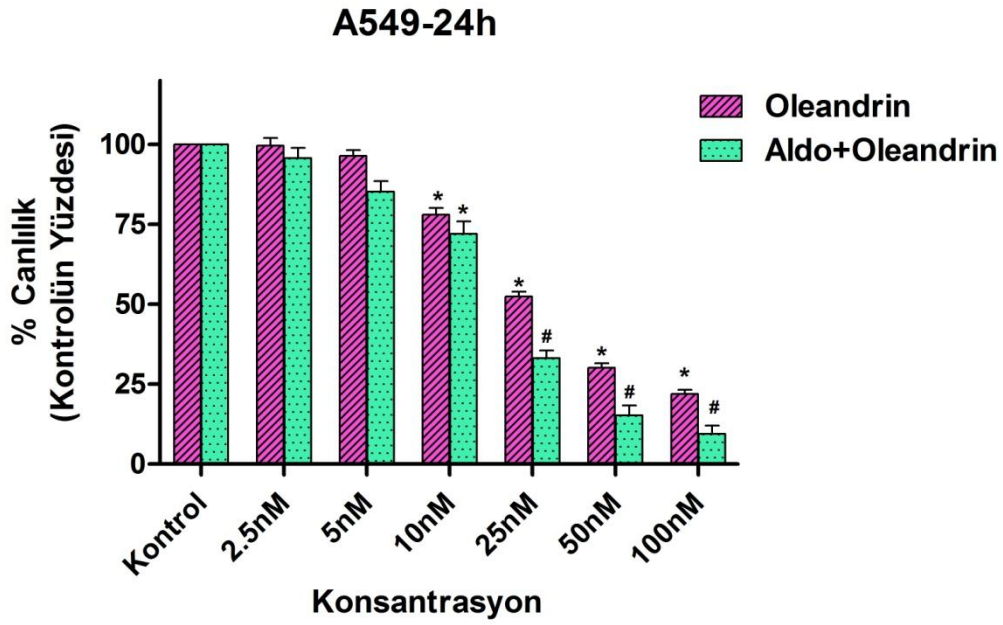
Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini değerlendirmek için oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonları tek başlarına ve ortamda 300 nM aldosteron varlığında MCF7 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 72 saat sonra değerlendirildi. Oleandrinin 2,5 nM konsantrasyondan itibaren kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Tek başına oleandrin uygulaması ile aldosteron varlığında oleandrin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.



Grafik

4-6: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında MCF7 meme kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 72. saatteki değerlendirmesi.

Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini değerlendirmek için oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonları tek başlarına ve ortamda 300 nM aldosteron varlığında A549 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 24 saat sonra değerlendirildi. Oleandrinin 10 nM konsantrasyondan itibaren kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Ortamda aldosteron olması oleandrinin sitotoksik etkisini 25 nM konsantrasyondan itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdı ($p < 0.05$). 10 nM konsantrasyonda ise tek başına oleandrin uygulaması ile aldosteron varlığında oleandrin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.



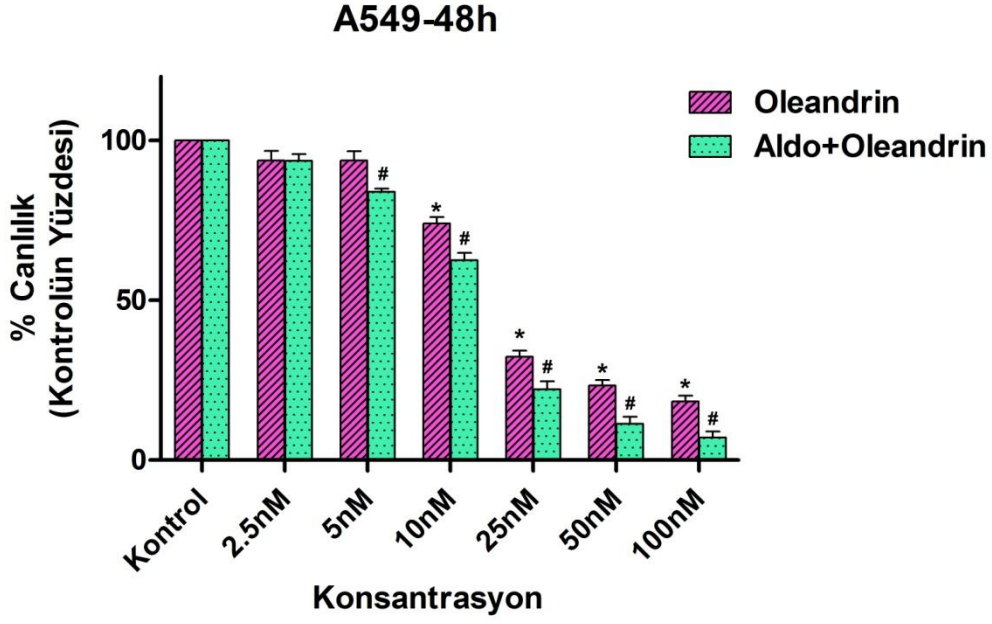
Grafik 4-7: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 24 saatteki değerlendirilmesi.²

