

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENSPM İLE PAKLITAKSEL'İN UYARDIĞI APOPTOTİK HÜCRE
ÖLÜMÜNDE POLIAMİN METABOLİZMASI ROLÜNÜN MCF-7 WT VE BCL-
2+ HÜCRELERİNDE GÖSTERİLMESİ

YÜKSEK LİSANS

TEZİ

Zeynep AKYOL

(1109412002)

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ajda ÇOKER-GÜRKAN

Haziran 2014

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik anabilim dalı Kanser Moleküler Biyoloji programında hazırlanan bu Yüksek Lisans tezinde DENSp^m ile paklitakselin uyardığı apoptotik hücre ölümünde PA metabolizması rolünün MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki etkisi incelenmiştir.

İstanbul Kültür Üniversitesi'nde tez çalışmam sebebiyle tanıma fırsatı bulduğum anlayışı, hoşgörüsü, yardım ve katkıları ile beni cesaretlendirip, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a, Yüksek Lisans öğrenimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. Narçin PALAVAN ÜNSAL, Doç. Dr. Elif Damla ARISAN, Yrd. Doç. Dr. Pınar Obakan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvardaki çalışmalarımda bana yardımcı olan; Pelin Özfiliz, Özge Berrak, Deniz Coşkun, Onur Irmak, Çağrı Gümüşkaptan, Esin Güvenir, Halime İlhan, Betsi Köse, Mert Burak Öztürk, Yunus Akkoç ve Utku Özbey'e teşekkür ederim. Yaşamım ve çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, sabırla beni dinleyen ve yol gösteren sevgili Annem, Babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygıdeğer Annem ve Babam'ın Anısına...

Haziran, 2014

Zeynep AKYOL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	xii
SEMBOL LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xvi
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	18
2. GENEL BİLGİLER.....	21
2.1. KANSER	21
2.2. MEME KANSERİ.....	21
2.3. MEME KANSERİ EPIDEMİYOLOJİSİ.....	22
2.4. MEME KANSERİ RISK FAKTÖRLERİ.....	26
2.5. MEME KANSERİ TIPLERİ	29
2.5.1. Duktal Karsinoma	29
2.5.2. Lobular Karsinoma.....	29
2.5.3. İnvaziv (Yayılmacı) Meme Kanseri	30
2.5.4. İnflamatuvar Meme Kanseri.....	31
2.5.5. Tekrarlayan Meme Kanseri	31
2.6. MEME KANSERİ BELİRTİLERİ VE TEŞHİS YÖNTEMLERİ	31
2.7. MEME KANSERİ TEDAVİ YÖNTEMLERİ	33
2.7.A. Cerrahi Tedavi	33
2.7.B. Radyoterapi.....	33
2.7.C. Kemoterapi	34
2.8. MEME KANSERİNDE KULLANILAN KEMOTERAPİK AJANLAR	34

2.8.A. Antrasiklinler.....	34
2.8.B. Siklofosfamid, 5-Florourasil (5-FU), Metoterxate (CMF)	35
2.8.C. Trastuzunab (Herceptin)	36
2.8.D. Taksanlar	36
2.9. PAKLITAKSEL	37
2.10. POLIAMINLER.....	38
2.10.1. Poliamin Türevleri	39
2.10.2. Poliamin Metabolizması	39
2.10.5. Poliaminlerin Hücre Metabolizmasındaki Rollerini	41
2.12. DENSPM (N ₁ N ₁₁ -DIETHYLNORSPERMINE)	42
2.12.1. Kanser tedavisinde DENSPm kullanımı	42
2.11. APOPTOZ	43
2.10.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması	44
2.10.1.1. İnterinsik Yolak	45
2.10.1.2. Ekstrinsik Yolak.....	45
2.13.OTOFAJİ.....	46
3. MALZEME VE YÖNTEM	50
3.1. KULLANILAN MALZEMELER	50
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	50
3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları	50
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	50
3.1.4. Kullanılan Tamponlar	50
3.2. YÖNTEMLER	50
3.2.1. Hücre Kültürü	50
3.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	51
3.2.3. Hücre Sağkalım Tayini.....	51

3.2.4. ELIZA Yöntemi Apoptotik Hücre Ölümü Tayini	52
3.2.5. Propidyum İyodür (PI) boyama	52
3.2.6. 3,3' Diheksiloksakarbosiyanın İyodür (DiOC₆) Boyama	52
3.2.7. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama.....	53
3.2.8. Akridine Turuncusu (AO) Boyaması	53
3.2.9. Monodansil Kadaverin Boyaması.....	53
3.2.10. Lysotracker Kırmızısı Boyaması	53
3.2.11. Hücre Akış Sitometresi ile analiz.....	53
3.2.11.1. <i>PI Boyaması</i>	53
3.2.11.2. <i>Annexin V ve PI Boyaması</i>	54
3.2.12. Total Protein İzolasyonu	54
3.2.13. Bradford Protein Miktar Tayini.....	54
3.2.14. İmmunoblotlama Yöntemi	55
3.2.14.1. <i>Proteinlerin Hazırlanmasıve SDS-PAGE'de Yürütülmesi.....</i>	55
3.2.14.2. <i>Membrana Transfer ve Bloklama.....</i>	55
3.2.14.3. <i>Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri.....</i>	55
3.2.14.4. <i>Bantların Görüntülenmesi.....</i>	56
3.2.15. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini.....	56
3.2.16. MCF-7 hücrelerinde SSAT gen anlatımının Plazmit Aracılığı ile Arttırılması	57
3.2.16.A. <i>SSAT geni içeren Plazmitlerin Çoğaltılması</i>	57
3.2.16.B. <i>Transformasyon.....</i>	57
3.2.16.C. <i>SSAT geni içeren Plazmitlerin İzolasyonu (Miniprep kit).....</i>	58
3.2.16.D. <i>MCF-7 hücrelerine SSAT geni içeren Plazmitlerin Transfeksiyonu</i>	58
3.2.17. İstatiksel Analiz	58
4. BULGULAR.....	59

4.1. MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI	59
4.2. DENSPM VE PAKLITAKSELİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2 + HÜCRELERİNDE GÖSTERİLMESİ.....	59
4.3. DENSPM VE PAKLITAKSELİN HÜCRE SAĞ KALIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	61
4.4. DENSPM VE PAKLITAKSELİN MCF-7 WT VE MCF7 BCL-2+ HÜCRELERİNDEKİ HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN PI BOYAMASI İLE GÖSTERİLMESİ.....	62
4.5. ZAMANA BAĞLI DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	64
4.6. DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİNDEKİ DNA KIRIKLARININ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	68
4.7. DENSPM VE PAKLITAKSELİN ZAMANA BAĞLI UYGULAMASININ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ÖLÜM ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ.....	70
4.8. DENSPM VE PAKLITAKSELİN ZAMANA BAĞLI MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ MITOKONDRIYAL MEMBRAN POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	74
4.9. DENSPM VE PAKLITAKSELDEN KAYNAKLI APOPTOTİK ÖLÜMDE BCL-2 AİLESİ ÜYELERİNİN ROLÜNÜN GÖSTERİLMESİ... 77	77
4.10. DENSPM İLE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ OTOFAJİK VAKUOL OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	79
4.11. DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASI İLE UYARILAN ASIDIK VAKUOL OLUŞUMLARININ OTOFAJİK BOYALAR İLE GÖSTERİLMESİ.....	80
4.12. DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ ZAMANA BAĞLI OLARAK OTOFAJİK YOLAK ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ.....	83

4.13. DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ ROS ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN DCFH-DA BOYAMASI İLE GÖSTERİLMESİ	86
4.14. DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİ POLİAMİN HAVUZU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	88
4.15. SSAT ANLATIMI PLAZMIT ARACILIĞI İLE ARTTIRILAN MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİNDE DENSPM VE PAKLITAKSELİN ETKİSİNİN İRDELENMESİ.....	90
4.16. SSAT ANLATIMININ PLAZMIT ARACILIĞIYLA ARTTIRILMASI İLE DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİ HÜCRE ÖLÜMÜNÜN PI BOYAMASI İLE GÖSTERİLMESİ.....	91
4.17. SSAT ANLATIMININ PLAZMIT ARACILIĞIYLA ARTTIRILMASI İLE DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİNDE APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN ANNEXIN/PI BOYAMASI İLE GÖSTERİLMESİ	93
4.18. SSAT ANLATIMININ PLAZMIT ARACILIĞIYLA ARTTIRILMASI İLE DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİNDE HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN HÜCRE AKIŞ SITOMETRESİ İLE GÖSTERİLMESİ	95
4.19. SSAT ANLATIMININ PLAZMIT ARACILIĞIYLA ARTTIRILMASI İLE DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİNDE APOPTOTİK BELİRTEÇLER VE SSAT ANLATIMI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ.....	97
4.20. SSAT ANLATIMININ PLAZMIT ARACILIĞIYLA ARTTIRILMASI İLE DENSPM VE PAKLITAKSEL UYGULAMASININ MCF-7 WT VE MCF-7 BCL-2+ HÜCRELERİNDEKİ PA SEVİYELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	98
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	99
EKLER.....	105

Çözeltiler	108
<i>Hücre Özütleme Tamponu (1 L).....</i>	<i>108</i>
<i>0.5 M EDTA (pH 8) (1 L).....</i>	<i>108</i>
<i>1 M Tris (pH 9) (1 L).....</i>	<i>109</i>
<i>1 M Tris (pH 8) (1 L).....</i>	<i>109</i>
<i>10 M Amonyum Asetat.....</i>	<i>109</i>
<i>50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Elektroforez Tamponu (1 L).....</i>	<i>109</i>
<i>Poliakrilamit Jel Elektroforez Tamponu (1 L).....</i>	<i>109</i>
<i>1X PBS (Fosfat Tamponu)</i>	<i>110</i>
<i>%20 SDS (w/v) (100 ml).....</i>	<i>110</i>
<i>6X DNA Jel Yükleme Tamponu</i>	<i>110</i>
<i>Özütleme Tamponu</i>	<i>110</i>
<i>% 10 APS (1ml).....</i>	<i>110</i>
<i>Coomassie Blue (500 ml)</i>	<i>111</i>
<i>Ponceau Red (% 0,1) (100 ml).....</i>	<i>111</i>
<i>ECL Solüsyonu.....</i>	<i>111</i>
<i>10x Transfer Tamponu (pH 8,3) (1 L)</i>	<i>111</i>
<i>10x TBS (pH 7,6) (1 L).....</i>	<i>112</i>
<i>1X TBS-Tween Hazırlanışı</i>	<i>112</i>
<i>Yürütme tamponunun Hazırlanışı</i>	<i>112</i>
<i>Transfer Tamponunun Hazırlanışı</i>	<i>112</i>
<i>Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması</i>	<i>112</i>
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ.....	119

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. Dünyada kanser vakalarının erkeklerde görülme ve ölüm oranlarının ülkelere göre dağılımı [2].....	22
Şekil 1. Meme Kanseri Profili [1].....	22
Şekil 3. Dünyada kanser vakalarının kadınlarda görülme ve ölüm oranlarının ülkelere göre dağılımı [2].....	23
Şekil 4. Yaşa bağlı meme kanseri görülme durumunun coğrafik olarak dağılımı [2].	24
Şekil 5. Meme kanseri hastalığının 2002 yılında görülme oranları ve ölüm oranlarının ülkelere göre dağılımı [2].	26
Şekil 6. Duktal kanserin gösterimi [30].	29
Şekil 7. Lobular kanserin görünümü [35].	30
Şekil 8. İnvaziv kanserin gösterimi [36].	31
Şekil 9. Antrasiklinler'in A) Kimyasal yapısının gösterimi. B) DNA ve RNA üzerindeki etkisinin gösterimi [50].	35
Şekil 10. 5-FloroUrasil'in etki mekanizması. A) 5-FU'in kimyasal yapısı, B) 5-FU'in antikanser aktivitesi. TS: timidilat sentaz, IFN: interferon [51].	35
Şekil 11. Herceptin ilacının etki mekanizması [54].	36
Şekil 12. Taksanlar'ın etki mekanizması [58].	37
Şekil 13. Paklitaksel ilacının elde edilmesi ve kimyasal yapısı [59].	37
Şekil 14. Taksol'ün etki mekanizması [6].	38
Şekil 15. Poliamin türevlerinin kimyasal yapısı [63].	39
Şekil 16. Poliamin metabolizması [71].	40
Şekil 17. Apoptotik süreç [92].	44
Şekil 18. İntersik (iç yolak) ve ekstersik(dış yolak) apoptoz mekanizma [98].	46
Şekil 19. Otofajik sürecin gelişim basamakları [111].	49
Şekil 20. MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinin morfolojik yapısının ışık mikroskopunda gösterimi (Büyütme: 20x).	59
Şekil 21. Paklitaksel uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. Paklitaksel (20, 30, 40 nM) A) 24 ve B) 48 saat boyunca uygulaması. (* p<0,05,** p<0,001).	60
Şekil 22. DENSp _m ve paklitaksel uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. Paklitaksel (30 nM) ve DENSp _m (20 µM) A) 24 ve B) 48 saat boyunca	

uygulanmıştır. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$) (K: Kontrol, D: DENSPm, P: Paklitaksel, D+P: DENSPm + Paklitaksel).....	61
Şekil 23. DENSPm ve paklitaksel'in hücre çoğalması üzerine etkisi. A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine DENSPm (20 μ M) ve paklitaksel (30 nM) uygulanarak zamana bağlı olarak inkübe edilmiştir (24-96 saat). Her 24 saatte hücreler tripsin ile kaldırılmış, sayılmıştır. (K: kontrol, D: DENSPm, P: Paklitaksel, D+P: DENSPm + Paklitaksel).....	62
Şekil 24. DENSPm ve Paklitakselin zamana bağlı hücre ölümü üzerine etkisinin A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2 hücrelerinde Propidium İodide (PI) boyaması ile gösterimi.....	63
Şekil 25. DENSPm ve paklitakselin 24 saat uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde hücre döngüsü üzerine ket vurucu etkisinin A) Hücre akış sitometresi ve B) İmmünoablota yöntemi ile gösterilmesi.	65
Şekil 26. DENSPm ve paklitakselin 48 saat uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde hücre döngüsü üzerine ket vurucu etkisinin A) Hücre akış sitometresi ve B) İmmünoablota yöntemi ile gösterilmesi.	67
Şekil 27. DAPI boyaması ile DENSPm ve paklitaksel'in zamana bağlı DNA kondenzasyonu üzerine etkisinin gösterimi. A) MCF-7 wt B) MCF-7 Bcl-2+ (Büyütme: 20-40x).....	69
Şekil 28. DENSPm ve paklitaksel'in 24 saat uygulamasının apoptotic ölüm üzerine etkisinin gösterimi. A) Hücre Akış Sitometresi, B) ELİZA testi, C) İmmünoablota.	71
Şekil 29. DENSPm ve paklitaksel 48 saat uygulamasının apoptoz üzerine etkisinin gösterimi. A) Hücre Akış Sitometresi, B) ELİZA testi, C) İmmünoablota.....	73
Şekil 30. DENSPm ve paklitaksel uygulamasının 24 saatte zamana bağlı mitokondriyal membran potansiyeli ve Kaspaz 7 ile Apaf-1 anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi. A) Floresan mikroskopu, B) Florometrik analiz ve C) İmmünoablota yöntemi.	75
Şekil 31. DENSPm ve paklitaksel uygulamasının 48 saatte zamana bağlı mitokondriyal membran potansiyeli ve Kaspaz 7 ile Apaf-1 anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi. A) Floresan mikroskopunda gösterilmesi B) Florometrik analiz ve C) İmmünoablota yöntemi.....	76

Şekil 32. DENSPm ve Paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının pro-apoptotik protein anlatımları üzerine etkisinin gösterimi.	77
Şekil 33. DENSPm ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının anti-apoptotik protein anlatımlarının üzerine etkisinin gösterimi.	78
Şekil 34. DENSPm ve paklitakselin 24 ve 48 saat boyunca uygulamasının hücrelerin morfolojisi üzerine etkisinin ışık mikroskobu ile gösterimi. A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2+ (Büyütme: 40x).	79
Şekil 35. DENSPm ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının lizozomlar gibi asidik vakuollerin üzerine etkisinin Akridin Turuncusu (AO) boyaması ile gösterimi. A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2+ (Büyütme: 20x-40x).	81
Şekil 36. DENSPm ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının otofajik vakuoller üzerine etkisinin MDC boyaması ile gösterimi. A) MCF-7 wt B) MCF-7 Bcl-2+ hücreleri görüntülendi (Büyütme: 20x-40x).	82
Şekil 37. DENSPm ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının asidik vakuollerin üzerine etkisinin Lyso Traker kırmızı boyaması ile gösterimi. A) MCF-7 wt B) MCF-7 Bcl-2+ hücreleri görüntülendi (Büyütme: 20x-40x).	83
Şekil 38. DENSPm ve paklitakselin 24 saat uygulamasının otofajik yolak protein anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi.	84
Şekil 39. DENSPm ve paklitakselin 48 saat uygulamasının otofajik yolak protein anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi.	85
Şekil 40. DENSPm ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin DCFH-DA boyaması ile floresan mikroskobunda gösterilmesi.	86
Şekil 41. DENSPm ve paklitakselin 24 saat uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin DCFH-DA boyaması ile hücre akış sitometresinde gösterilmesi.	87
Şekil 42. DENSPm ve paklitakselin 24 saat uygulamasının hücre içi PA üzerine etkisinin gösterilmesi. A) İlaça bağlı hücre içi PA havuzunda meydana gelen değişiklik HPLC ile analiz edilmiş, B) PA metabolizmasında rol alan enzimleri anlatımındaki değişiklik ise immünoblotlama ile irdelenmiştir.	88
Şekil 43. DENSPm ve paklitakselin 48 saat uygulamasının hücre içi PA üzerine etkisinin gösterilmesi. A) İlaça bağlı hücre içi PA havuzundaki değişiklik HPLC ile analiz edilmiş, B) PA metabolizmasında rol alan enzimleri anlatımındaki değişiklik ise immünoblotlama ile irdelenmiştir.	89

Şekil 44. DENSPm ve paklitaksel ile birlikte SSAT plazmiti uygulamasının A) MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi B) SSAT gen anlatımının immunoblotlama ile gösterilmesi.	91
Şekil 45. DENSPm ve paklitakselin ve SSAT geninin MCF-7 wt ve MCF7 Bcl-2+ hücrelerindeki hücre ölümü üzerindeki etkisinin PI boyaması ile gösterilmesi.	92
Şekil 46. SSAT geni içeren plazmit aktarılan MCF-7 wt ve MCF7 Bcl-2+ hücrelerindeki DENSPm ve paklitakselin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin/PI boyaması ile hücre akış sitometresinde gösterilmesi.	94
Şekil 47. SSAT geni içeren plazmit aktarılan MCF-7 wt ve MCF7 Bcl-2+ hücrelerinde 48 saat DENSPm ve paklitakselinin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin/PI boyaması ile hücre akış sitometresinde gösterilmesi.	96
Şekil 48. DENSPm, paklitaksel ve SSAT plazmiti aktarılan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki apoptotik belirteçler ve SSAT anlatımının üzerindeki etkisinin immünoblotlama ile gösterilmesi.	97
Şekil 49. DENSPm, Paklitaksel uygulamasının SSAT plazmiti aktarılan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki PA havuzu üzerindeki etkisinin HPLC analizi ile gösterilmesi.	98