*: Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı $p < 0.05$

#: Hem kontrole hem de aynı konsantrasyonda oleandrinin tek başına uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı $p < 0.05$

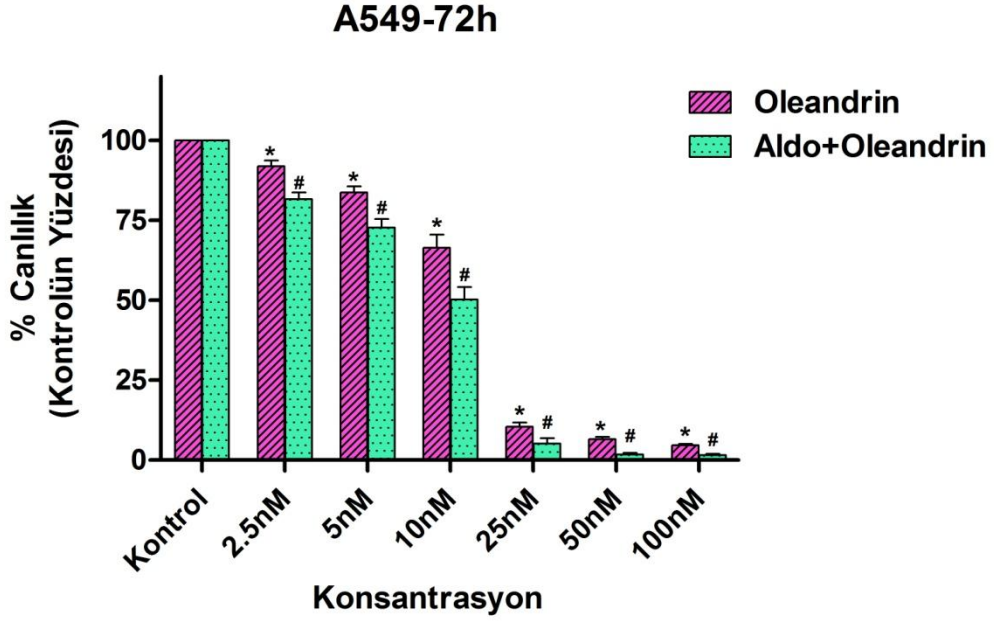
2

Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini değerlendirmek için oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonları tek başlarına ve ortamda 300 nM aldosteron varlığında A549 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 48 saat sonra değerlendirildi. Oleandrinin 2,5 nM konsantrasyondan itibaren kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi ($p<0.05$). Ortamda aldosteron olması ise oleandrinin sitotoksik etkisini 5 nM konsantrasyondan itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdı ($p<0.05$).

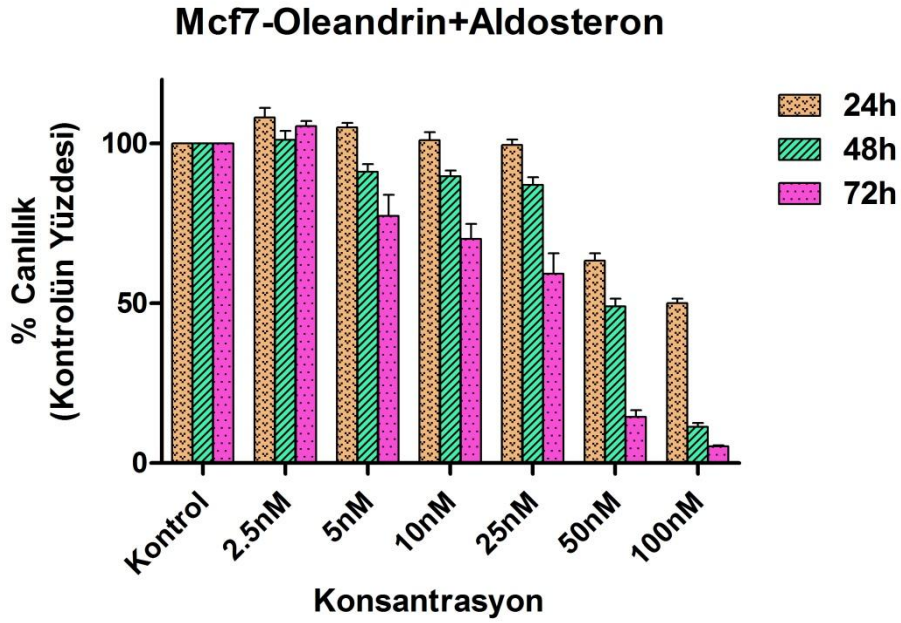


Grafik 4-8: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 48 saatteki değerlendirmesi.

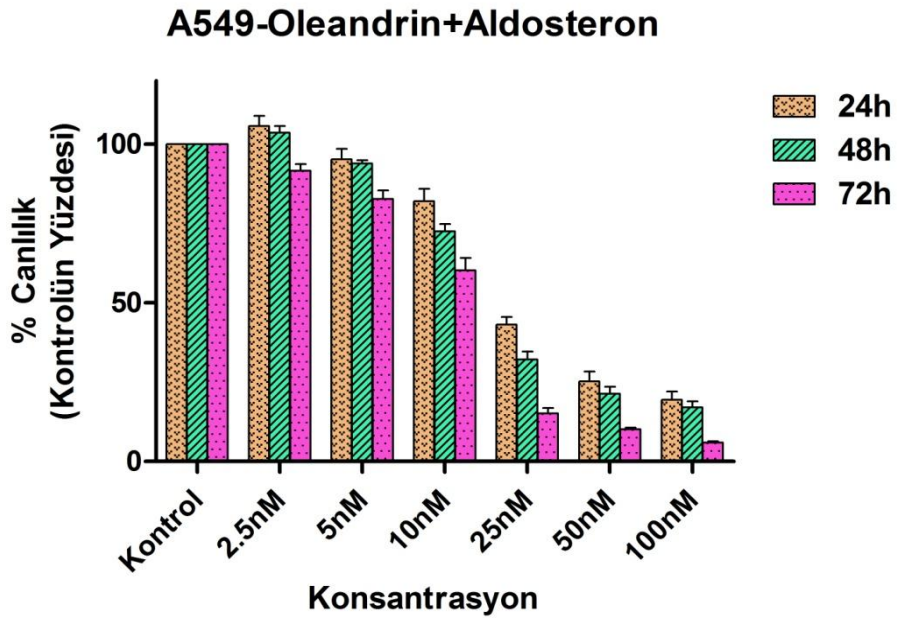
Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 küçük hücreli kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini değerlendirmek için oleandrinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonları tek başlarına ve ortamda 300 nM aldosteron varlığında A549 hücreleri üzerine uygulandı ve sonuçlar 72 saat sonra değerlendirildi. Oleandrinin 10 nM konsantrasyondan itibaren kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Ortamda aldosteron olması ise oleandrinin sitotoksik etkisini 2,5 nM konsantrasyondan itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdı ($p < 0.05$).



Grafik 4-9: Oleandrinin tek başına ve aldosteron varlığında A549 akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda 72 saatteki değerlendirmesi.



Grafik 4-10; Aldosteron varlığında oleandrin uygulamasının MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin 24, 48 ve 72. Saatlerdeki değerlendirilmesinin özet grafiği.



Grafik 4-11; Aldosteron varlığında oleandrin uygulamasının A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin 24, 48 ve 72. Saatlerdeki değerlendirilmesinin özet grafiği.