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 2002 yılında yapılan çalışmada Türkiye’de en çok görülen kanser türlerinden ilk beşinin insidansı gösterilmiştir [17].	25
Tablo 2. Türkiye’deki kadınlarda meme kanseri hastalığına bağlı ölümlerin yaş gruplarına göre dağılımı [18]	25
Tablo 3. Meme kanseri risk faktörleri.....	27
Tablo 4. Kullanılan cihazların listesi	105
Tablo 5. Hücre kültürü donanımları.....	106
Tablo 6. Kullanılan kimyasalların listesi	106
Tablo 7. %12’lik SDS-PAGE Jel İçeriği	108

SEMBOL LİSTESİ

5-FU	:	5-Florourasil
AdoMet	:	S-Adenozilmetionin
AdoMetDC/ SAMDC	:	S-Adenozinemetiyonin Dekarboksilaz
AIF	:	Apoptoz indükleyici faktör
AO	:	Akridine Oranj
APAF-1	:	Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü-1
APAO	:	Asetil Poliamin Oksidaz
APS	:	Ammonum Persulfat
AR	:	Androjen Reseptörü
Atg	:	Otofaji İlişkili Protein
ATP	:	Adenozintrifosfat
AZ	:	Antizimler
AZI	:	Antizim inhibitörü
Bcl-2	:	B-hücre lenfoma 2
BENSpm	:	Bis(etil)norspermin
BH	:	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BRCA	:	Breast Cancer Geni
BSA	:	Sığır Serum Albumin
CDK	:	Sikline Bağımlı Kinaz
CHENSpm	:	Sikloheptilmetil-diazaundekan
CO₂	:	Karbondioksit
DAPI	:	4,6-diamidino-2-fenilindol
dcAdoMet	:	Dekarboksile AdoMet
DCIS	:	Ductal Carcinoma in situ
DENSpm	:	N1 N11- diethylnorspermin
DFMO	:	Difluorometilornitin
DiOC-6	:	3,3'-diheksiloksakarbosiyenin iyodür
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGFR	:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

ELİZA	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ER	:	Östrojen Reseptörü
FADD	:	Fas ilişkili ölüm proteini
FAP	:	Ailesel adenomatöz polip
FU	:	Fluorourasil
GTP	:	Guanin Trifosfat
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
HER 2	:	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü
HPLC	:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
iNOS	:	İndüklenebilen Nitrik Oksit Sintaz
kDa	:	Kilo Dalton
KKMM	:	Kendi Kendine Meme Muayenesi yapılması
KMM	:	Klinik Meme Muayenesi yapılması
LB	:	L-Broth
MAPK	:	Mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz
MBI	:	Moleküler Meme Kanseri Görüntülenmesi
MDC	:	Monodansilkadaverin
MDL 72,527	:	N1, N4-bis (butadenil)-1,4-diaminobutan
MTT	:	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sintaz
NSAID	:	Steroid kökenli olmayan anti-inflamatuar ajan
OAZ	:	ODC Antizim
ODC	:	Ornitin Dekarboksilaz
PA	:	Poliamin
PAO	:	Poliamin Oksidaz
PARP	:	Poliadenozin difosfat Riboz Polimeraz
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi
PI	:	Propidium İyodür
PVDF	:	Polyvinilideneflurorit
RIP	:	Reseptör Etkileşim Proteini
ROS	:	Reaktif Oksijen Türevleri
SAMDC	:	S-adenosylmethionine dekarboksilaz

SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMO	:	Spermin Oksidaz
SOC	:	Super Optimal Broth
SSAT	:	Spermidin Spermin N-asetiltransferaz
TBS	:	Tris Tamponlu Tuz çözeltisi
TCA	:	Trikloroasetik Asit
TEMED	:	Tetrametiletildiamin
TNF	:	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR-1	:	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
TRAIL	:	TNF ile ilişkisi apoptoz indükleyici ligand
YT	:	Lysogeny broth

ÖZET

Dünyada ve ülkemizdeki kanser vakaları arasında en sık görülen meme kanseri cerrahi, radyoterapi, hormon tedavisi ve kemoterapi gibi yöntemler ile tedavi edilmektedir. Ancak meme kanseri tedavisinde en büyük engel ilaca direnç mekanizmasının ortaya çıkması nedeni ile yeni kombine tedavi yöntemlerinin ve ilaç etki mekanizmalarının çözülmesi önem arz etmektedir. Paklitaksel birçok kanser türünde ve metastatik meme kanserinde tek başına kullanılan ve taksol türevi olan kemoterapötik bir ajandır. Hücre bölünmesi, farklılaşma ve malin proliferasyon ile ilişkili olduğu bilinen Poliaminler (PA) amin türevli polikasyonlardır. Poliamin analogu olan DENSPm'in hücre içi poliaminlerin miktarını düşürerek hücre bölünmesini durdurduğu ve apoptotik ölümü indüklediği kolon, melanoma, prostat ve meme kanserinde gösterilmiştir. Bu tez ile meme kanseri model hücre hattı olan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinde, DENSPm ve Paklitaksel kombine terapinin otofajik-apoptotik ölüm mekanizmaları üzerine etkisinde poliamin metabolizmasının rolünün irdelenmesi hedeflenmiştir.

Paklitaksel ve DENSPm'in kombine terapisinin zamana bağlı uygulamasının hücre canlılığını azaltarak, kaspazları aktive ettiği, PARP kesilimini indükleyerek apoptotik ölüme neden olduğu ve bu etkinin zamana bağlı artış gösterdiği MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir. Ancak Bcl-2 yüksek miktarda anlatımı görülen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ise ilaca bağlı apoptotik etkinin 48. saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir. İlaçlara karşı direncin otofajik vakuol oluşumuna bağlı otofajik süreci uyarabilme durumu tespit edilmiştir. Ayrıca poliamin katabolik yolağının DENSPm'e bağlı aktive olması sonucu hücre içi poliamin miktarının düşmesi yolu ile hücre ölümünü indüklediği MCF-7 hücrelerinde belirlenmiştir. Ek olarak, poliamin katabolik enzimi SSAT'nin plazmit aracılığı ile anlatımı arttırılarak ilaçlara karşı oluşan direnç mekanizması kırılabildiği belirlenmiştir.

SUMMARY

Breast cancer, the most common cancer type all around the world and also in our country, is treated by surgery, radiotherapy, hormonal and chemotherapy. New combined drug treatments and their molecular machinery are become an important to overcome the drug resistance which was known to be major handicap during breast cancer treatments. Paclitaxel, a taxol derived chemotherapeutic agent, is used in various cancer types and metastatic breast cancer cases. Polyamines (PAs), are amine-derived polycations, are known to take role in cell division, differentiation and malignant proliferation. DENSp_m, a PAs analogue, was determined to arrest cell cycle and induced apoptotic cell death via PA depletion in various cancer cells such as colon, melanoma, prostate and breast cancer cells. In this thesis, our aim is to investigate the role of polyamine metabolism in DENSp_m and Paclitaxel induced apoptotic-autophagy cell death mechanism in MCF-7 wt and Bcl-2⁺ breast cancer cells.

We determined that DENSp_m and paclitaxel combined treatment decreases cell viability, induced apoptotic cell death by caspase activation and PARP cleavage in time-dependent manner in MCF-7 breast cancer cells. However, drug induced apoptotic cell death was observed following 48 hour drug treatment in MCF-7 Bcl2 overexpressed breast cancer cells. Moreover, we established that resistant profile against drugs might induced by autophagy regulation in breast cancer cells. DENSp_m induced apoptotic cell death in MCF-7 cells by depletion of PA levels due to PA catabolic enzymes activation was also determined. In addition, PA catabolic enzyme; SSAT overexpression by plasmid transfection was demonstrated to overcome the drug induced resistant profile in breast cancer cells.

1. GİRİŞ

Dünyada görülme sıklığı her geçen yıl artan ve batı toplumlarında 8 kadından birinde görülen [2] meme kanseri, ülkemizde akciğer kanserinden sonra 2. sırada görülen kanser tiplerindedir. Meme kanseri; meme dokusundaki hücrelerin farklılaşması ve kontrolsüz büyümesi sonucu lokal gelişen tümör oluşumu ve/veya tümörün diğer dokulara metastaz yapması durumudur. Meme kanseri; yaş, sigara kullanımı, fertil-çağ süresi, sosyo-ekonomik çevrenin etkileri gibi pek çok çevresel ve genetik faktörünün etkisi altında gelişim gösteren bir kanserdir. Meme kanseri risk faktörlerinin başında östrojen hormonunun etkin olduğu bilinmektedir [3]. Ayrıca meme kanseri gelişiminde tüm diğer malin durumlardaki gibi hücrelerin kontrolsüz büyüme ve gelişimine katılan hücresel yollarda rol alan ve anlatımında artış görülen proto-onkogenler'in rol aldığı belirlenmiştir.

Meme kanseri tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları kullanılmaktadır. Meme kanserinin tedavisinde klinikte kullanılan kemoterapik ajanlar; Antrasiklin, siklofosamid, 5-Florourasil (5-FU), Metatersate (CMF), herceptin ve taksanlar grubunda doksitaksel ve paklitaksel'dir. Paklitaksel birçok kanser türünde ve metastatik meme kanserinde tek başına kullanılan aktif bir tedavi ajanı olarak gösterilse de optimum ilaç dozu ve tedavinin uygulanış şekli halen tartışılmaktadır [4],5]. Paklitaksel hücrelerin mikrotübüllerinin beta tübulin alt gruplarına bağlanarak tübüllerin tübülilere dönüşmesini ve mitoz bölünmesi sırasında oluşan iğ ipliklerinin yıkımını engellediği ve hücre bölünmesini durdurduğu bilinmektedir [6].

Poliaminler (PA), kanser hücreleri gibi hızla bölünüp çoğalan hücreler tarafından fazla miktarda sentezlenen organik katyonlardır. PA hücrelerin büyümesi ve hücre farklılaşması için gerekli moleküllerdir [7]. Meme kanseri hücrelerinde normal hücrelere oranla hücre içi PA miktarının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Anti-neoplastik tedavi kapsamında hücre içi PA miktarının düşmesini sağlayarak hücre bölünmesine ket vuran çeşitli PA analogları tasarlanmış ve etkinlikleri çeşitli kanser hücrelerinde irdelenmiştir. Bir PA analogu olan DENSp_m (N1 N11-diethylnorspermine) prostat, kolon, melanoma, meme kanseri gibi pek çok kanser tipinde PA katabolik yolağı aktive ederek, hücre içi PA seviyesini düşürerek hücre bölünmesine ket vurduğu, hücre proliferasyonunu engellediği ve apoptotik ölüme

götürdüğü tespit edilmiştir. DENSPm'in *in vitro* denemelerde kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin *in vivo* uygulamalara göre daha etkili olması nedeni ile DENSPm ile beraber kombine ilaç tedavilerinin etkinliğine başvurulmuştur. DENSPm ile beraber 5-FU, oxalaplatin, cisplatin gibi kemoterapötik ilaçların beraber uygulaması kolon kanseri ve servikal kanseri tedavilerinde umut vaadedici sonuçlar vermiştir. Özellikle ilaca direnç mekanizmasının üstesinden gelinmesi için yeni kemoterapötik ilaç kombinasyonları meme kanseri dahil pek çok kanser tipinin tedavi edilmesinde irdelenmektedir.

Anti-apoptotik özelliğe sahip olan Bcl-2 proteini, pro-apoptotik proteinleri engelleyerek apoptozu önleyen hücre canlılığı ile ilişkili bir moleküldür. Aşırı Bcl-2 ifade edilmesinin hücre içinde ilaca direnç mekanizmasının ortaya çıkmasına neden olduğu ve apoptotik ölümü engellediği bilinmektedir. Programlı hücre ölümü olarak da ifade edilen apoptotik hücre ölümü; ölüm uyarılarına karşı hücrenin iç ve dış yolağı adı verilen iki ayrı mekanizma aracılığı ile gerçekleştirdiği ölümdür. Ölüm reseptörleri aktive olarak kaspaz-2, 8 gibi enzimatik özellikteki moleküllerin aktive olması ile dış apoptotik ölüm yolağı aktive olarak hücreyi ölüme yönlendirir. İç apoptotik yolağı ise mitokondri membran potansiyelinin düşmesine bağlı sitokrom c molekülünün sitoplazmaya çıkıp, Apaf-1 ve kaspaz-3, -9 aktif apoptozomik kompleks oluşturması sonucu PARP kesilimi ile sonlanan iç apoptotik ölüm yolağıdır. Ayrıca son yıllarda ikinci tip ölüm olarak ifade edilen Bcl-2 proteininde ilişkili olduğu otofajik ölüm tespit edilmiştir. Otofaji, besin açlığı, enflamasyon, metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi etkilerin altında hücrenin yaşlanmış veya zarar görmüş organelleri içeren sitoplazmik içeriğin etrafının membran ile çevrelenmesi sonucu oluşan ve otofagozom olarak bilinen vakuol oluşumunun, devam eden ortam şartına bağlı artış göstermesi ve lizozom ile otofagozomun birleşmesi sonucu otolizozom oluşumu ile vakuol içindeki yapıların degrades olması sürecidir [8],[9]. Ancak devam eden ortam uyarılarına maruz kalma ve son dönem çeşitli kemoterapötik ilaçların etkisi altında otofajik yolağın uyarıldığı ve apoptotik ölümün önünde engel oluşturduğu tespit edilerek ilaca direnç mekanizmasında önem arz ettiği gösterilmiştir. Devam eden kemoterapötik sürecin zamana bağlı otofajik sürecin ölüme karşı koruyucu etkisinin yerini apoptotik ölüme bıraktığı bazı ilaç etki mekanizmalarında görülen bir süreçtir. Ancak bazı çalışmalara göre bu süreçte otofajik uyarının ölüme neden olduğu da

ifade edilerek otofaji ikinci tip ölüm olarak gösterilmektedir. Henüz, literatürde paklitaksel ile DENSpm kombine olarak meme kanseri hücrelerine uygulanmasına bağlı apoptotik-otofaji süreci ve Bcl-2 aşırı ifade eden meme kanserinde ilaca direnç mekanizması ve bunun kırılmasına dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tezin amacı; meme kanseri model hücre hattı olan MCF-7 ve MCF-7 Bcl-2+ olan meme kanseri hücrelerinde, DENSpm ve paklitakselin zamana bağlı olarak otofajik-apoptotik mekanizmasının PA metabolizması hedef alınarak irdelenmesi hedeflenmiştir.

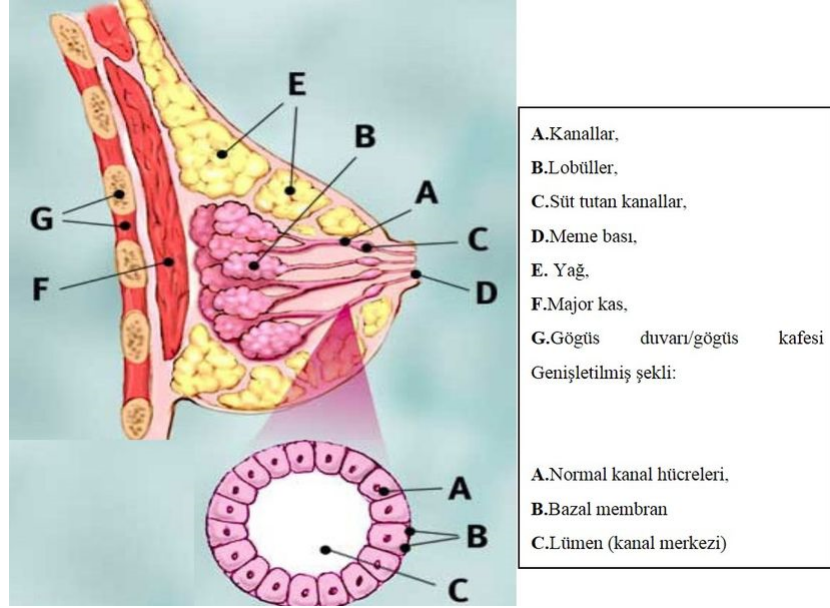
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Dünyada yaklaşık olarak her yıl 6 milyondan fazla insanın kanserden öldüğü ve günümüzde dünya çapında 22 milyondan fazla kanser hastası bulunduğu ifade edilmektedir. Kanser, ekonomik bakımdan gelişmiş ülkelerde birinci sırada ve gelişmekte olan ülkelerde ikinci sıradaki ölüm sebebi olarak gösterilmektedir. Latince yengeç anlamına gelen ve ‘*crab*’ sözcüğünden türetilmiş olan kanser vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu meydana gelen hücresel farklılaşma olarak tanımlanmaktadır [10]. Homoestaz durumunda kas ve sinir hücreleri hariç vücut hücreleri sınırlı bölünebilme yeteneğine sahip olsalarda çeşitli etki ve etkenlerin kontrolünde anormal şekilde büyümeye ve çoğalmaya başlayarak tümör adı verilen kitle oluşumuna yol açtıkları tespit edilmiştir. Gelişen tümör oluşumları konumlandıkları veya köken aldıkları dokuya göre sınıflandırılmıştır. Epitel hücrelerinden kökenlenen tümör oluşumlarını karsinom, kemik, kas gibi mezoderm hücrelerinden türevlenenlere sarkom, salgı dokularından meydana gelenlere ise adenokarsinom olarak isimlendirilmektedirler [11]. Tümör içindeki kanser hücreleri konumlandıkları bölgelerden kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine ulaşır ve ulaştıkları alanlarda yeni tümör kolonileri oluşturup büyüyerek metastaz adı verilen kanserin yayılmasına neden olurlar. Kanser gelişiminin görüldüğü dokuya göre kanser tipleri akciğer, meme, kolon, prostat, pankreas, mide kanseri gibi sınıflandırılmaktadırlar [12].