5 TARTIŞMA

Kanser; hastaya, kanser çeşidine ve kanser safhasına göre her ilaca farklı cevaplar verebilen bir hastalıktır. Bazı kemoterapötik ajanlar kimi hastalarda hiçbir olumlu etki göstermezken kimi hastaları oldukça iyi tedavi ediyor. Bazen de bu kadar iyi tedavi etmesinin yanı sıra hastada ağır yan etkiler de görülüyor. İşte bu nedenlerle hala hem etkili, hem kanserli dokuya spesifik hem de yan etkileri az olabilecek bir kanser ilacı bulma çabaları devam ediyor.

Türk hekimlerinden Opr. Dr. Ziya Özel, Nerium oleander yapraklarından hazırladığı bir sulu ekstraktı kullanarak bazı kanser türlerinde başarılı sonuçlar aldığını belirtmiştir. (Baytop, 1999) (Karaca, 2008) Bu bitkinin uluslararası patenti Amerika Birleşik Devletlerinde anvirzel adı ile alınmıştır (Newman, et al., 2001).

Afag ve arkadaşları Nerium oleander yapraklarından elde edilen oleandrinin anti inflamatuar ve tümör hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda oleandrinin antitümör etkinliğini görmüşlerdir (Afag, Salemm, Aziz, & Mukhtar, 2004).

Newman ve arkadaşları (2007) oleandrinin PANC-1 hücrelerindeki antiproliferatif etkinliğinin adriamisinden 60 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Newman, et al., 2007)

Nerium oleander'den elde edilen ve kardiyokaktif glikozit olan oleandrinin antiproliferatif etkinliğinin hücre içi birçok yolu etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

McConkey ve arkadaşları, oleandrinin prostat kanserinde hücrenin apoptozu sırasında önemli rol oynayan kaspas/kaskad sistemini aktive ettiğini göstermişlerdir. (McConkey DJ, 2000)

Manna ve arkadaşları oleandrinin hücre transkripsiyon faktörü NF- kappaB' nin aktivasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Manna SK, 2000).

Oleandrinin tümör hücresinin proliferasyonu, apoptozisin önlenmesi, metastaz ve tümörlü hücrenin invazyonundan sorumlu olan Akt'nin fosforilasyonunu da inhibe ettiği bildirilmiştir (Raghavendia PB, 2007) (Vivanco I, 2002).

Sreenivasan ve arkadaşları oleandrinin apoptozisi aktive eden Fas/FasL sistemini aktive ettiğini ve böylece hücreyi apoptoza zorlayarak sitotoksik etkinliğini gösterdiğini rapor etmişlerdir (Sreenivasan Y, 2006).

Newman ve arkadaşları oleandrinin insan pankreas kanseri ve melanoma hücreleri üzerindeki apoptotik ve otofajik etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmalarda oleandrinin hücre siklusunun apoptozla alakalı olan G₁ an S döneminde belirgin bir etki göstermediğini ama otofajiyile alakalı olan G₂/M döneminde etki gösterdiğini, 20 nM ve 50 nM konsantrasyonlardaki oleandrinin hücre mitokondrisinde yoğunlaştığı ve zamanla mitokondriyi parçalandığını bildirmişlerdir. (Newman RA, 2006) (Newman, et al., 2007)

Yang P. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, oleandrinin kanser hücrelerinin Na⁺-K⁺-ATPaz alfa 3 izoformuna alfa 1 izoformuna kıyasla daha yüksek oranda bağlandığı ve alfa 3 izoform sentezinin alfa 1 izoform sentezinden fazla olduğu kanser hücrelerinde oleandrinin proliferasyonu daha iyi inhibe ettiği görülmüştür (Yang P, 2009)

Verrey ve arkadaşları aldosteron ile 6-96 saat inkübe edilmiş hücrelerde alfa ve beta altünitelerinin sitoplazmik mRNA' larında ve protein sentezlerinde 2-3 kat artış görmüştür (Verrey, et al., 1987).

Farman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada aldosteronun rat $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz alfa 3 altünitesinin sentezini selektif olarak arttırdığını bildirmektedirler (Ferman, Bonvalet, & Seckl, 1994).

Grillo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise aldosteronun adrenalectomize ratlarda beyindeki $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz alfa 3 ve beta 1 altünitelerinin sentezini arttırdığı görülmüştür (Grillo, Piroli, Lima, McEwen, & Nicola, 1997)

Biz bu çalışmamızda oleandrinin A549 akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücre hatları üzerine olan sitotoksik etkisini, 2,5 , 5, 10, 25, 50, 100 nM konsantrasyonlarda tek başına ve 300 nM konsantrasyondaki aldosteronla 24 saat inkübe edilmiş ortamda 24., 48. ve 72. saatlerde inceledik.