2.2. Meme Kanseri

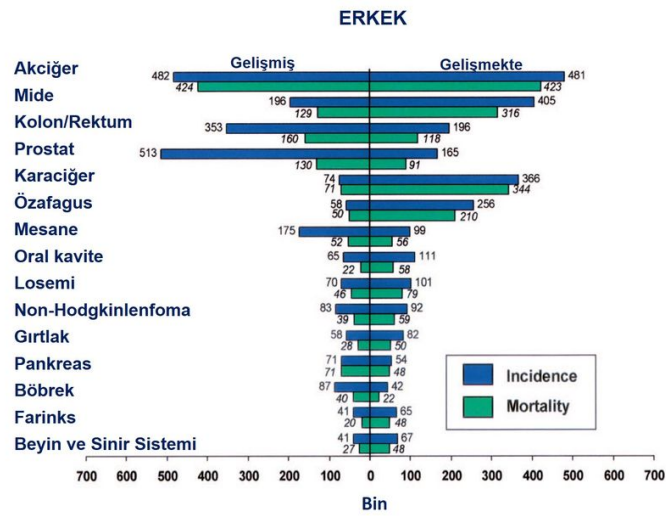
Tüm dünyada meme kanseri kadınlar arasında görülen kanser tiplerinden 1. sırada, ülkemizde ise 2. sırada görülen kanser tipidir. Meme kanserinin genelde süt bezlerinde, süt kanallarında ve lobüllerdeki hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile geliştiği belirlenmiştir. Ancak meme bezinin yağ ve fibröz doku bakımından zengin olan stromal dokularında daha az sıklıkta meme kanseri geliştiği ifade edilmiştir [1] (Şekil 1).



Şekil 1. Meme Kanseri Profili [1]

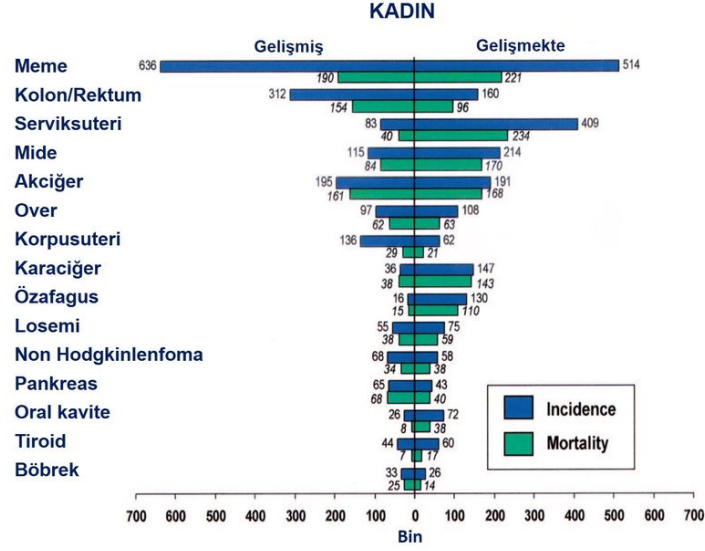
2.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kanser hastalığının görülme sıklığı ve ölüm oranlarının cinsiyete göre dağılışı incelendiğinde, erkeklerde en çok akciğer ve mide kanseri, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserinin fazla olduğu görülmektedir. Dünya çapında meme kanseri kadınlarda görülen kanser türlerinden ikinci sırada yer aldığı erkeklerde ise en fazla akciğer kanserinin meydana geldiği tespit edilmiştir [2] (Şekil 2).



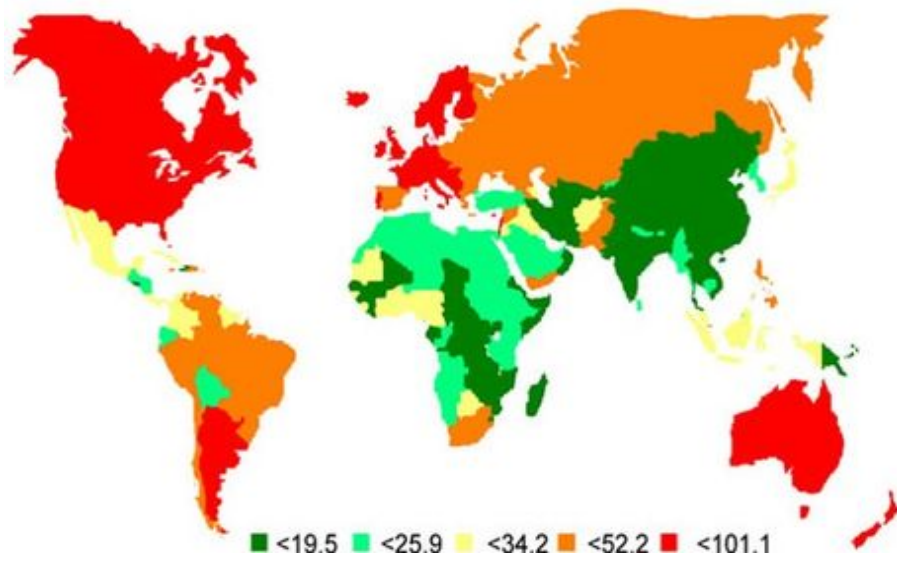
Şekil 2. Dünyada kanser vakalarının erkeklerde görülme ve ölüm oranlarının ülkelere göre dağılımı [2].

Global anlamda, meme kanseri kadınlarda en yaygın kanser çeşidi olduğu ve her yıl 1,1 milyondan fazla kadında tespit edildiği belirlenmiştir. Kadınlarda teşhis edilen kanser tiplerinden % 23'ünü meme kanseri oluşturduğu ifade edilmektedir [2] (Şekil 3).



Şekil 3. Dünyada kanser vakalarının kadınlarda görülme ve ölüm oranlarının ülkelere göre dağılımı [2].

Amerika kanser topluluğunun yaptığı bir istatistiğe göre % 26 oranında kadınların meme kanseri hastalığına yakalandığı ve bu vakaların % 15'inde de meme kanseri hastalığından dolayı ölümlerin meydana geldiği tespit edilmiştir. 2002 yılında 100.000 kişi ile çalışılarak yaşa bağlı olarak meme kanserine yakalanan hastalarının dünyada coğrafik olarak dağılımına göre Kuzey ve Güney Amerika ve Avustralya'da 100 yaş üzerindeki, ülkemizde ise 25 yaş üzerindeki kadınlarda meydana geldiği gösterilmiştir [16](Şekil 4).



Şekil 4. Yaşa bağlı meme kanseri görülme durumunun coğrafik olarak dağılımı [2].

Meme kanseri hastalığı kaynaklı olarak her yıl 411.000 ölüm meydana gelmekte bu tüm nedenlerden kaynaklanan kadın ölümlerinin %1.6'sını oluşturmaktadır olduğu belirlenmiştir. 2001-2004 yılları arasında kadınlarda meme kanseri insidansının her yıl %3.5 oranında azalmaya başladığı saptanmıştır [13]. Mamografi kullanımı sonrası geciken ilaç tedavisinin azalması ve postmenopozal kadınlarda hormon tedavisinin bu alandaki düşüş nedeni olarak gösterilmiştir [13],[14]. Meme kanserinin kadınlarda genellikle 20'li yaşlarda düşük oranda görüldüğü, 30'lu yaşlardan menopoza kadar olan dönemde ise meme kanseri riskinin arttığı ve menopozdan sonrasında daha yüksek oranda artış olduğu ifade edilmektedir [15].

Türkiye'nin farklı bölgelerinde 2000'li yıllarda meme kanseri dağılımının coğrafik, ekonomik, sosyal ve kültürel faktörlere bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Türkiye'nin batısında meme kanseri görülme sıklığı, doğu bölgelerine oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizin Doğu bölgelerinde ise 20/100.000, batı bölgelerinde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığında olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'de en sık rastlanılan kanserler içinde ikinci sırada meme kanserinin olduğu belirlenmiştir [17] (Tablo 1).

Tablo 1. 2002 yılında yapılan çalışmada Türkiye’de en çok görülen kanser türlerinden ilk beşinin insidansı gösterilmiştir [17].

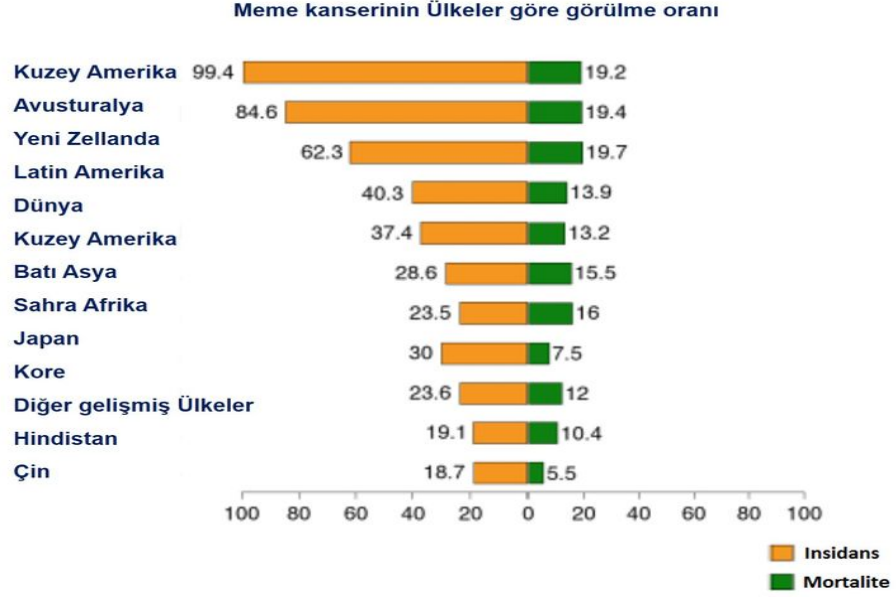
Organlar	Olgu Sayısı	Yüzde (%)	İnsidans* (100.000)
Akciğer	7802	15.26	11.26
Meme	5400	10.9	7.79
Mide	3407	6.88	4.92
Deri	3150	6.36	4.55
Mesane	2535	5.12	3.66
Diğer	27253	55	39.32
Toplam	49547	100	71.49

Türkiye’de meme kanserine bağlı ölüm oranları da incelendiğinde 45-64 yaş aralığında ölüm oranının arttığı belirlenmiş ve 70-74 yaşları arasında ise en sık olarak görüldüğü tespit edilmiştir [18] (Tablo 2).

Tablo 2. Türkiye’deki kadınlarda meme kanseri hastalığına bağlı ölümlerin yaş gruplarına göre dağılımı [18]

Yaş Grubu	Bildirilen Ölüm Sayısı	%
15-24	4	0.4
25-34	44	4.1
35-44	163	15.4
45-54	287	27.1
55-64	231	21.8
65-74	188	17.8
75+	142	13.4
Toplam	1059	100

Meme kanserinde en yüksek insidans oranı; Kuzey Avrupa, Güney Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zellanda, Avusturalya, Güney Amerika’nın güneyindeki ülkelerde, özellikle Urugay ve Arjantin’de tespit edilmiştir [2] (Şekil 5).



Şekil 5. Meme kanseri hastalığının 2002 yılında görülme oranları ve ölüm oranlarının ülkelere göre dağılımı [2].

Ülkemizde meme kanserinin kadınlarda en sık ölüme neden olan 20 hastalık içinde % 2,1' lik oranla 8. sırada yer aldığı bilinmektedir. Dünyada yaşa bağımlı olarak çevresel faktörler, genetik yatkınlık, aile hikayesi, yaşam stili, hormon kullanımı meme kanseri riskini belirleyen en önemli faktörler olarak tanımlandığı belirtilmiş ama ülkemizde meme kanseri insidansı ve risk faktörlerinin belirlemeye yönelik çalışmaların sayısının çok az olduğu ve kısıtlı sayıda hasta kullanılarak yapıldığı belirtilmiştir [19].

2.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri risk faktörleri arasında aile hikayesi, genetik yatkınlık, geç menopoz dönemi, radyasyon, pestisitlere maruz kalma, uzun süre oral ilaç alımı, Meme kanseri risk faktörü (BRCA1, BRCA2) genlerinde mutasyon olduğu tespit edilmiştir [16]. Meme kanseri risk faktörü olarak ifade edilen BRCA moleküllerinde tespit edilen mutasyonların meme kanseri ile ilişkisi olduğu belirlenmiştir [20]. BRCA1 geninin 1990 yılında 17. kromozom üzerinde q12-21 loküsünde yerleştiği belirlenmiştir. BRCA1 geni 24 eksondan oluşur ve 1,863 amino asit içeren bir protein kodlanmaktadır [21]. BRCA1 geni ailevi meme kanseri vakalarının % 45'inden meme ve over kanserinin birlikte olduğu vakalarda ise % 90'ından sorumludur. BRCA2 geni 13.kromozomun q12-13 loküsünde 1994 yılında tespit

edilmiştir [21]. BRCA2 geni geniş bir gen olup 27 eksondan oluşur ve 3418 amino asit içeren bir protein kodlamaktadır [21]. Ailevi meme kanseri vakalarının %35'inden sorumludur. Meme kanseri BRCA1 geni 17. kromozomun q21 kolundaki, BRCA2 geni ise 13. kromozomun q12 kolundaki mutasyonu ve 9. kromozomun p21 kolundaki CDK-2'nin yerleştiği bölgenin mutasyonu sonucu meydana gelmiştir [16]. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin proteinleri hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı proteinler ile DNA hasarına ve tamirine katılan proteinlerin transkripsiyonun düzenlenmesinde, hücre siklusunun kontrol noktalarında önemli bir proteinler olduğu tespit edilmiştir [20, 22] (Tablo 3).

Tablo 3. Meme kanseri risk faktörleri.

Risk faktörü	Açıklama	Kaynak
Kişisel Meme Kanseri Görülmesi	Önceden meme kanseri geçiren ve tedavi olan kadınların, tekrar eden meme kanseri gelişme olasılığının meme kanseri teşhisi konulmamış kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olması	[1, 23]
Ailede Meme Kanseri Görülme Durumu	Aile bireyleri arasında meme kanseri hastalığına yakalanan varsa, ailedeki diğer kadınların meme kanserine yakalanma olasılığını da artırır. Bilhassa kız kardeşi veya annesi meme kanseri hastalığına yakalanan bir kadında meme kanserine yakalanma riski, diğer kadınlara oranla 2 ile 5 kat oranında daha fazla olması	[24]
Yaş Faktörü	İlerleyen yaşlarda meme kanseri hastalığı daha çok görülmektedir. Meme kanseri tanısı konan kadınların % 70'inin yaşının 50 yaş ve üzerinde olduğu belirlenmiş ve yaşı 50 yaş ve üzerinde olan kadınların meme kanseri görülme sıklığının, yaşı 50 yaşın altında olan kadınlara nazaran 4 kat daha fazla olduğu saptanması	[25]
Fertil Çağ Süresi	Kadınların daha uzun süre östrojen hormonun etkisi altında kalması meme kanserinin gelişme riskini arttırdığı saptanmıştır. Fertil çağın uzun sürmesi de östrojen hormonunun etkisini arttırdığını belirlenmesi	[24]
Daha Önce Meme Biyopsisi Yapılmış Olması	Memesinde kitle şüphesi ile gelen hastaların memelerindeki kitlelerin biyopsisi yapılmış ve iyi huylu bir tümör saptanması	[26]
Doğurganlık Durumu	Kadınlarda çocuk sahibi olma yaşı da kanser durumunu	[23]

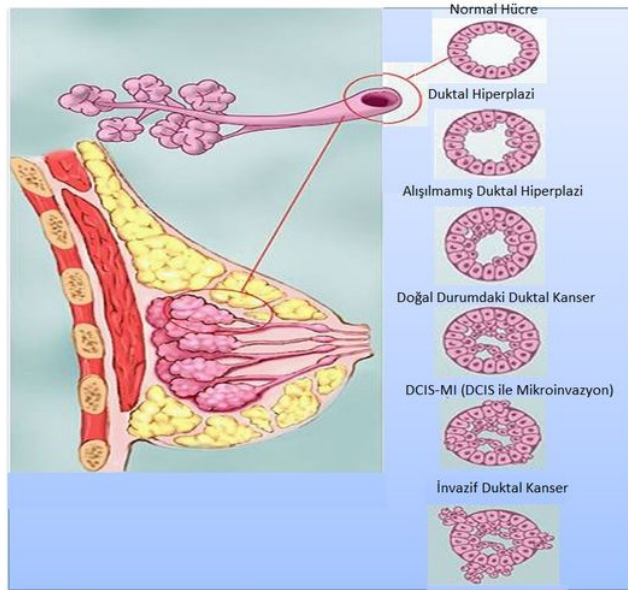
	etkilemektedir. Bu bilgiye dayanarak; ilk çocuğunu doğurma yaşı meme kanserine yakalanma açısından önemlidir. İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuranlarda meme kanseri görülme oranı 20 yaşından önce doğuranlara göre 2 kat daha fazladır. Hiç çocuk doğurmayan kadınlarda ise bu risk daha da yükselir.	
Sosyo-Ekonomik Seviyenin Yüksekliği	Sosyo-ekonomik düzeyi yüksek olan kadınlarda, meme kanseri görülme sıklığı daha fazladır. Ekonomik durumu iyi olan ailelerde beslenmeden kaynaklanan kız çocukları fertil çağ dönemine daha erken girmektedirler. Geç yaşta evlenmeleri ve geç yaşta çocuk sahibi olmaları da meme kanseri riskini arttırmaktadır.	[23, 24]
Östrojen Alınması	Menopoz sebebiyle uzun süre (10 yıldan fazla) östrojen tedavisi gören kadınlarda meme kanseri hastalığının görülme riskinin arttığı bilinmektedir.	[27]
Doğum Kontrol Hapı Kullanılması	Doğum kontrol ilaçları ile ilgili farklı görüşler belirtilmiştir. Doğum kontrol haplarının meme kanseri hastalığı riskini arttırdığı belirtilmiştir. Bir görüşe göre de 10 yıl önce doğum kontrol hapı kullanmayı bırakmış olan kadınlarda bu riskin tamamen ortadan kalktığı ifade edilmektedir.	[27, 28]
Şişmanlık ve Yağlı Beslenme	Yapılan çalışmalarda şişmanlığın özellikle 50 yaş ve üzerindeki kadınlarda meme kanseri hastalığına yakalanma riskini yükselttiği bilinmektedir.	[29]
Siğara ve Alkol Kullanımı	Alkol kullanımıyla ilgili net bir sonuç bilinmemekle birlikte alkol kullanan kadınlarda meme kanserine yakalanma riskinin arttığı ifade edilmektedir. Sigara ise genel anlamıyla sağlığa olumsuz etkigösterdiğinden risk faktörü olabileceğine dair değerlendirme yapılmaktadır.	[1, 27, 29]
Diğer Faktörler	Kişilerin yetersiz fizik aktivite yapması, beyaz ırktan olması, göğüs bölgelerinin yoğun radyasyona maruz kalması, bebeklerin emzirilmemesi, rahim ve yumurtalık kanseri geçirilmesi, kırmızı et yönünden zengin beslenme alışkanlığı, uygun pişirme yöntemlerinin kullanılmaması meme kanserine sebep olan faktörler olarak belirlenmiştir.	[27]

2.5. Meme Kanseri Tipleri

Meme kanseri, damarlar, süt kanalları, lobüller ve bazı durumlarda da aradaki dokular gibi memenin farklı bölgelerinde başlayabileceği, farklı bölgelerde başlayan kanserlerden farklı karakteristik özellik gösterebileceği belirlenmiştir [30]. Meme Kanseri; Duktal Karsinoma, Lobüler Karsinoma, İnvaziv Karsinoma, İnflamatuvar karsinoma, Tekrarlayan meme kanseri tiplerine ayrılmıştır.

2.5.1. Duktal Karsinoma

Duktal meme kanserleri genellikle sütü meme ucuna taşıyan süt kanallarında görülmekte ve meme kanserlerinin % 85-90'ı görüldüğü bölgede olarak ifade edilmiştir. Duktal kanser türü meme kanserinin erken formu olarak tespit edilen ve genetik mutasyonlar sonucu gelişen meme kanseri tipi olarak düşünülmektedir [31]. Duktal meme kanseri tiplerinde Duktal karsinoma in situ (DCIS) yayılma özelliğine sahip olmayan ve radyasyon tedavisiyle başarılı bir şekilde tedavi edilebilecek bir meme kanseri tipi olduğu tespit edilmiştir [30](Şekil 6).

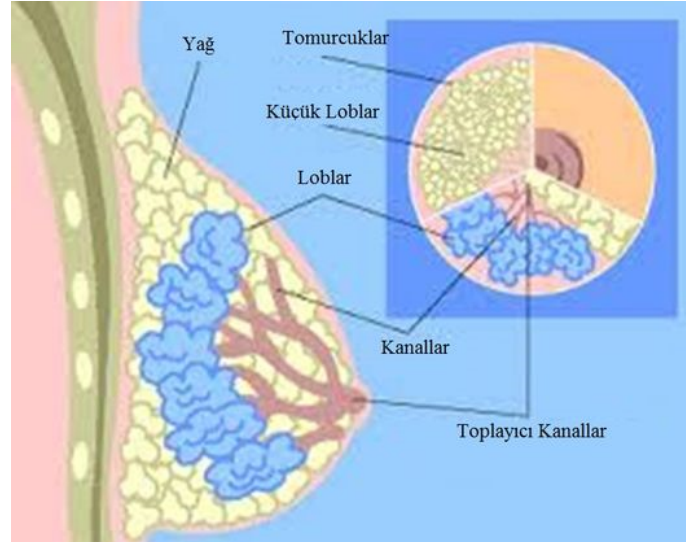


Şekil 6. Duktal kanserin gösterimi [30].

2.5.2. Lobular Karsinoma

Lobular karsinoma insidansı meme kanserinin % 1 - % 20 sıklıkla görüldüğü tespit edilmiştir [32, 33]. Bu tür meme kanseri memede süt üretimini sağlayan bezlerde veya lobüllerde başladığı ifade edilmiştir. Lobüller memenin derin bir

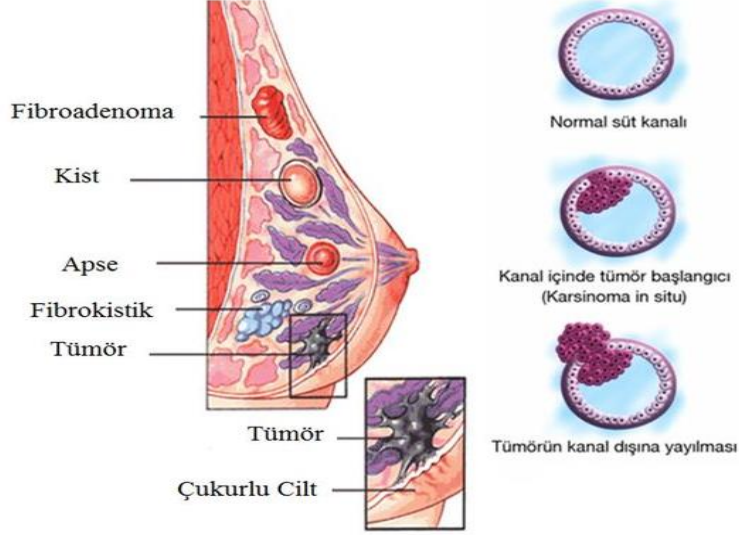
bölgesinde bulunan lobuler meme kanserinin % 8'ini oluşturmakta iken invaziv lobüler karsinoma sık görülen invaziv kanserler arasında ikinci sırada olduğu belirtilmiştir. Lobuler meme kanserinin artması hormon tedavisi kullanımında artmasına sebep olduğu bilinmektedir. İnsanlardaki yaş artışıyla beraber daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir. Kemoterapi ve hormon tedavisi bu türün hastaların % 32-53 hastada kullanıldığı belirtilmiş ve sağ kalımı da arttırdığı tespit edilmiştir [34]. Eğer tümörün çevresi temizse ve bir yere bağlı değilse memenin sadece tümörlü kısmının alınması olan lumpektomi yöntemiyle alınabildiği bilinmektedir. Tedavinin devamında radyoterapi uygulanabilir. Eğer yayılcı tür bir kansere ve çevre meme dokularına sızmışsa bu durumda mastektomiye (memeye birlikte, memenin altındaki kasların ve koltuk altındaki lenf bezlerinin de çıkartılması) ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir [35] (Şekil 7).



Şekil 7. Lobular kanserin görünümü [35].

2.5.3. İnvaziv (Yayılcı) Meme Kanseri

İnvaziv meme kanserinin orjinal tümörün bulunduğu alandan dışarı memenin diğer dokularına veya vücudun diğer bölgelerine yayılma veya sızma eğilimi gösterdiği belirtilmiştir [36] (Şekil 8).



Şekil 8. İnvaziv kanserin gösterimi [36].

2.5.4. İnflamatuvar Meme Kanseri

Nadir rastlanan bir meme kanseri türü olan inflamatuvar meme kanserinde memede kırmızılık ve şişkinlik görüldüğü belirtilmiştir. Memedeki bu görünüm, kanserli hücrelerin lenf damarlarının tıkanması sonucunda meydana geldiği ve ilk etapta göğüs enfeksiyonu ile karıştırıldığı belirtilmiştir [37].

2.5.5. Tekrarlayan Meme Kanseri

Daha önceden meme kanseri hastalığına yakalanmış bir insanın tedaviden belirli bir zaman geçmesinden sonra kontrollerde atlatıldığı sanılan kanser hastalığının tekrar kendini göstermesi durumunda meme kanserinin tamamen tedavi edildiği düşünülse bile bazen tedaviden sonra da tespit edilemeyen kanserli hücrelerin vücudun herhangi bir yerinde kalmış olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu kanserli hücrelerin tekrar meme bölgesinde ortaya çıkabileceği gibi vücudun diğer organlarında da ortaya çıkabileceği tespit edilmiştir [10].

2.6. Meme Kanseri Belirtileri ve Teşhis Yöntemleri

Meme kanseri hastalığının belirtileri hastadan hastaya göre farklılık göstermekte olduğu bilinmektedir. Meme kanseri hastalığının vücuttaki yayılım derecesine ve kişiden kişiye göre farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Kadınların çoğunda meme kanseri ilk başlarda ağrısız olarak kendisini gösterirken bazı

durumlar ise bazı belirtilerle kendisini gösterdiği tespit edilmiştir [38]. Memede bir kitlenin varlığının tespiti, memenin portakal kabuğu şeklinde bir görüntü alması, doğumsal nedenlerden bağımsız olarak meme başının içeri çekilmesi, meme ucundan kanlı ya da kansız akıntı gelmesi, meme derisinde yara, kızarıklık ve ödem meydana gelmesi, lenf bezlerinde şişlik olması, koltuk altında şişlik ve ödem oluşması gibi belirtiler ile klinik açıdan meme kanseri belirtileri olarak ifade edilmektedir [27].

Meme kanseri belirtileri ile erken teşhis edilse de meme kanseri bölgesel lenf bezlerini aşarak kan dolaşımı aracılığı ile sıklıkla akciğer, akciğer zarı, kemik (kaburga, bel omurları, kafatası, kol kemikleri), karaciğer, karın zarı, böbrek üstü bezleri, beyin ve yumurtalıklara metastaz gösterdiği tespit edilmiştir [39]. Gelişmiş ülkelerdeki meme kanseri tarama programları oldukça ilerlemiş olsa da sıklıkla meme kanserinde görülen metastaz olayını engelleme konusunda kesin çözüm bulamadıkları ifade edilmiştir [31] Meme kanseri erken teşhis edilmesi başarılı tedavi şansının elde edilmesini de beraberinde getirdiği belirtilmiştir [39, 40].

Meme kanseri tanı yöntemi olarak; Kendi Kendine Meme Muayenesi Yapılması (KKMM), Klinik Meme Muayenesi Yapılması (KMM) ve mamografi çektilmesi kullanıldığı belirtilmiştir [27]. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ile ve ultrasonografi tarama yapılması da meme kanseri tanısı için kullanıldığı yöntemlerden olduğu belirtilmiştir [39, 41] KKMM yapılması düzenli olduğunda meme kanseri hastalığının erken dönemde teşhis edilmesinde çok önemli olduğu ifade edilmiştir [42]. Memenin tamamının filminin çekilmesi mümkün olmadığı durumlarda, kadınlardan yaşı genç olanlarda mamografinin etkililiğinin tartışmalı olması (mamografinin etkisi sınırlı olacağı için) KMM yapılmasının daha olumlu sonuçlanacağı belirtilmiştir [25]. Bu nedenle düzenli yapılan KMM ile meme kanserinin erken evrelerde teşhis edilme imkanının olacağı belirtilmiştir [43]. Mamografi; memenin radyolojik olarak X-ışını ile görüntülenmesi şeklinde tanımlanmakta ve memenin yapısını ortaya koymaktadır [44]. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırma Merkezinin yaptığı çalışmaya göre tarama amaçlı yapılan mamografi meme kanseri hastalığından meydana gelen ölüm oranlarını azalttığı görülmüştür. Yapılan bu çalışmada meme kanseri tarama programları değerlendirilerek sonuç olarak özellikle yaş aralığı 50-69 arasında olan kadınların meme kanseri hastalığından kaynaklanan ölümlerinin % 35.0 oranında azalma tespit edilmiştir [45]. Mamografinin en önemli avantajı, kanser olarak ifade

edilebilecek memede meydana gelen değişiklikleri, fiziksel semptomların ortaya çıkmasından çok daha önce belirleyebilmesidir [25, 45]. Meme kanseri teşhisinde yeni bir moleküler meme görüntüleme (MBI) yöntemi geliştirildiği belirtilmiştir. Bu yöntemde radyasyonun anormal hücelere daha çok etki ettiği belirtilmiştir. Tümörler mamografide net bir şekilde gözlenmezken, MBI yöntemi ile daha net bir şekilde gözlendiği tespit edilmiştir [41]. Böylece erken dönemde teşhis edilen meme kanseri hastalığında, tümörün boyutu küçük olacağı ve metastaz riskinin de azalacağı belirtilmiştir [41]. Mamografi sonuçlarının faydalı olması için KMM ile birlikte yapılması tavsiye edilmektedir. Bu durumun, yapılacak olan taramaların güvenilirliğini arttırdığı görülmüştür [25].

İnvaziv lobüler karsinoma sık görülen kanserler arasında ikinci sırada geldiği belirtilmiştir. Bu nedenle meme kanseri türünün artması hormon tedavisi kullanımında artmasına neden olduğu belirtilmiştir. Yaş artması ile birlikte daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir [46].

2.7. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Sosyal stres, psikolojik sıkıntı ve psikososyal destek etkisi meme kanseri hastalarının, tıbbi tedavisinde etkili olup bu durumlar tedavinin seyrini değiştirdiği tespit edilmiştir. Psikolojik desteği ortadan kaldırmak tedavinin etkisinde olumsuz sonuçlar oluşturabildiği tespit edilmiştir [38]. Meme kanseri hastalığının tedavisi için uygun görülen yöntemler olarak; cerrahi tedavi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi kullanılmaktadır.

2.7.A. Cerrahi Tedavi

Kanserle savaşın ilk aşaması olduğu belirtilmiştir. İki şekilde tedavi gerçekleştirilmektedir. Meme koruyucu cerrahiler kanserli dokunun çıkarıldığı fakat memenin yerinde kaldığı ameliyatlardır. Memenin tamamının alındığı cerrahiler ise kanserli doku ile birlikte tüm meme dokusunun çıkarıldığı ameliyatlardır [47].

2.7.B. Radyoterapi

Işın tedavisidir. X-ışınlarının (röntgen ışınları), meme bölgesine ve koltuk altına uygulanmasıyla, cerrahi girişimden sonra kalma olasılığı olan kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlamak amacı ile yapılır. Meme kanseri tümörünü

küçültmek, kanserli hücreleri öldürmek amaçlı kullanılmaktadır. En sık kullanılan yöntem olan harici ışınlama (external beam radiation) yöntemidir. Lenf düğümlerine sıçramış kanserli hücreler mevcutsa ve invaziv tümör 5 cm'e ulaşmışsa kullanılan tedavi yöntemidir [26].

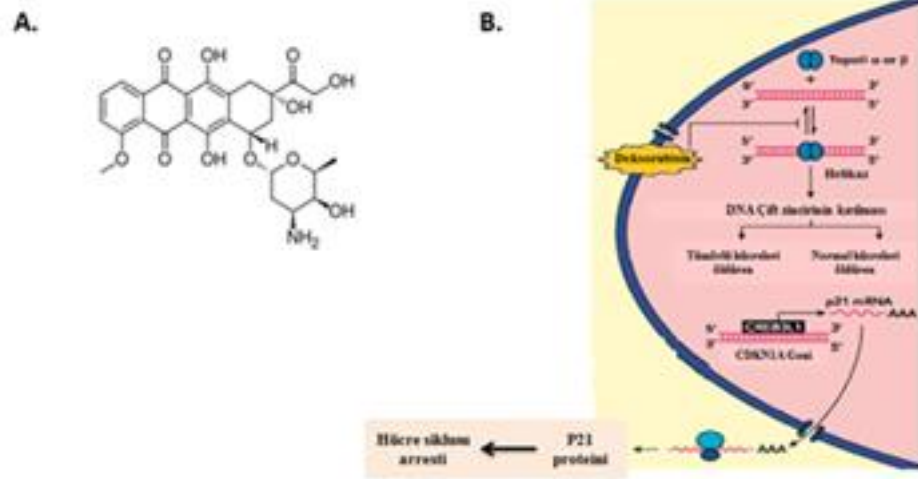
2.7.C. Kemoterapi

Meme kanseri hastalığını oluşturan tümör küçük bir bölgede değil de yayılmış ise kullanılan yöntemdir. İki çeşit kemoterapik tedavi yöntemi bulunmaktadır; adjuvant ve neoadjuvan tedavidir. Adjuvan kemoterapi; cerrahi sonrası herhangi bir bölgede kanser kalmasa da koruma amaçlı yapılan tedavidir. Neoadjuvan kemoterapi, üçüncü evre kanserli olan hastalarda mevcut tümörün boyutlarını küçültmek ve cerrahiye uygun hale getirmek amaçlı yapılan tedavidir [48].

2.8. Meme Kanserinde Kullanılan Kemoterapik Ajanlar

2.8.A. Antrasiklinler

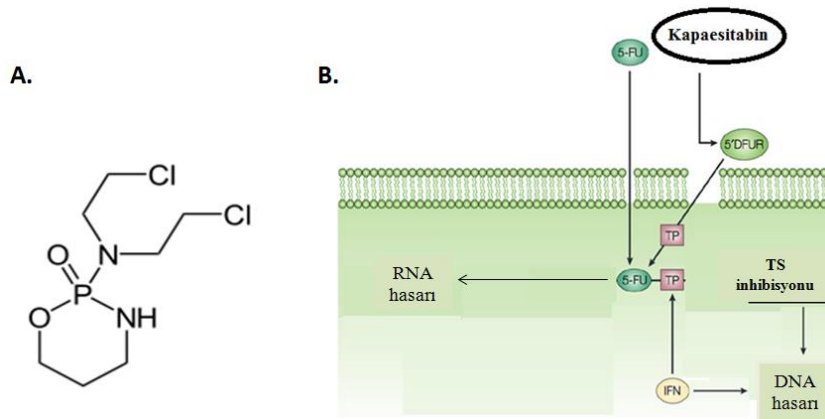
Doksorubisin (Adriamisin) veya Epirubisin, Antrasiklinler; DNA ve RNA sentezine müdahale ederek, onları inhibe ederek replikasyonu önler ve böylece kanser hücrelerinin büyümesini durdurur. Bu ilaçların kullanıldığı kombinasyonların oldukça iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir. Doksorubisin'in tam etki mekanizması karmaşık ve hâlâ tamamen anlaşılmamış olmakla beraber enterkalasyon yoluyla DNA ile etkileştiği ve onun biyosentezini etkilediği bilinmektedir. Transkripsiyon sırasında DNA'nın açılmasını sağlayan Topoizomeraz II enziminin ilerlemesi engelleyerek etki ettiği ifade edilmektedir [49]. Kristal yapı analizinde görüldüğü gibi, molekülün düzlemsel kromofor kısmı DNA'daki iki baz çifti arasına entegre olmaktadır, bunun altı üyeli daunosamin şekeri DNA'nın küçük oyuğuna yerleşerek iki taraftaki baz çiftleri ile etkileştiği belirlenmiştir [50] (Şekil 9).



Şekil 9. Antrasiklinler'in A) Kimyasal yapısının gösterimi. B) DNA ve RNA üzerindeki etkisinin gösterimi [50].

2.8.B. Siklofosamid, 5-Florourasil (5-FU), Metoterxate (CMF)

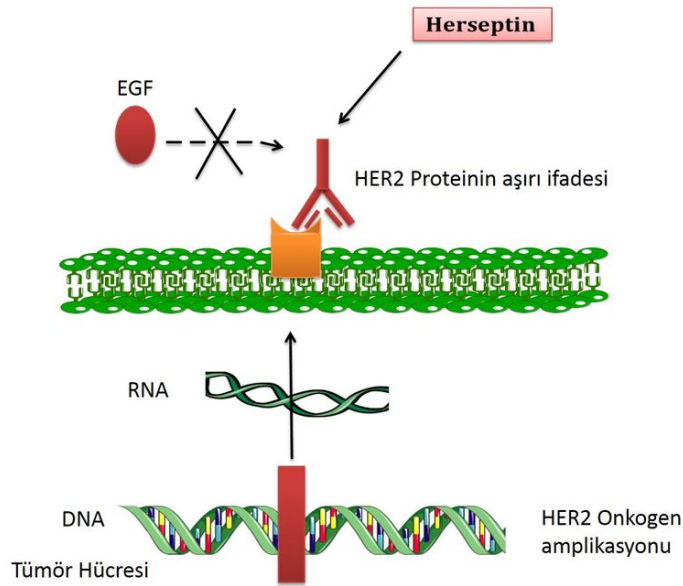
Hem adjuvan hem de metastaz olan meme kanseri tedavilerinde kullanıldığı, ama kullanımı sırasındaki yan etkileri görüldüğü belirtilmiştir. 5-Florourasil (5-FU) anti-kanser tedavilerde kullanılmasıyla beraber onun yerine ilaçlar dizayn edilmeye başlanmıştır. Kapesitabin, 5-FU etki mekanizmasını taklit edilerek dizayn edilmiş bir ilaçtır [51] (Şekil 10). Uzun yıllar standart kombinasyonların kullanılmasına rağmen sonrasında bu kombinasyonların yerlerini antrasiklinlerinin aldığı belirtilmiştir [52].