Bizim bu çalışmada amacımız oleandrin'i aldosteron ile birlikte deneyip, böylece $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz alfa 3 altünitesinin sentezini kanserli hücrelerde daha da artırıp, oleandrin'in kanserli hücreler üzerindeki proliferasyonu önleyici etkisini arttırmaktır. Bu çalışmamızla beraber oleandrin ilk defa aldosteronla beraber denenmiş oldu. Yapılan deneylerin sonucunda oleandrinin tek başına A549 akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkinlik gösterdiği, aldosteron varlığında özellikle A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı gözlemlenmiştir ($P<0,05$). Oleandrinin sitotoksik etkinliğinin konsantrasyon ve zamanla doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür.

Aldosteronun oleandrinin sitotoksik etkinliği arttırması A549 akciğer kanseri hücrelerinde MCF7 meme kanseri hücrelerine göre daha iyi gözlenmiştir. Bunun nedeni akciğer dokusunda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz enziminin meme dokusuna göre daha çok bulunması, daha aktif rol alması ya da alfa altünite izoform heterodimerlerinin birbirinden çok farklı olması olabilir. Aldosteron + oleandrin kombinasyonumuz $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz enziminin yoğun ve aktif olarak bulunduğu yerlerde daha çok işe yarar olup $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz enziminin az ve pasif olarak bulunduğu yerlerde daha az işe yarayabilir. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz alfa altünitesi izozimlerinin dokulara dağılımına göre de aldosteron + oleandrin kombinasyonumuza verilecek cevap değişebilir.

Yaptığımız deneylerin başarılı ve umut verici nitelikte olduğu, daha farklı kanser hücreleri üzerine yapılacak farklı konsantrasyon ve sürelerdeki çalışmaların önümüzü daha da aydınlatacağı kanaatindeyiz. Özellikle aldığımız sonuçlara göre akciğer kanserinde oleandrin + aldosteron (veya kanserli hücrelerde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ - ATPaz alfa 3 altünitesinin sentezini arttırabilecek başka ajanların) kombinasyonu bu kanserin tedavisinde yeni bir seçenek olabilir. Elbette bu çalışmaların daha ileri yöntemler ve in vivo çalışmalar ve ilave olarak klinik incelemelerle desteklenmesi gerekmektedir.

6 KAYNAKÇA

(tarih yok). mayıs 2, 2014 tarihinde Wikipedia: <http://de.wikipedia.org/wiki/Oleander> adresinden alındı

(tarih yok). mayıs 2, 2014 tarihinde Nerium Biotech: http://www.neriumbiotech.com/cancer_research.htm# adresinden alındı

(2012, aralık 10). www.kanser.gov.tr. adresinden alınmıştır

Afag, F., Salemm, M., Aziz, M., & Mukhtar, H. (2004). Inhibition of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induces tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by oleandrin. *Toxicology and applied Pharmacology* , 361-369.

American Cancer Society's Guide to Complementary and Alternative cancer Methods. (2001). ISBN 0-944235-29-8.

Baytop, T. (1999). *Türkiyede Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. istanbul: Nobel Tıp Kitap Evi.

Blanco G, D. A. (1994). The subunit of the Na/K ATPase has catalytic activity independent of the subunit. *J Biol Chem* , 269, s. 23420-23425.

Blanco, G. (2005). Na K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue specific ion regulation. *Semin Nephrol* (25), s. 292-303.

Braunwald, E. (1992). *Heart Disease A textbook of Cardiovascular Medicine*. W.B. Saunders Company.

Chow DC, F. J. (1995). Functional significance of the subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J Exp Biol* , 198, s. 1-17.

Elkley, M., Elmoghazy, A., Salem, S., & Karawya, M. (1970). Macro and Micromorphology of Nerium oleander L. Grown in Egypt. *The Steam and Leaf U.A.R.J. Pharm. Sci.* (Cilt 1, s. 123-136). içinde

Ergun, B. (1992, Nisan). Nerium oleander'in bazı suda çözünen bileşiklerinin invitro biyolojik etkisi. Anadolu üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü.