Şekil 10. 5-FloroUrasil'in etki mekanizması. A) 5-FU'in kimyasal yapısı, B) 5-FU'in antikanser aktivitesi. TS: timidilat sentaz, IFN: interferon [51].

2.8.C. Trastuzunab (Herceptin)

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) onkogenik proteini pozitif olan hastalarda kullanılmaktadır. Metastatik hastaların yanında erken evredeki meme kanserli hastalarda da kullanılabilir. Herceptin; EGF'nin yerine HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü) reseptörüne bağlanarak etki ettiği belirtilmiştir (Şekil 11). Son zamanlarda kullanılan bu ilaç meme kanseri hastalarında olumlu sonuçlar verdiği belirtilmiştir [53].

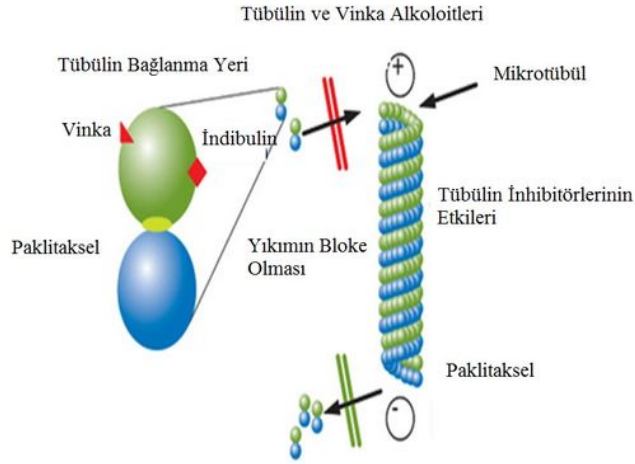


Şekil 11. Herceptin ilacının etki mekanizması [54].

2.8.D. Taksanlar

Taksan grubu ilaçlar; paklitaksel ve doksitaksel olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Doksitaksel (Taxotere) meme kanseri olan hastaların tedavisinde etkili bir mikrotübül sitotoksik taksan olup taksanların ilave olduğu ilaç kombinasyonlarının lenf nodu pozitif kanserli hastalarda daha etkili olduğu belirtilmiştir [55, 56]. Doksitaksel mikrotübüllere bağlanarak etki ettiği belirlenmiş ve mikrotübülleri dengeleyerek kalsiyum depolimerazasyonunu engellediği tespit edilmiştir [4, 57]. Ayrıca doksitaksel'in onkoprotein olan Bcl-2 üzerine de fosforlanması ile hücreleri apoptoza götürdüğü tespit edilmiştir [57]. Taksanlar vinka alkaloidleri gibi antimitotik olarak geliştirilmiş ilaçlar olup bu ilaçlar ile ilgili

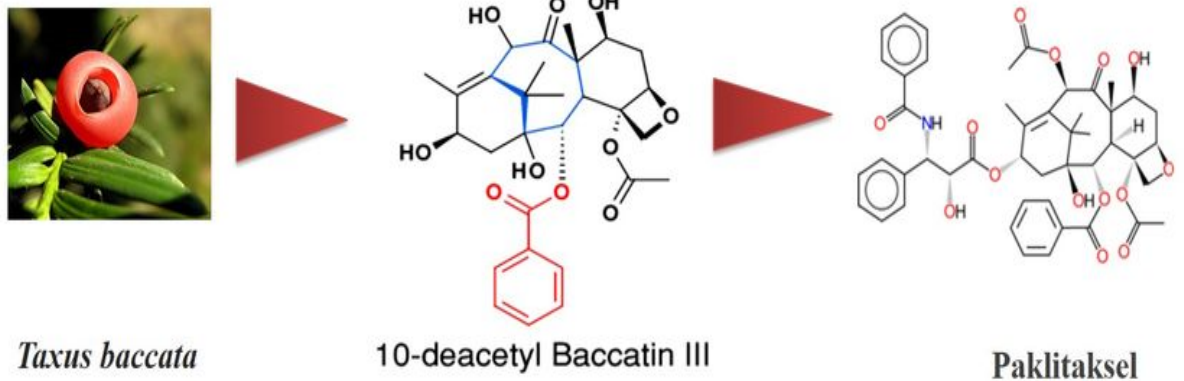
toksik etkileri ve direnç mekanizmalarının gelişmesi sebebi ile bu etkileri azaltacak ilaçlar olarak geliştirildiği belirtilmiştir. İndubulin de bu sınıfa giren ilaçlardan bir tanesidir. Taksanlar tübülün polimerini stabile ederek etki gösterirken, İndubulinin de tubulin polimerizasyonunu destabile ettiği belirtilmiştir [4](Şekil 12).



Şekil 12. Taksanlar'ın etki mekanizması [58].

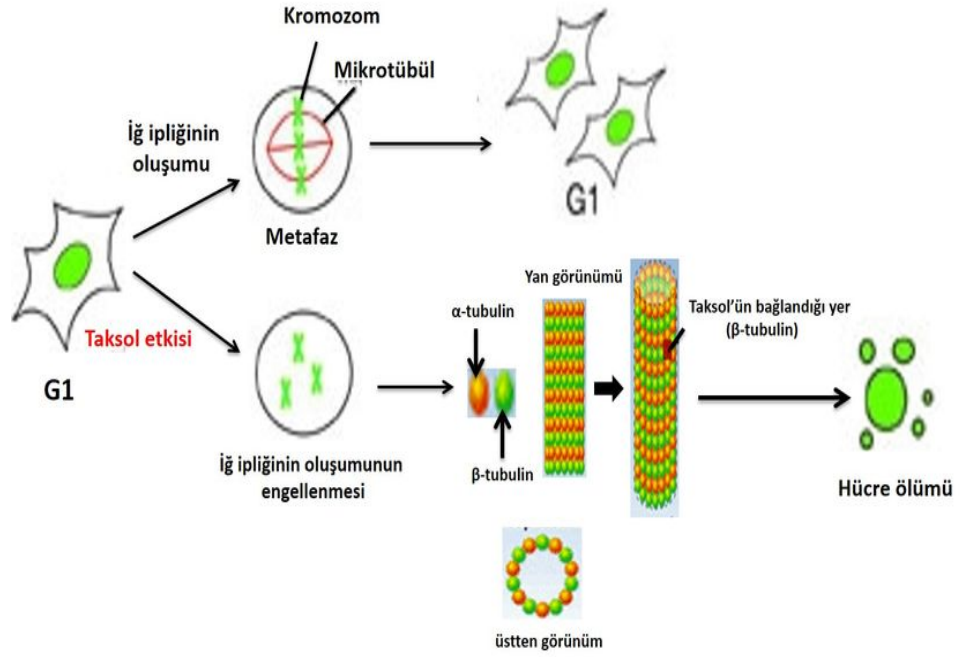
2.9. Paklitaksel

Paklitaksel 1967 yılında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü programında keşfedilmiştir. Pasifik porsuk (*Porsuk brevifolia*) ağacından izole edilen toksol grubundandır [59]. Kimyasal yapısı Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. Paklitaksel ilacının elde edilmesi ve kimyasal yapısı [59].

Bitki alkaloidlerinden taksoid grubu ilaçlarından olup kanser hücrelerinde kemoterapide kullanılan mitotik inhibitör olan paklitaksel; hücrelerin mitoz bölünme sırasında mikrotübüllerin beta tübülün alt gruplarına bağlanarak tübüllerin tübülilere dönüşmesini ve mitoz bölünme sırasında oluşan iğ ipliklerin yıkımını engellediği ve hücre bölünmesini durdurduğu için hücrelerin apoptoza gitmesinin sinyalini verdiği tespit edilmiştir [6] (Şekil 14).



Şekil 14. Taksol'ün etki mekanizması [6].

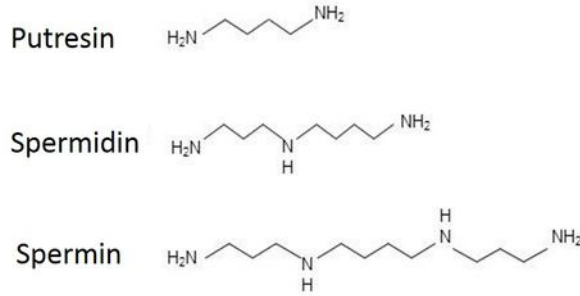
2.10. Poliaminler

Poliaminler (PA), hücrelerin büyüme ve gelişmesi için önemli amfilitik katyonik amin türevleridirler [60]. Hem prokaryot hem de ökaryotlarda varlığı tespit edilen PA putresin, spermidin ve spermin'dir. PA hücre döngüsünü düzenleme, transkripsiyon, translasyon ve protein sentezi aşamalarında rol aldıkları tespit edilmiştir [61]. PA'lerin ekstrasellüler matriks tayini, hücre adezyonu ve sinyal iletimlerinde de görev alıp, bütün memeli hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir [61]. PA'in, bakteri ve memeli hücre kültürleri için büyüme faktörleri gibi davranıp hücre bütünlüğünü, hücre içi organel ve membranlarının stabilizasyonundan sorumlu oldukları ifade edilmiştir. Ayrıca, pozitif yük taşımaları nedeni ile, DNA ve

RNA'larla kolayca etkileşime girerek DNA ve RNA'nın biyosentezi, DNA stabilizasyonu ve bakteriyofajlarda DNA paketlenmesi gibi temel olaylarda görev aldıkları tespit edilmiştir [22]. PA eksikliği hücre proliferasyonunu, hücre göçünü baskıladığı, kusurlu embriyo oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir [62]. PA'in molekül ağırlıklarının düşük olduğu, pH'nın yaklaşık 10 olduğu, suda çözündüğü, vücut içi pH'ında tamamen protonlandığı ve bütün hücrelerde değişen konsantrasyonlarda bulunduğu belirtilmiştir [60, 62].

2.10.1. Poliamin Türevleri

Doğal PA olan putresin [1,4-butan diamin veya tetrametilendiamin], spermidin [N-(3-aminopropil)-1,4-butan diamin veya aminopropil-tetrametilendiamin] ve spermin [N,N-bis(3-aminopropil)-1,4-butan diamin veya diaminopropil- tetrametilendiamin] hücrenin normal işlev ve büyümesi için esas olan yaygın hücresel bileşikler olduğu ve kimyasal yönden çok basit organik alifatik kasyonlar oldukları için fizyolojik koşullarda tamamen protonlanmış oldukları saptanmıştır. Hücrenin çoğalma hızıyla PA içeriğinin ilişkili olduğu da belirlenmiştir [63](Şekil 15).



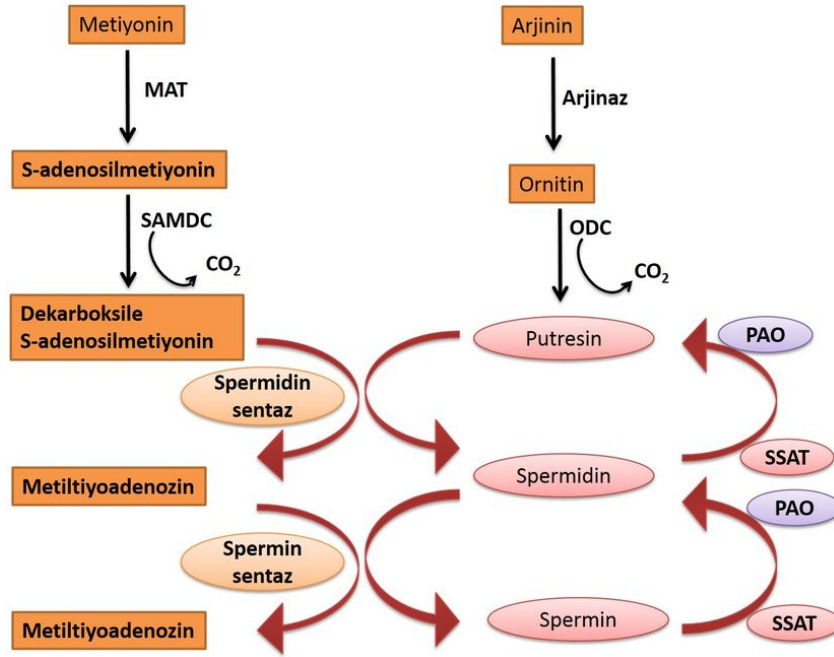
Şekil 15. Poliamin türevlerinin kimyasal yapısı [63].

2.10.2. Poliamin Metabolizması

PA'in en basiti olan putresin, arjininden sentez edilen ornitinin ornitindekarboksilaz (ODC) enzimi aracılığıyla sentezlendiği bilinmektedir. PA biyosentez'inin ilk hız sınırlayıcı basamağı ODC'ye bağımlı putresin üretimi olduğu belirlenmiştir [64]. Hücre içi homeostatik koşullarda putresin spermidine, spermidin de spermine dönüşmektedir.

ODC enziminin hücrelerde aktivitesinin arttığı durumlar hücre içi PA havuzunda artış tespit edilmiştir [65]. PA'lerin intrasellüler konsantrasyonlarının

artışı ile tetiklenen küçük düzenleyici bir protein olan AZ (antizim) protein varlığı tespit edilmiştir [66] AZ, ODC'ye bağlanıp, AZ-ODC kompleksi oluşturur. Bu kompleks ise 26-S proteozom'lar aracılığı ile parçalanarak ODC enzim aktivitesine bağlı hücre içi PA miktarının kontrol altında tutulmasını sağlar [67]. AZ'nin PA metabolizması üzerinde üç formu tanımlanmıştır [68]. AZ-1 ODC degradasyonunda görev yaparken, AZ-2 ODC degradasyonunda daha az rol alıp, PA transportunda negatif rol aldığı ifade edilmiştir [69]. AZ 3 ise spermatogenez aşamalarında testis eşey hücrelerini sınırladıkları tespit edilmiştir [70]. AZ, ODC enzimine bağlanarak ODC'nin degradasyonuna neden olurken, hücre içine PA miktarının sabit kalabilmesi amacı ile ODC'nin degradasyonu AZ'ye bağlanan Antizim inhibitörü (AZI) ile bağlanması engellendiği bilinmektedir [70] (Şekil 16).



Şekil 16. Poliamin metabolizması [71].

Homoestaz durumunda hücre içi PA miktarı kontrol altında tutulması için PA katabolik enzimleri görev almaktadır. PA katabolik enzimlerinin aktive olmasına bağlı PA'lerin asitlenmesi ile hücre dışına atılması veya birbirine dönüştürülmesi ile gerçekleşerek hücre içi PA miktarı sabit tutulmaya çalışıldığı tespit edilmiştir [72]. PA katabolik enzimleri; SSAT (spermidin spermin Nasetiltransferaz), A-PAO (N1-asetilpoliaminoksidaz), SMO (Spermidin oksidaz). A-PAO aktivitesinin SSAT tarafından asetilenmiş ürün ile sınırlandırıldığı düşünülmektedir [71] (Şekil 16). SSAT

homodimer olarak tanımlanan sitozolik bir enzimdir [73]. Fakat başka bir çalışmada moleküler kütlesi 80 kDa olan homotetramer olarak da belirlenmiştir [74]. Spermidin ve spermin SSAT tarafından primer amino grupları aracılığı ile asetiller [67, 75]. Asetille olan PA serbest pozitif yüklerini azaltıkları için asetillenen PA histonlarla ve DNA- RNA affinitesi düşerek hücre içi pek çok metabolic görevlerini gerçekleştiremezler [76]. Bir başka PA katabolik yolak enzimi olan SMO; spermini spermidin'e dönüştüren ve spermini okside eden enzimdir.

2.10.5. Poliaminlerin Hücre Metabolizmasındaki Roller

Hücre içindeki PA miktarı azaldığında p53 gen ekspresyonu artar, hücre büyümesi baskılanır. PA baskılanması p53 mRNA stabilitesini artırır. PA'ler endotel hasarında ve vasküler hücre göçünde de rol alır. Gen transkripsiyonu ve translasyonunu uyarırlar [62]. Hücrelerde PA eksikliğinde DNA modifikasyonu görülür. Fazlalığında ise; apoptoz meydana gelirken PAO katabolizmasında oluşan yan ürün olduğu düşünülmektedir. Hidrojen peroksit oksidatif strese sebep olarak apoptoz'a neden olur. İyon kanallarının düzenleyicisi olarak spermin ve spermidin görev yapar, bunlar endojen poliaminlerdir. K⁺ kanalları ve glutamat reseptörlerini de uyarır. Büyüme faktörlerinin reseptör aktivitelerini düzenlerler. Hücre içi sinyal iletiminde rol alırlar. Polikatyonik olduklarından membranların fosfolipit kısımları ile bağlantı kurarak buradaki enzimleri düzenlerler. Protein kinazları aktifleyerek pro-onkogenleri aktive ederek G proteinleri ile reaksiyona girerler. GTPaz aktivitesinde görev alırlar. DNA üzerinde cevap veren elementlere NF-KB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)'e bağlanmasını uyarırlar [77]. PA immün hücrelerin farklılaşmasında da rol aldığı Ferioli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonunda belirlenmiştir. Lokal inflamasyonda ölü ya da hasarlı hücrelerden spermin açığa çıktığı, bunun da hücre göçü ve gelişimini desteklediğini tespit etmişlerdir [78]. PA yara iyileşmesi üzerinde görevli c-fos ve c-myc protoonkogenleri üzerinde baskılayıcı görev yapar [62]. PA hücre iletiminde, hücre adezyonunda, apoptozda, hücrenin içinde ve dışında yer alırlar [79].

Hücre içi PA miktarının yüksek olmasına bağlı hücrelerdeki karsinogenik özelliğin arttığı ve malign hücrelerde belirgin olarak sağlıklı hücre kıyasla yüksek olduğunun tespit edilmesi, PA'in kanser ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Bu nedenle PA biyosentezinin inhibe edilmesi ve PA katabolik enzimleri aktive edilerek hücre

içi PA miktarının düşürülmesi pek çok anti-kanser ilaçların etki mekanizması açısından önem arz ettiği ifade edilmiştir [80]. Bu nedenle PA analogları aracılığı ile PA katabolik yolağının aktive edilmesi ve PA biyosentetik aktivitenin düşürülmesi sayesinde pek çok kanser tipinde apoptotik ölümün gerçekleştiği tespit edilmiştir [81]. BENSpm, CHENSpm, CHENNSpm, DENSPm ($N_1 N_{11}$ -diethylnorspermine) gibi pek çok PA analogu tasarlanmış ve apoptotik etkinliği kanser hücrelerinde tespit edilmiştir [82].

2.12. DENSPm ($N_1 N_{11}$ -diethylnorspermine)

PA analoglarından biri olan DENSPm hücrelerin içerisindeki PA havuzundaki spermidin ve spermin'in miktarını azaltarak hücreleri programlı bir şekilde ölüme yönlendirilmesini sağlamaktadır. DENSPm, hücre içi PA içeriğini tüketen, RNA ve protein (transkripsiyon ve translasyon) düzeyinde SSAT'yi stabilize eden ODC'yi inhibe ederek hücre büyümesini engelleyen ve apoptotik ölümü indükleyen bir ilaçtır [82].

2.12.1. Kanser tedavisinde DENSPm kullanımı

DENSPm'in meme, akciğer, kolon, melanoma kanseri gibi birçok kanser tipinin tedavisinde farklı kemoterapötik ajanlar ile kombinlenerek kullanılmaktadır [83-85]. Ayrıca yapılan çalışmalarda DENSPm'nin kemoterapötik ilaçlarla yapılan kombinlerinin sitotoksik etkilerinin görülmesi kanserin klinik çalışmalarında DENSPm'in umut verici olduğu düşünülmektedir [86].

DENSPm potansiyel bir anti-kanser ajan olarak tasarlanmış ve geliştirilmiş PA analogudur. Doğal PA'e yapısal benzerlik gösteren DENSPm, PA transportunu baskılayarak PA biyosentetik enzimleri olan ODC ve SAMDC'in azalmasında etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca DENSPm'in PA'in katabolik yolağında görevli olan SSAT artışında etkili olduğu da gösterilmiştir [87].

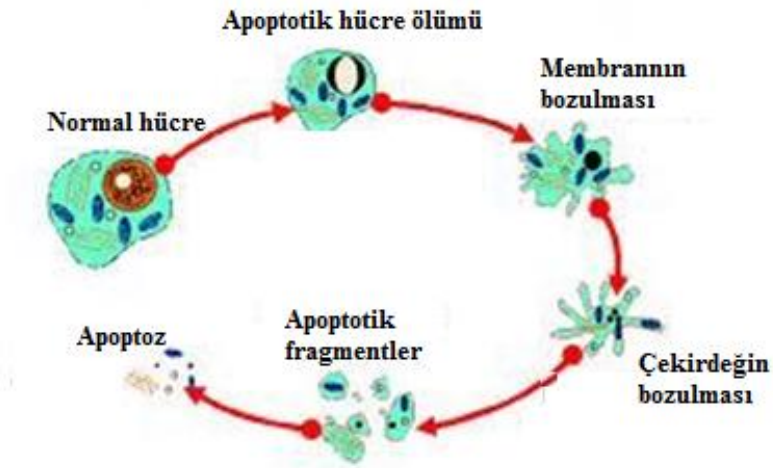
PA analoglarının kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi olduğu daha önce belirtilmiştir. Bunu göstermek için yapılan çalışmalarda anti-kanser etkisi olduğu ve kolorektal, meme, melanoma, akciğer, prostat kanserlerinde, lösmide apoptozu uyardığı gösterilmiştir. DENSPm diğer kemoterapötik ilaçlarla kombinlendiğinde kanser hücrelerini sinerjistik olarak öldürdüğü belirtilmektedir [88].

PA analoglarının hücre ölümünü uyardaki mekanizmaları tam anlamıyla anlayamamıştır. Ancak DENSp_m'nin SSAT (spermin ve spermidini astiller) anlatımını uyardığı [89] ve spermin ve spermidinin asetillenmiş formlarını sentezlerken hidrojen peroksit üretimini arttırdığı tespit edilmiştir [87]. DENSp_m hücre döngüsünü kesintiye uğrattığı ve bu durumun hücrelerde apoptotik ölümü tetiklediği bilinmektedir [94]. DENSp_m'in intrinsik apoptotik yolağı uyararak sitokrom-c'nin salınmasını uyardığı tespit edilmiştir [90].

2.11. Apoptoz

Apoptoz fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Teorik olarak ise apoptoz; çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanmaktadır [91]. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücrel lezyonların ya da genetik faktörlerin aktivesi sonucu hücrel intihar programının apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir [92]. Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun mekanizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur [93]. Apoptoz, gelişimsel morfolojide oynayan hücre ölümünün son derece düzenli olduğu bir olaydır, aynı zamanda hücre sayısını kontrol eder ve hücrelerin hasarını giderir bu nedenle tümör baskılanmasında önemli rol oynamaktadır [94]. Hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz arasındaki denge vücutta bulunan net hücre sayısını etkiler ve bu olaylardaki hatalı gelişmiş tümörlerin oluşmasına neden olur. Apoptoz vücuttaki ana tümör baskılama [95] mekanizmasıdır, çünkü yoğun DNA hasarı olan ve dolayısı ile kanserin meydana gelme potansiyeline sahip olan hücreleri yok eder. Örneğin; güneş yanmasından sonra derinin soyulması gerçekte UV' ye maruz kalmaya bağlı olarak yoğun DNA hasarına karşı hücrelerde meydana gelen apoptoz olayıdır. Bu olay cilt kanserine karşı önemli bir savunmadır. DNA hasarı hücrelerin eliminasyonu tüm organizmayı kanserden korur [95].

Apoptoz, genetik programın eksprese edilmesine gerek duyan aktif bir programdır ve her hücre bunu yapabilme kabiliyetini gösterir [92]. Apoptoza uğrayan hücre fagositoz sırasına makrofajlar yutulur ve komşu hücreler apoptoza uğrayan hücrelerin göstermiş olduğu moleküler fosfatidilgliserinleri tanır [93]. Apoptoz hücrenin büzülmesi, tomurcuklanması ve kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu ile karakterize edilerek son derece düzenli bir olaydır (Şekil 17). Apoptoz, çoğu zaman nekroz ile karıştırılabilir. Fakat nekroz olayında hücre membranları geçirgen hale gelir ve hücre içeriği etraftaki dokulara dağılır ve inflamasyona neden olur [92].



Şekil 17. Apoptotik süreç [92].

2.10.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması

Büyüme faktörü sinyal yollarında kinazların asal rol oynaması gibi, apoptoz mekanizmasında ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve kaspazlar adı verilen belirli proteazlar merkezinde rol oynarlar. Proteoliz kaspazlar tarafından katalize edilir ve hücresel komponentlerin düzenli bir şekilde yıkılmasına yardım eder ve bu durum apoptoza özeldir [96]. Hücrelerin apoptoza uğrayabilmesi için hücre dış yolaktaki ölüm reseptörlerinden gelen 'ölüm faktörleri' adı verilen sinyallerin alınması, DNA hasarı ya da oksidatif stres gibi iç yolaktaki fiziksel/kimyasal etkenler tarafından uyarılması ile kaspazlara bağlanıp onları aktive etmektedir [97]. Kaspazlar ise aktive olan DNAaz'lar aracılığı ile DNA'nın yıkımına sebep olur. Kaspazlar proteinleri sadece aspartik asit (20 amino asitten biri) bulunan bölgelerinden kıran bir moleküler

makas gibi rol oynayan spesifik proteazlardır. Kaspazlar her iç ve dış olmak üzere her iki yolda da asal rol oynarlar [98].

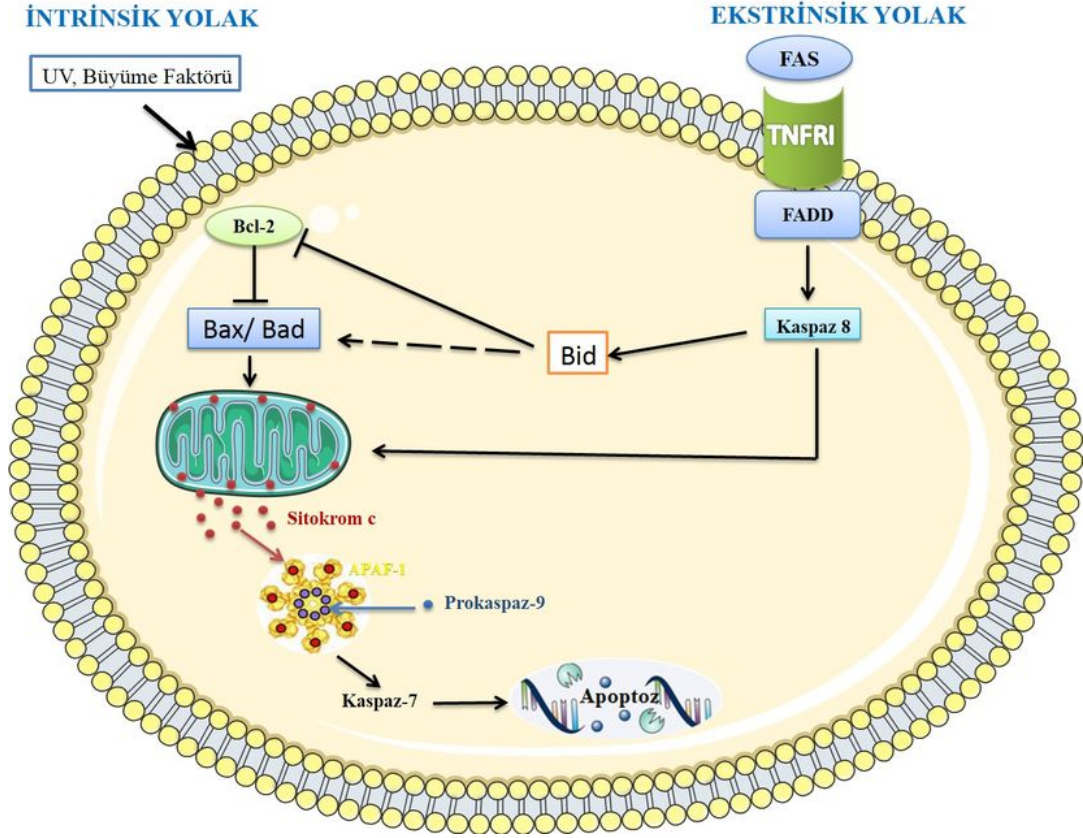
2.10.1.1. İntrinsik Yolak

Apoptozun düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Burada mitokondrinin aktivasyonunda rol oynayan en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Çünkü bu ailenin üyeleri mitokondri üzerinde hem pro-apoptotiklerle hem de anti-apoptotiklerle etkileşimleri bulunmaktadır. Bu aileden Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinler mitokondri membranının dışında bulunurlar ve hücrenin yaşamının devamında görevlidir [99].

Bad ve Bax gibi pro-apoptotik proteinler ise anti-apoptotik proteinler ile veya mitokondri membranı ile doğrudan ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler. Bax proteini mitokondri dış membranında bir transmembran por oluşturur ve membranın yapısını bozarak sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını sağlar. Sitokrom-c sitoplazmada prokaspaz-9, Apaf-1 ve ATP ile kompleks oluşturarak apoptozom kompleksi meydana getirir. Bu durumda aktif hale gelen kaspaz-9 kaspaz kaskadının başlamasına yol açarak apoptotik mekanizmayı oluşturur [98] (Şekil 18).

2.10.1.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik yolak, hücre ölüm reseptörleri olan Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandlar ile etkileşime girerek apoptoz'u uyaran apoptotik mekanizmadır. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı ölüm alanını içermektedir [100]. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarırlar (Şekil 18). Aktive olan kaspaz-8 daha sonra diğer kaspazları aktive ederek apoptotik mekanizmayı oluşturur [101].



Şekil 18. İntrinsik (iç yolak) ve ekstrinsik(dış yolak) apoptoz mekanizma [98].

2.13.Otofaji

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofajinin sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar [9, 102]. Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyoloji koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıları nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir [9, 102].

Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur [9, 103]. Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir [104].

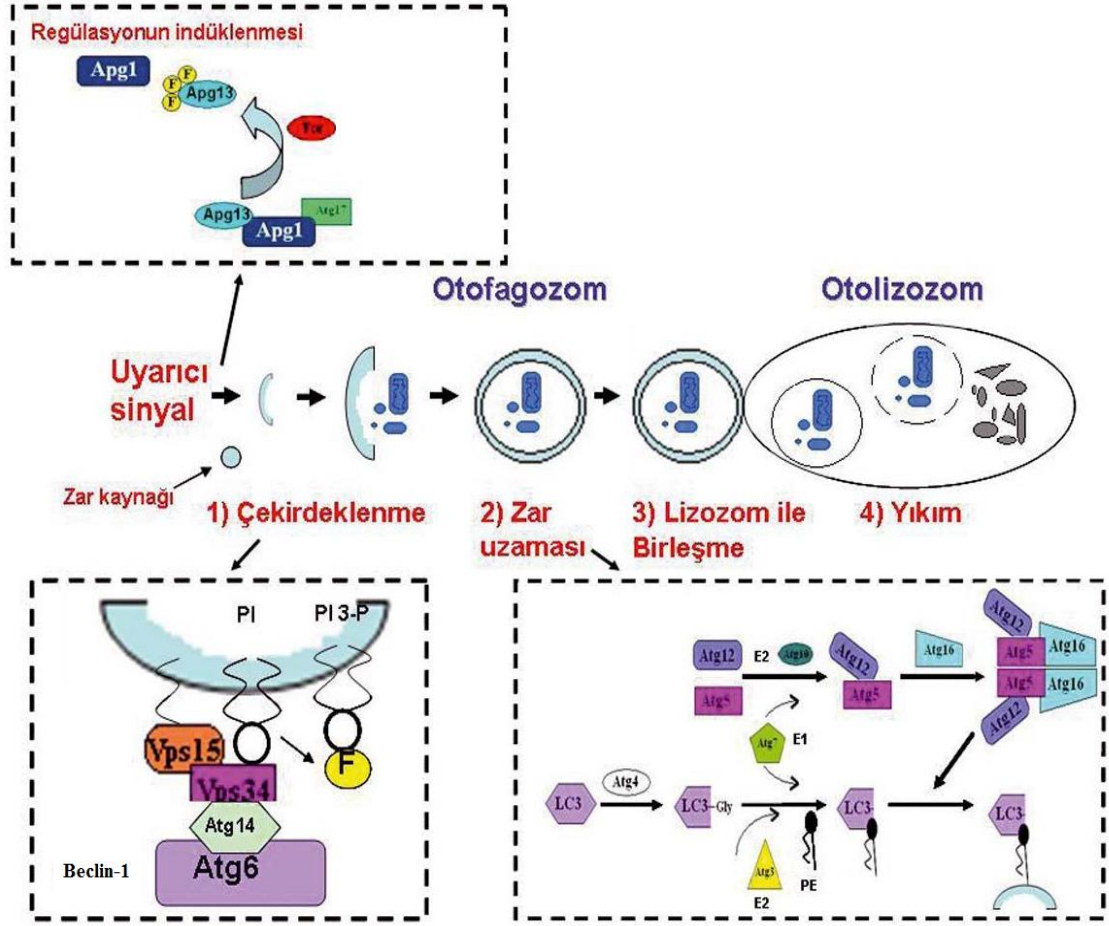
Otofajinin açlık durumunda hücresel yapı taşlarının yıkılarak geri dönüşümü ve hücrenin enerji depolarını yenileyerek apoptotik hücre ölümünü engellediği ya da zıt olarak hücre ölümüne yol açtığı gösterilmesine ek olarak apoptozla ilişkili olduğu tespit edilmiştir [105, 106]. Bazı durumlarda otofaji ve apoptoz hücrede birbirine zıt etkiler yapabilmektedir. Bu durumda, otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekazması olarak çalışarak, apoptozun durdurulmasına ve ölümün engellenmesine yol açmaktadır. Otofaji metabolik stres, ilaç ya da radyasyon hasarıyla karşı karşıya kalan hücrede anormal ve hasarlı proteinlerin yok edilmesinde ve genomik DNA'nın hasardan korunmasında önemlidir. Otofaji yokluğunda tümör hücrelerinde, DNA hasarı, gen amplifikasyonu ve kromozomal anormallikler artmaktadır [107]. Yine aynı doğrultuda olmak üzere, otofajinin; meme, prostat ve kolon kanserlerindeki inhibisyonu, bu hücrelerin radyoterapiye olan ölüm cevabını artırmaktadır [108]. Otofaji kendi başına hücre ölümüne sebep olmaksızın apoptotik hücre ölümüne yardımcı olabilmektedir. Örneğin; besin yokluğunda otofajiye bağımlı hücre ATP düzeyinin sürdürülmesi apoptoz'un önemli belirteçlerinden olan fosfotidilserinlerin hücre zarının dışına transferini sağlar. Bundan başka, apoptozda görülen hücre zarı tomurcuklanması (blebbing) enerjiye bağımlıdır ve aktin-miyozin kasılması ATP ile meydana gelmektedir [109]. Bazı koşullarda otofajinin kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğunu gösteren yayınlar da bulunmaktadır. Örneğin otofajinin, CD4+ T hücrelerinin HIV ile enfeksiyonu sırasında kaspazlara bağımlı hücre ölümü için gerekli olduğu gösterilmiştir [110]. Atg7 ya da Beclin-1'in hedeflenmesi ya da 3-MA ile muamele sonucunda otofajinin baskılanması, kaspaz aktivasyonunu ve hücre ölümünü engellemektedir [111].

Literatürdeki bilgilerden yola çıkarak otofajinin hücreyi nasıl ölüme götürdüğü konusu tam olarak aydınlatılamamıştır. Sitoplazma, hayati organeller ve hayatta kalmayı sağlayıcı bazı proteinlerin otofaji tarafından yıkıldığı bilinmektedir. Örneğin, uzun süre aktive olan otofaji, mitokondri sayısını ve sitoplazma miktarını

azaltmaktadır. Otofaji tarafından anti-oksidant enzimin parçalanmasının hücredeki reaktif oksijen türleri (ROS) miktarını arttırarak hücreyi ölüme götürmektedir. RIP/JNK sinyal yolunun ve Bcl-2 protein ailesinin otofajik hücre ölümünü aktive ettiği tespit edilmiştir [105, 106].