Ewart, H., & Klip, A. (1995). Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol* , 269,295,311.

F Verdonck, e. a. (2003). Intracellular Na⁺ and Altered Na Transport Mechanisms in Cardiac Hypertrophy and Failure. *Jour of Molec and Cell Cardiology* (35), s. 5-25.

Ferman, N., Bonvalet, J., & Seckl, J. (1994). Aldosterone selectively increases Na-K ATPase alpha 3-subunit mRNA expression in rat hippocampus. *Am J Physiol* , 266(2 Pt 1) , C423-8.

Geering, K., Girardet, M., Bron, C., Kraehenbuhl, J., & Rossier, B. (1982). Hormonal regulation of Na-K ATPase biosynthesis in the toad bladder. Effect of aldosterone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J. Biol. Chem.* , 10338-343.

Grillo, C., Piroli, G., Lima, A., McEwen, B., & Nicola, A. D. (1997). Aldosterone up-regulates mRNA for the alpha3 and beta1 isoforms of (Na,K)-ATPase in several brain regions from adrenalectomized rats. *Brain research* , 120-7.

Gustavo Blanco, R. W. (1998). Isozymes of the Na-K ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in finction. *Amc J. Physiol* , 275(5Pt2), F633-f650.

Hartwell, J. (1967). Plants Used Against Cancer. *LLoydia* , 379-410.

- Howland, R. D., & Mycek, M. J. (2009). *Farmakoloji* (3. baskı b.). Baltimore: Lippincotts Illustrated Rewiews.
- Hundal, H., Marette, A., Mitsumoto, Y., Ramlal, T., Blostein, R., & Klip, A. (1992). Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na,K-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* (267), 5040-5043.
- Karaca, T. d. (2008, haziran). İnsan meme kanseri hücre kültüründe nerium oleander bitkisinden elde edilen ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi. sakarya üniversitesi fen bilimleri enstitüsü.
- Kayaalp, O. (2005). *Tıbbi Farmakoloji*. Ankara: Hacettepe -Taş Kitapçılık.
- Kjeldsen, K., Norgaard, A., & Gheorghide, M. (2002). Myocardial Na K-ATPase: the molecular basis for the thermodynamic effect of digoxin therapy in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* (55), 710-3.
- Kumar, A., De, T., Mishra, A., & Mishra, A. K. (2013). Oleandrin: A cardiac glycosides with potent cytotoxicity. *Pharmacogn Rev.* (7), s. 131-139.
- Lingrel JB, K. (1994). Na / K ATPase. *J Biol Chem* (269), s. 19659-19662.
- Lipponen P, A. S. (1994). Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* , 30A(14), s. 2068-73.
- Manna SK, S. N. (2000). Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor kappaB, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res.* (60), s. 3838-3847.
- McConkey DJ, L. Y. (2000). Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res* (60), s. 3807-3812.
- McDonough AA, G. K. (1990). The sodium pump needs its beta subunit,. *Faseb J* , 4, s. 1598-1605.
- Mercer, R. (1993). Structure of the Na,K-ATPase. *Int Rev Cytol* , 137, s. 139-168.
- N Bauer et al, M. J. (2005). Oubain-like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs Effects of Blokade and angiotensin convetring enzyme inhibition. *Hypertension* (45), s. 1024-1028.
- Newman RA, Y. P. (2006). Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. *J Exp TherOncol.* , s. 167-181.
- Newman, R., Cisnero, A., Felix, Vijjeswarapu, M., Lin, Y., Yang, P., et al. (2001). Composition and preliminary Pharmacology Studies with Anvirzel. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* .
- Newman, R., Kondo, Y., Yokoyama, T., Dixon, S., Cartwright, C., Chan, D., et al. (2007). Autophagic Cell Death of Human Pancreatic Tumor Cells Mediated by Oleandrin, a Lipid-Soluble Cardiac Glycoside. *Integrative Cancer Therapies* (6 (4)), 354-364.
- Phys 33 Hemodynamics 1.* (tarih yok). nisan 23, 2014 tarihinde Quizlet web sitesi: www.quizlet.com adresinden alındı