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu otofaji ile bağlantılı proteinlerdir ya da Atg proteinleri (30'dan fazla Atg geni tanımlanmıştır) 'dir [105]. Atg proteinlerinin bir kısmı ve çeşitli protein kompleksleri otofajik keseciklerin oluşumunda ve otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır. Otofajinin temel moleküler mekanizması; Atg1-Atg13- Atg17 kinaz kompleksi, 3. sınıf phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz, Vps34'un aktivitesini düzenleyen Atg6 protein (memelilerde Beclin-1) kompleksi, iki ubiquitin benzeri sistem ve Atg9 ve döngü sistemi olarak dört basamakta özetlenebilir [105, 106]. PI3F'in görevi, kendisine bağlanma özelliğine sahip ve kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri ve protein gruplarını PAS'a yönlendirmektir. Bu şekilde çekirdeği oluşan otofagozom membranının uzaması ve kesecik halini alması ise iki ubiquitinlenme benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir [106]. Bunlardan birincisinde; Atg12 proteininin Atg5 proteinine kovalent bağ ile bağlanır ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine tutunur (Şekil 19). İkincisinde ise; biyolojide az rastlanan bir reaksiyonla, Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent bağ ile bağlanır ve Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi oluşur, Atg8/LC3'un FE'ye bağlanması için, Atg8 ya da LC3'un C-ucundaki beş aminoasitin Atg4 proteazı tarafından kesilmesi ve sondan 6. aminoasit olan glisinine ortaya çıkarılması FE molekülü glisine bağlanarak Atg8/LC3'un FE'ye bağlanması sonucunda PAS'a zar taşınır ve zar uzar. Ayrıca Atg4, kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmalarına neden olmaktadır [103, 105, 106,]. Atg9 ve döngü sistemi otofajik zardan otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır [111]. Otofaji ile ilgili proteinlerin çoğu, otofajik zarların oluşumunda ve bunların uzayarak kesecik haline gelmesinde görev yapmaktadır [105]. P62 proteini özellikle bazı ubiquitinlenmiş proteinlere, protein yumaklarına ve hücre içi parazitlere bağlanan ve onların otofajik vesiküller tarafından sarılmalarına neden olan sitoplazmik bir otofaji reseptörüdür [103]. P62, hücre içindeki bu anormal yapıları tanıyarak onların otofaji tarafından yıkımlarına yol açar. P62 proteininin kendisi de, otofagozoma taşıdığı

proteinlerle birlikte lizozomda yıkılmaktadır [103]. Otofagozom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargonun parçalanmasına sebep olmaktadır [111] (Şekil 19).



Şekil 19. Otofajik sürecin gelişim basamakları [111].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler Bölümünde Tablo 2’de sunulmuştur.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’te sunulmuştur.

3.1.4. Kullanılan Tamponlar

Kullanılan tamponlar ekler bölümünün çözeltiler kısmında verilmiştir.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ olan kolon kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection (ATCC)’ dan temin edilmiştir. Hücreler DMEM (besiyerinde % 10 sığır fetusu serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile % 5 CO₂ içeren 37°C’de inkübatörde üretilmiştir. Hazırlanan besiyeri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml’lik falkon tüplerde +4°C’de saklanmıştır.

Hücreler 75 cm² lik petri kaplarında yetiştirilmiştir. Protein izolasyonu için 100 ve 60 mm’lik, PA izolasyonu için 60 mm’lik petri kaplarına, RNA izolasyonu için 6 kuyulu petri kaplarına, floresan mikroskobu ve florometre çalışmaları için 12 kuyulu petrilere hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin gece boyunca petri kaplarına yapışmaları beklendikten sonra gerekli ilaç ve/veya inhibitör uygulamaları belirlenen sürelerde uygulanmış ve 37 °C ‘de % 5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir.

Hücre ekimi ya da petri kabındaki hücrelerin sayılarının artması sonucu hücre pasajlanması işlemi için ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 75 cm² lik petri kaplarında 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkayıp 2 ml tripsin-

EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (% 0,25) ile CO₂ içeren etüvde 2 dakika bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş hücreler santrifüj tübüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1 ml besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır.

Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25'lik karede sayılan hücre sayısı, 1ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10⁴ ile çarpılmıştır. 1,5x10⁶ hücre, 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT ayırıcı, canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığına bakılmıştır. MCF-7 kolon kanseri hücreleri 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca hücrelerin yapışması için beklenmiştir. Paklitaksel (20-40 nM), DENSpM (20-30 µM), ve her iki ilacın kombinasyonlarının uygulaması 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her kuyucuğa 10 µl MTT ayırıcı eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Daha sonra MTT ayırıcı eklenmiş besiyeri hücrelerden çekilmiş ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiş ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Mikroplaka okuyucuda, ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm'de absorbans ölçümü ile okutulmuştur.

3.2.3. Hücre Sağkalım Tayini

Paklitaksel ve DENSpM'in hücreler üzerindeki sitostatik etkisi değerlendirilmiştir. 12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücreler yapışması için 37°C de bir gece inkübe edildikten sonra hücelere Paklitaksel (30 nM), DENSpM (20 µM), ve her iki ilacın kombinasyonlarının uygulaması yapılmıştır. 24-72 saat zaman aralığında her 24 saatte hücrelerin üzerindeki ilaçlı besi yeri atılmıştır. Hücreler tripsin ile toplanarak 2000 rpm' de 5 dakika boyunca santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Hücre pelleti 50

μl besiyeri ve $50 \mu\text{l}$ tripan mavisi boyası ile karıştırılarak hemositometrede sayım yapılmıştır.

3.2.4. ELIZA Yöntemi Apoptotik Hücre Ölümü Tayini

Meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücreleri 1×10^5 hücre $12'$ lik hücre kültürü petrisine ekilerek hücrelerin zemine yapışması gece boyu beklenmiştir. DENSpM ($20 \mu\text{M}$), paklitaksel (30 nM) ve kombinasyonlarının uygulaması yapıldı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra üst sıvı hücrelerden uzaklaştırılır. Hücreler $250 \mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}$ ile iki defa yıkanır. Hücrelerin üzerine $200 \mu\text{l}$ Hücre Özütleme Tamponu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra hücreler kazınarak kaldırılır ve 25 dakika çalkalayıcıda çalkalanır. ELIZA plakalarına $20 \mu\text{l}$ örneklerden $80 \mu\text{l}$ de immünoagent solüsyonundan konular ikişer tekrarlı olarak kuyucukların üzeri kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalanır. Üst sıvı atılır ve üç defa $250 \mu\text{l}$ inkübasyon tamponu ile yıkanarak $100 \mu\text{l}$ ABTS eklenerek 20 dakika çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Süresi dolduktan sonra $100 \mu\text{l}$ ABTS stop solüsyonu eklenerek 415 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek standart absorbans değerine göre standart eğri çizilerek örneklerin değerleri üzerinden konsantrasyon ölçülür.

3.2.5. Propidyum İyodür (PI) boyama

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yapışan hücrelere DENSpM ($20 \mu\text{M}$), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa $2 \mu\text{g/ml}$ PI uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra floresan mikroskopunda Ex: 536 nm /Em: 617 nm filtrelerde ölü hücrelerin varlığı incelenmiştir.

3.2.6. 3,3' Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC_6) Boyama

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yapışan hücrelere DENSpM ($20 \mu\text{M}$), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 1 nM DiOC_6 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda Ex: 488 nm /Em: 535 nm filtrelerde mitokondri memebran potansiyeli incelenmiştir.

3.2.7. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra yapışan hücelere DENSpM (20 μ M), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 1 μ l/ml DAPI boyası 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda Ex: 588 nm/Em: 535 nm filtrelerde ilaca bağlı DNA kırıklarının varlığı incelenmiştir.

3.2.8. Akridine Turuncusu (AO) Boyaması

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra yapışan hücelere DENSpM (20 μ M), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 0,5 μ l AO 10 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda Ex: 488 nm/Em: 535 nm filtrelerde lizozomal vakuollerin varlığı incelenmiştir.

3.2.9. Monodansil Kadaverin Boyaması

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yapışan hücelere DENSpM (20 μ M), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 0,05 nM MDC 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda Ex: 488 nm/Em: 535 nm filtrelerde lizozomal vakuollerin varlığı incelenmiştir.

3.2.10. Lysotracker Kırmızısı Boyaması

12 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yapışan hücelere DENSpM (20 μ M), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Her bir kuyucuğa 50 nM Lysotracker Red 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda Ex: 536 nm/Em: 617 nm filtrelerde lizozomal vakuollerin varlığı incelenmiştir.

3.2.11. Hücre Akış Sitometresi ile analiz

3.2.11.1.PI Boyaması

Meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine DENSpM ve paklitaksel'in farklı konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak Hücre devri analizi hedeflenerek; inkübasyon süresi sonunda üst sıvılar atılarak hücreler 1xPBS ile yıkanarak hücrelerin kalkması için 300 μ l tripsin eklenerek 3 dakika inkübe edilir.

Hücreler kalktıktan sonra Tripsin'in etkisini yok etmek için 300 µl DMEM eklenerek hücreler ependorf'lara toplanarak 2 dakika 2000 rpm' de santrifüj edilir. Üst sıvı atılarak 1ml % 70'lik etanol ile fiksasyon işlemi yapılır. Fiksasyon işleminden sonra 1 dakika 13000 rpm' de santrifüj edildikten sonra 1ml 1xPBS ile pellet homojenize edilerek 1 dakika 13000 rpm' de santrifüj edilir. Üst sıvı uzaklaştırılarak pellete 980 µl 1xPBS, 10 µl PI, 10 µl RNaz eklenerek iyice homojenize edilerek hücre akış sitometresinde okutularak analizi yapılmıştır.

3.2.11.2. Annexin V ve PI Boyaması

Meme kanseri MCF-7 ve MCF-7 Bcl-2 hücrelerine DENSpm ve paklitaksel'in farklı konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak Hücre devri analizi hedeflenerek; İnkübasyon süresi sonunda üst sıvılar atılarak hücreler 1xPBS ile yıkanarak hücrelerin kalkması için 300 µl Tripsin eklenerek 3 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler kalktıktan sonra Tripsin'in etkisini yok etmek için 300 µl DMEM eklenerek hücreler ependorf'lara toplanarak 2 dakika 2000 rpm' de santrifüj edilerek ependorflara toplanan hücrelerin üzerine 300 µl İnkübasyon Tamponu, 3 µl Annexin V, 3 µl PI boyası uygulanarak 15 dakika 37 °C'de inkübe edilir. İnkübasyon sonunda okutularak analizi yapılmıştır.

3.2.12. Total Protein İzolasyonu

100 mm'lik petrilere $1,5 \times 10^5$ hücre ekilmiştir. Yapışan hücrelere DENSpm (20 µM), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları 24 ve 48 saat hücrelere uygulanmıştır. Hücreler 1X PBS ile toplanarak 2 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlem etrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalıyıcıda inkübe edildikten sonra 20 dakika 13200 rpm de +4 °C de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni ependorfa alınarak miktar tayini yapılmıştır.

3.2.13. Bradford Protein Miktar Tayini

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır [112]. Konsantrasyonu 1,5 µg/µl olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri şu şekilde hazırlanmıştır: 1,5 µg/µl, 3 µg/ µl, 4,5 µg/µl, 6 µg/ µl, 7,5 µg/µl BSA'nın üzerine Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 µg/µl alınarak aynı

dalga boylarında absorpsanları belirlenmiştir. Standartların absorpsan/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorpsan değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.14. İmmunoblotlama Yöntemi

3.2.14.1. Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE’de Yürütülmesi

İmmunoblotlama yöntemi için Laemmli tamponu (4x) ve 30 µg protein örnekleri 1:3 oranında karıştırılarak 95°C’de 5 dakika tutulmuştur. %4 yükleme ve %12’lik ayırma SDS-PAGE hazırlanarak, proteinler bu jel sistemine yüklenmişlerdir ve jel sistemindeki ilk kuyuya daima protein belirteç yüklenerek 100 V’de 2 saat yürütme tamponunda yürütülmüştür.

3.2.14.2. Membrana Transfer ve Bloklama

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli boyutunda kesilen poliviniliden florid (PVDF) membranlar jellerin altına konduktan sonra, membran ve jellerin her iki tarafına transfer tamponunda ıslatılmış filtre kağıtları yerleştirilmiştir. Jel, membran ve filtre kağıtları kasetlere yerleştirilerek 1,5 saat boyunca 350 miliamperde transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemi sonrası membranlar, 2 saat oda sıcaklığında, %5’lik yağsız süt tozu (%0.1 Tween20 içeren 1x TBS) içerisinde bekletilerek bloklama işlemi yapılmıştır.

3.2.14.3. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri

Süt tozu içerisinden alınan membranlar, 1x TBS-Tween ile 5 dakika olmak üzere 3 kez yıkandıktan sonra, primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Birincil antikorlar %5’lik yağsız süt tozu (% 0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilisyonlarda uygulanmışlardır:

Beta-aktin, PARP, kaspaz- 7, p21, Bcl-2, Bcl- xL, Bax, Bad, Bid, Mcl-1, Rb, p62, Beclin-1, Atg12, Atg7, Atg5, Atg-3, LC3A (CST, poliklonal anti tavşan), PAO SSAT (Santa Cruz, Denver), ODC, AZ, AZI (Prof. Chaim Kahana’nın (Weizmann Enstitüsü) hediyesi). Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:500-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:5000 aralığında çalışılmıştır.

Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 5’şer dakika boyunca 3 kez TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından, membranlar anti-tavşan ve

anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 10'ar dakikalık 3 TBS-Tween ve 10 dakikalık TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemiluminisans tampon (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 1 dakika muamele edilmiştir.

3.2.14.4. Bantların Görüntülenmesi

Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, röntgen kasetleri içerisine, streç filmle sarılarak yerleştirilmiştir. Membranların üzerine röntgen filmleri yerleştirilerek, elde edilen kemiluminisansın filme ekspozit olması için beklenmiştir. Film yıkama solüsyonu I, su ve film yıkama solüsyonu II ve su ile yıkanmış ve kurutulmuştur.

3.2.15. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini

1×10^6 sayıda hücre 60 mm'lik petri kaplarına ekilerek, bir gece boyunca 37 °C'de % 5'lik CO₂'li etüvde tutulmuşlardır. Hücrelere daha sonra 30 µM EBR uygulanmıştır. PA içeriklerinin belirlenebilmesi için öncelikle hücreler 1x PBS ile yıkanmış, daha sonra kazıyıcı yardımı ile kazınarak kaldırılmış ve santrifüj tüplerinde toplanmışlardır. Tüpler daha sonra 13200 rpm'de bir dakika boyunca çöktürülmüş ve benzoilasyon işlemine geçilmiştir.

500 µl trikloroasetik asit (TCA) hücre lizatının üzerine eklenerek cam tüplere alınmış ve daha sonra üzerine 1ml sodyum hidroksit eklenmiştir. 10 ml %50 benzoil klorid eklenmesinin ardından tüpler 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası tüpler tekrar 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. Örneklerin üzerine 1 ml 5 M sodyum klorür eklendikten sonra, her tüpe 2 ml dietileter eklenip vortekslenmiştir. Aşağıda kalan tabaka yeni mikrofüj tüplerine alınmış ve daha sonra bu tabakanın üzerine saf su eklenerek tüpler karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, kloroform içeren kısım yeni bir tüpe alınıp evaporatör yardımı ile cam tüplerde uçurma gerçekleştirilmiştir. Örneklerin üzerine 500 µl metil alkol eklenmiş ve elde edilen PA ekstraktı -20°C'de saklanmıştır.

PA analizleri yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak % 60'lık metanol kullanılmıştır. İnternal standart olarak diaminooktan kullanılmıştır. Kromatografiden çıkacak sonuçların analiz

edilmesinden önce PA standartları hazırlanarak cihazda okutulmuştur. Hazırlanan PA standartları aşağıdaki şekildedir:

- 1 mM Putresin: 8 mg Putresin hidroklorid (50 ml saf su ile)
- 1mM Spermidin: 12,7 mg Spermidin hidroklorid (50 ml saf su ile)
- 1 mM Spermin: 17,4 mg Spermin tetrahidroklorid (50 ml saf su ile)

Her analiz öncelikle hazırlanan standart örnekler yüklenerek başlanmıştır. Buna göre sırasıyla Putresin 6. dakikada, spermidin 13. dakikada, spermin ise 23. dakikada HPLC kolonundan çıkarak ultraviyole ışık altında görünürlüğü belirlenmiştir. Analiz edeceğimiz örneklerin yükleme hacimleri 50 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen verilerin PA değerleri protein bazında ifade edilmiştir.

3.2.16. MCF-7 hücrelerinde SSAT gen anlatımının Plazmit Aracılığı ile Arttırılması

3.2.16.A. SSAT geni içeren Plazmitlerin Çoğaltılması

SSAT cDNA klonlanmış olan cmv-SSAT ve pop-SSAT plazmitleri CaCl₂ ile kompetant hale getirilen *E.coli DH5* bakteri suşlarına transforme edilmiştir. 25 ml steril 2 YT sıvı besi yerine ekilmiş olan *E.coli DH5* suşu 600 nm dalga boyunda OD 0.2-0.4 olana kadar 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İstenilen OD ulaşıncı falkonlar 5000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır. Pellet 12.5 ml soğuk 0.1 M MgCl₂ ile homojenize edildikten sonra 30 dakika buzda inkübe edilmiştir. Aynı işlem bir kere daha tekrar edilmiş ve 5 000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilip, pellet 150 µl gliserol, 850 µl 0.1 M CaCl₂ karışımı homojenize edilerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.16.B. Transformasyon

Kompetant hale getirilen *E.coli DH5* hücrelerine 100 ng cmv SSAT (2.6) ve pop SSAT (2.6) plazmitleri ısı şoku yöntemi ile transforme edilmiştir. 100'er µl kompetant *E.coli DH5* 100'er ng cmv SSAT (2.6) ve pop SSAT (2.6) plazmitleri eklenmiş ve 30 dakika buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben 42 °C'de 1 dakika tutulan suşlar, 5 dakika buzda bekletilmiştir. SOC besi yeri ile 37 °C'de büyütülen plazmitleri alan bakteri suşları inkübasyonu takiben 100'er µl olacak şekilde amfisilin içeren L-Broth (LB) katı besi yerine ekilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.

3.2.16.C. SSAT geni içeren Plazmitlerin İzolasyonu (Miniprep kit)

LB katı besi yerinde çoğalan her bir koloni sıvı besiyerine ekilmiş ve 37 °C’de bir gece inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerindeki bakteriler 15 dakika 6000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak pelletin üzerine 250 µl P₁, 250 µl P₂ ve 350 µl N₃ solüsyonu eklenerek pellet iyice çözündürülmüştür. Çözülen pellet temiz eppendorfflara alınmıştır. 10 dakika +4°C’de 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı kolonlara alınarak kapatılarak 1 dakika +4°C’de 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak pelletin üzerine 500 µl PB eklenerek 1 dakika +4°C’de 13000 rpm’de santrifüj edilir. Üst sıvı atılarak pelletin üzerine 750 µl PE eklenerek 1 dakika +4°C’de 13000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak pelletin üzerine 50 µl EB eklenerek 5 dakika buzda bekletilir 1 dakika +4°C’de 13000 rpm’de santrifüj edilir ve üst sıvı temiz eppendorfflara alınarak – 20’de saklanmıştır.