- Raghavendia PB, S. Y. (2007). Oleandrin induces apoptosis in human but not murine cells: dephosphorylation of Akt, expression of FasL and alteration of membrane fluidity. *Mol Immunol* (44), s. 2292-2302.
- Rajasekaran SR, B. S. (2005). Multiple functions of Na K-ATPase in epithelial cells. *Semin Nephrol* (25), s. 328-34.
- Reaves, A. S. (1980). Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid. *Biochem Biophys Res Commun* (95), 1591-1598.
- Rose, A., & Valdes, R. (1994). Understanding the sodium pump and its relevance to disease. *Clin Chem* (40), 1674-1685.
- Siddiqui, S., Siddiqui, B., Begum, S., Hafeez, F., & Kanerocin. (1989). A New Triterpene from the Leaves of Nerium oleander. *Planta med.* , 292-293.
- Sreenivasan Y, R. P. (2006). Oleandrin-mediated expression of Fas potentiates apoptosis in tumor cells. *J Clin Immunol* (26), s. 308-322.
- Sreenivasan, Y., Raghavendra, P., & Manna, S. (2006). oleandrin-mediated expression of fas potentiates apoptosis in tumor cells. *Journal of Clinical Immunology* , 308-310.
- Stryer, L. (1996). *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Summa, V., Mordasini, D., Roger, F., Bens, M., Martin, P.-Y., Vandewalle, A., et al. (2001). Short Term Effect of Aldosterone on Na,K-ATPase Cell Surface Expression in Kidney Collecting Duct Cells. *J. Biol. Chem.* (276), 47087-47093.
- Sweeney, G., & Klip, A. (1998). Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how, *Mol Cell Biochem* (82), 121-133.
- Szabuniewicz, M., McCrady, J., & Camp, B. (1971). Treatment of Experimentally Induced Oleander Poisoning. *Arch. Int. Pharmacodyn.* (189), 12-21.
- Tanker, M., & Tanker, N. (1991). *Farmakognozi* (Cilt 1). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- Therien, A., & al., e. (1997). Tissue Specific distribution and Modulatory role of the subunit of the Na-K ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* , 272(51), 32628-32634.
- Topçu, C. (2006). *Diabetli hastalarda Na/K ATPaz enzimi polimorfizminin araştırılması*. Konya.
- Tripodi, G., & al, e. (1996). Hypertension associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J Clin Invest* , 97, s. 2815-2822.
- Verrey, F., Schaerer, E., Zoerkler, P., Paccolat, M., Geering, K., Kraehenbuhl, J., et al. (1987). Regulation by Aldosterone of NA,K-ATPase mRNAs, Protein Synthesis, and Sodium transport in Cultured Kidney cells. *J. Cell Biol* (104), 1231-1.
- Vivanco I, S. C. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:489-501. *Nat Rev Cancer* (2), s. 489-501.
- Watt, J., & Breyer-Brandwijk, M. (1962). *Medicinal and Poisonous Plants of Southern and eastern Africa*. Edinburg and London: E. and S. Livingstone Ltd.
- World Health Organization. (2004). *The World Health Report*.
- Wyllie AH, K. J. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* , s. 251-306.
- Yang P, M. D. (2009, August). Oleandrin mediated inhibition of human tumor cell proliferation: Importance of Na,K-ATPase alpha subunits as drug targets. *Mol Cancer Ther* , 8, s. 2319-2328.

Yang, P., Cartwright, C., Efueta, E., Hamilton, S., Wistuba, I., Menter, D., et al. (2014, nisan). Cellular location and expression of Na⁺,K⁺ -ATPase alfa subunits affect the anti-proliferative activity of oleandrin. *Mol Carcinog* , s. 253-263.

Zijian Xie, T. C. (2003). Na- K-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. *Molecular Interventions* , 3, s. 157-168.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Hale Nur Yerlikaya
Doğum Yeri ve Tarihi Afyonkarahisar, 29/07/1988
Medeni Hali Evli
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi Sivas Devlet Hastanesi, Eczane Birimi, Sivas
E-posta Adresi halesat88@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Kayseri Fen Lisesi, 2005
Lisans Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2010

İş Tecrübesi

SivasDevlet Hastanesi Eczacı, 2010

Ödüller, Teşvikler ve Üyelikler

AUECZF Hasta Bilgilendirme Yarışması Birinciliği, 2009
AEO Hasta Bilgilendirme Yarışması Türkiye Üçüncülüğü,
2009