3.2.16.D. MCF-7 hücrelerine SSAT geni içeren Plazmitlerin Transfeksiyonu

6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yapışan hücrelere 500 ng (cmv+pop) SSAT geni 2/6 oranında DMEM-(FBS eklenmemiş) medyada hazırlanarak 900 µl DMEM+ (FBS eklenmiş) ile uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda DENSp_m (20 µM), paklitaksel (30 nM) ve ikili ilaç kombinasyonları uygulanmıştır.

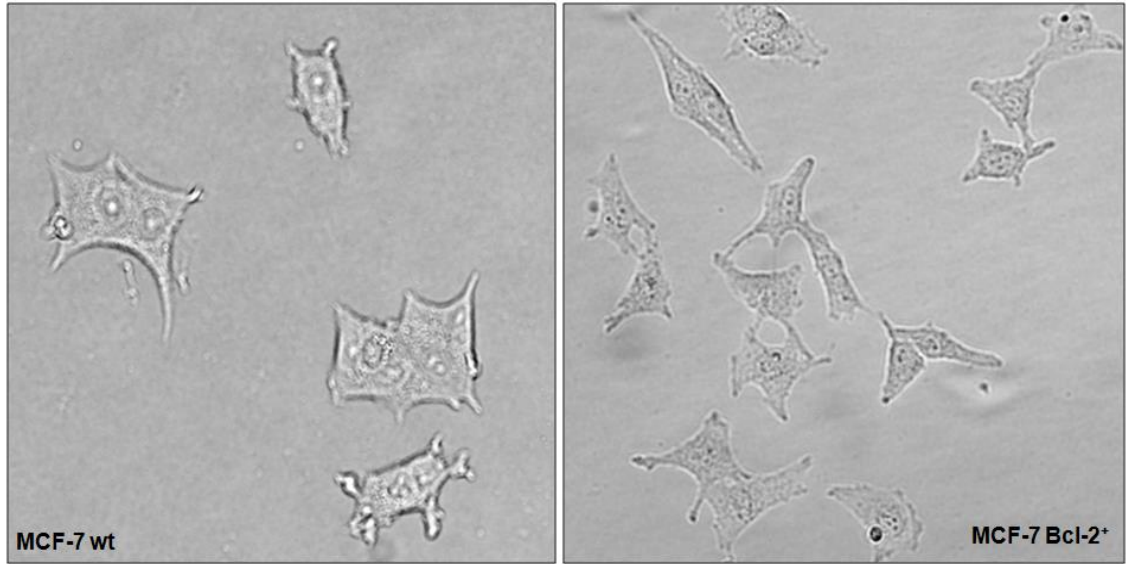
3.2.17. İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Veriler Graph Pad 4.04 istatistik programı ile analiz edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında bağımsız t testi kullanılmış ve anlamlı değişimler için p değeri < 0.05 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Meme Kanseri Hücre Hatları

MCF (Michigan Cancer Foundation) 1973'te Herbest Soule ve arkadaşları tarafından kurulan kanser enstitüsüdür. MCF-7 kanser hücreleri ilk 1970 yılında 69 yaşındaki bir kazak kadından alınarak izole edilmiş olup, östrojen pozitif hücrelerdir. Bu hücrelerin bölünme süreleri 29 saattir ve ışık mikroskobu ile çekilen morfolojik görüntüleri aşağıda verilmiştir. Ayrıca aşağıdaki şekilde sağda verilmiş olan hücreler ise tez süresince kullanılan Bcl-2 plazmiti transfekte edilerek Bcl-2 gen anlatımı arttırılan MCF-7 meme kanseri hücreleridir (Şekil 20).

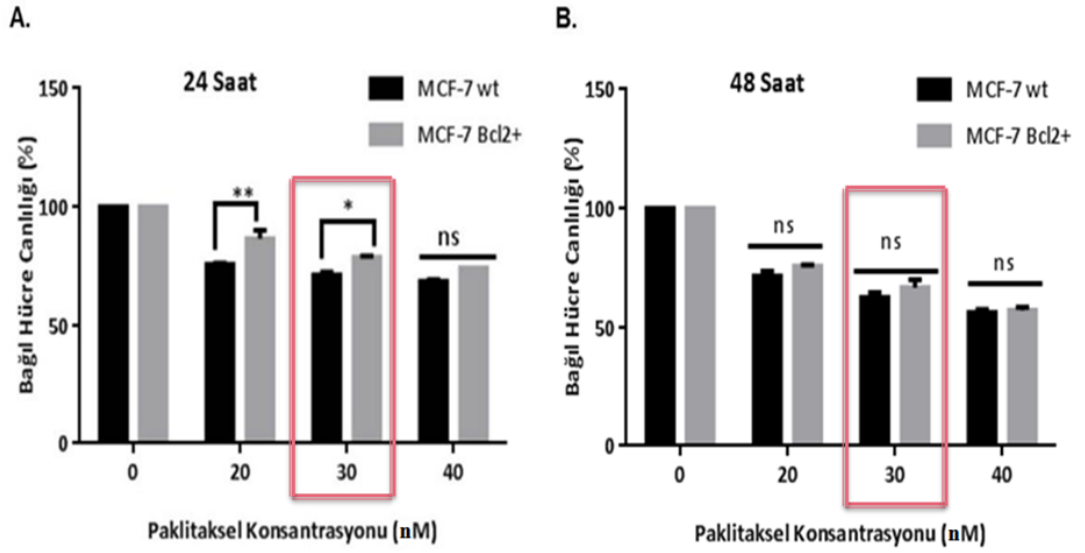


Şekil 20. MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinin morfolojik yapısının ışık mikroskobunda gösterimi (Büyütme: 20x).

4.2. DENSp_m ve paklitakselin hücre canlılığı üzerine etkisinin MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2 + hücrelerinde gösterilmesi

DENSp_m, paklitaksel ve ikili ilaç uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisini gösterebilmek amacıyla MTT testi ile hücre canlılığı analizi yapılmıştır. Her bir hücre hattı için farklı paklitaksel (20, 30, 40 nM) dozlarına ve zamana bağlı ilaçların uygulaması yapılmıştır. Paklitakselin doza bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi hem MCF-7 wt hem de MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinde MTT testine göre irdelenmiştir. MTT testi sonucuna göre 30

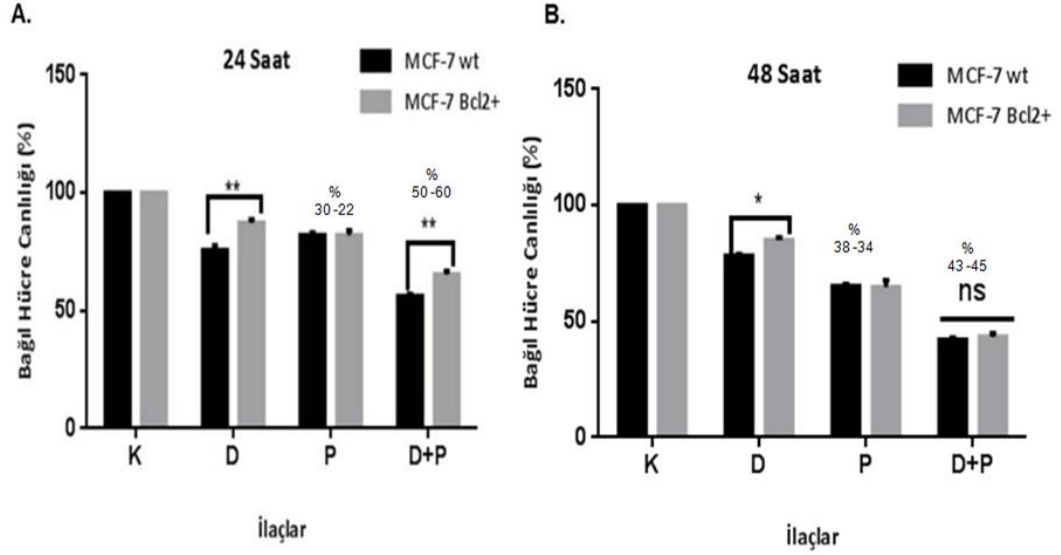
nM paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde % 30 (P: 0,034), MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 22 (P: 0,038) hücre canlılığını düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 21A). 48 saat 30 nM paklitaksel uygulanması sonucunda; MCF-7 wt hücrelerinde hücre canlılığını % 38 düşürürken, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise hücre canlılığına % 34 ket vurduğu belirlenmiş ve MCF-7 Bcl-2 hücrelerinde paklitaksel'e karşı direncin 48 saat uygulanma ile kırıldığı tespit edilmiştir (Şekil 21B). Yaptığımız MTT deneyi analizine göre 30 nM paklitakselin meme kanseri her iki hücre hattı üzerinde de hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir.



Şekil 21. Paklitaksel uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. Paklitaksel (20, 30, 40 nM) A) 24 ve B) 48 saat boyunca uygulaması. (* p<0,05,** p<0,001).

20 μ M DENSpM 24 saat uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde hücre canlılığını % 20 düşürürken, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde bu etkinin % 10 oranında olduğu belirlenmiştir (Şekil 22A). 20 μ M DENSpM 48 saat uygulanması sonucunda; MCF-7 wt hücrelerinin hücre canlılığı % 22, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 15 oranında azalttığı belirlenmiştir. PA analogu olan DENSpM ile beraber 30 nM paklitaksel uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisine bakıldığı zaman ise kombine ilaç uygulamasının 24 saat uygulama sonunda MCF-7 wt hücrelerinde hücre canlılığına % 60 oranında ket vururken, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ilaç etkinliği %50 olarak belirlenmiştir (Şekil 22A). 48 saat ikili ilaç uygulaması

sonucunda MCF-7 wt hücrelerinin hücre canlılığı % 43, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 45 oranda olduğu belirlenmiştir. 48 saat ikili ilaç uygulamasının tek başına DENSp_m ve paklitaksel uygulamasına kıyasla her iki hücre hattında da hücre canlılığını 24 saat ilaçların uygulamasına oranla daha anlamlı oranda azalttığı belirlenmiştir (Şekil 22B).

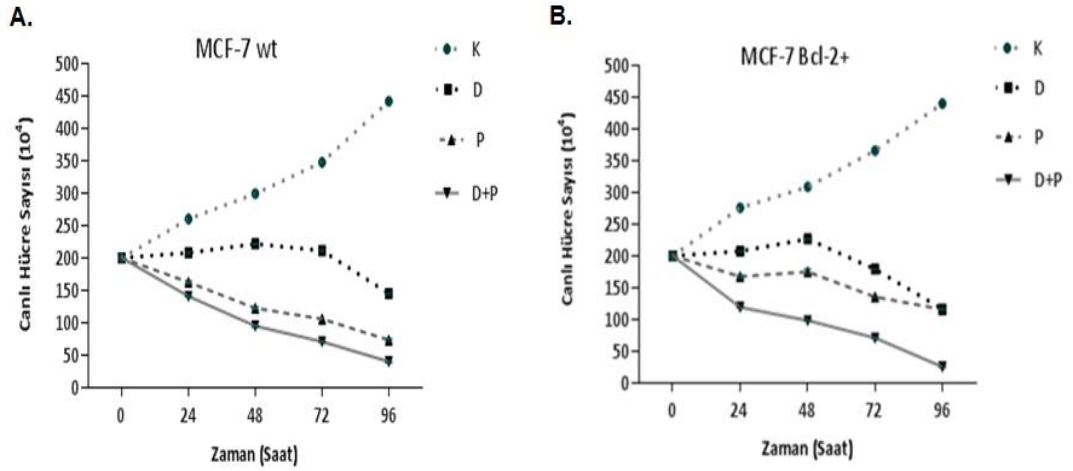


Şekil 22. DENSp_m ve paklitaksel uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi. Paklitaksel (30 nM) ve DENSp_m (20 µM) A) 24 ve B) 48 saat boyunca uygulanmıştır. (* p<0,05,** p<0,001) (K: Kontrol, D: DENSp_m, P: Paklitaksel, D+P: DENSp_m + Paklitaksel)

4.3. DENSp_m ve paklitakselin hücre sağ kalımı üzerine etkisinin gösterilmesi

MTT testi sonucunda seçilen 20 µM DENSp_m ve 30 nM paklitaksel doz oranlarının etkinliğinin irdelenmesi amacı ile artan zaman (24, 48 ve 72 saat) aralıklarında hücrelere DENSp_m ve paklitaksel uygulamasının hücre sağ kalımı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hücreler tripan mavisi boyası ile boyanarak canlı hücreler ve ölü hücreler sayılmıştır. 24 saat DENSp_m'in uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre hücre büyümelerini durduğu fakat 48 ve 72 saatte her iki hücre hattında da canlı hücre sayısı oranının azaldığı belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat paklitaksel uygulamasının her iki hücre hattında da canlı hücre sayısını azalttığı belirlenmiştir. Artan zaman aralıklarında ilaçların kombinasyonlarının uygulamasının her iki hücre hattında da canlı hücre sayısını azalttığı saptanmıştır. Hücre sağ kalım analizi sonuçlarına göre

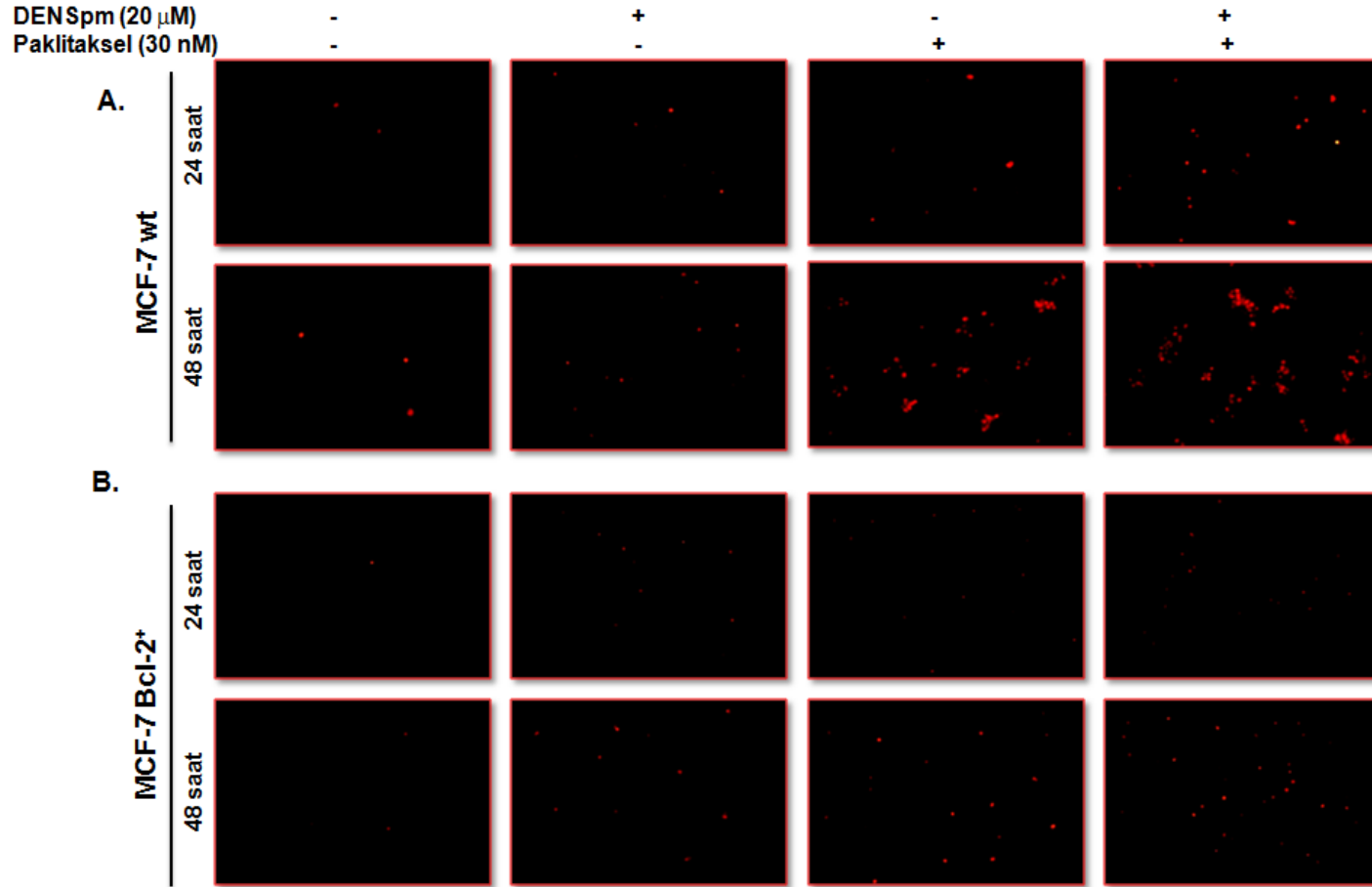
MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinin DENSp_m 24 saat uygulanmasının hücrelerin büyümelerini durdurduğu gözlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. DENSp_m ve paklitaksel'in hücre çoğalması üzerine etkisi. A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine DENSp_m (20 µM) ve paklitaksel (30 nM) uygulanarak zamana bağlı olarak inkübe edilmiştir (24-96 saat). Her 24 saatte hücreler tripsin ile kaldırılmış, sayılmıştır. (K: kontrol, D: DENSp_m, P: Paklitaksel, D+P: DENSp_m + Paklitaksel)

4.4. DENSp_m ve paklitakselin MCF-7 wt ve MCF7 Bcl-2+ hücrelerindeki hücre ölümü üzerine etkisinin PI boyaması ile gösterilmesi

DENSp_m (20 µM), paklitaksel (30 nM) ve ilaçların kombinasyonlarının uygulanmasının meme kanseri hücreleri üzerindeki hücre canlılığının azaltması etkisini gösterebilmek amacıyla ölü hücreleri boyayan PI floresan boyası kullanılarak DENSp_m ve paklitaksel'in zamana bağlı hücre ölümü üzerine etkisinin gösterilmesi hedeflenmiştir. 24 saat DENSp_m uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine oranla ölü hücre sayısının arttığı 48 saat uygulamasının ise daha fazla ölüme hücreleri götürdüğü belirlenmiştir. 24 saat paklitaksel uygulanmasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine ve sadece DENSp_m uygulamasına oranla ölü hücre sayısının arttığı 48 saat uygulamasının ise 24 saatten daha fazla hücre ölümü üzerinde etkili olduğu görülmüş ve bu etki 24 ve 48 saat paklitakselin DENSp_m ile beraber uygulanmasının sadece paklitaksel ve DENSp_m uygulanmasına göre daha fazla oranda hücre ölümüne neden olduğu PI boyaması ile tespit edilmiştir (Şekil24).

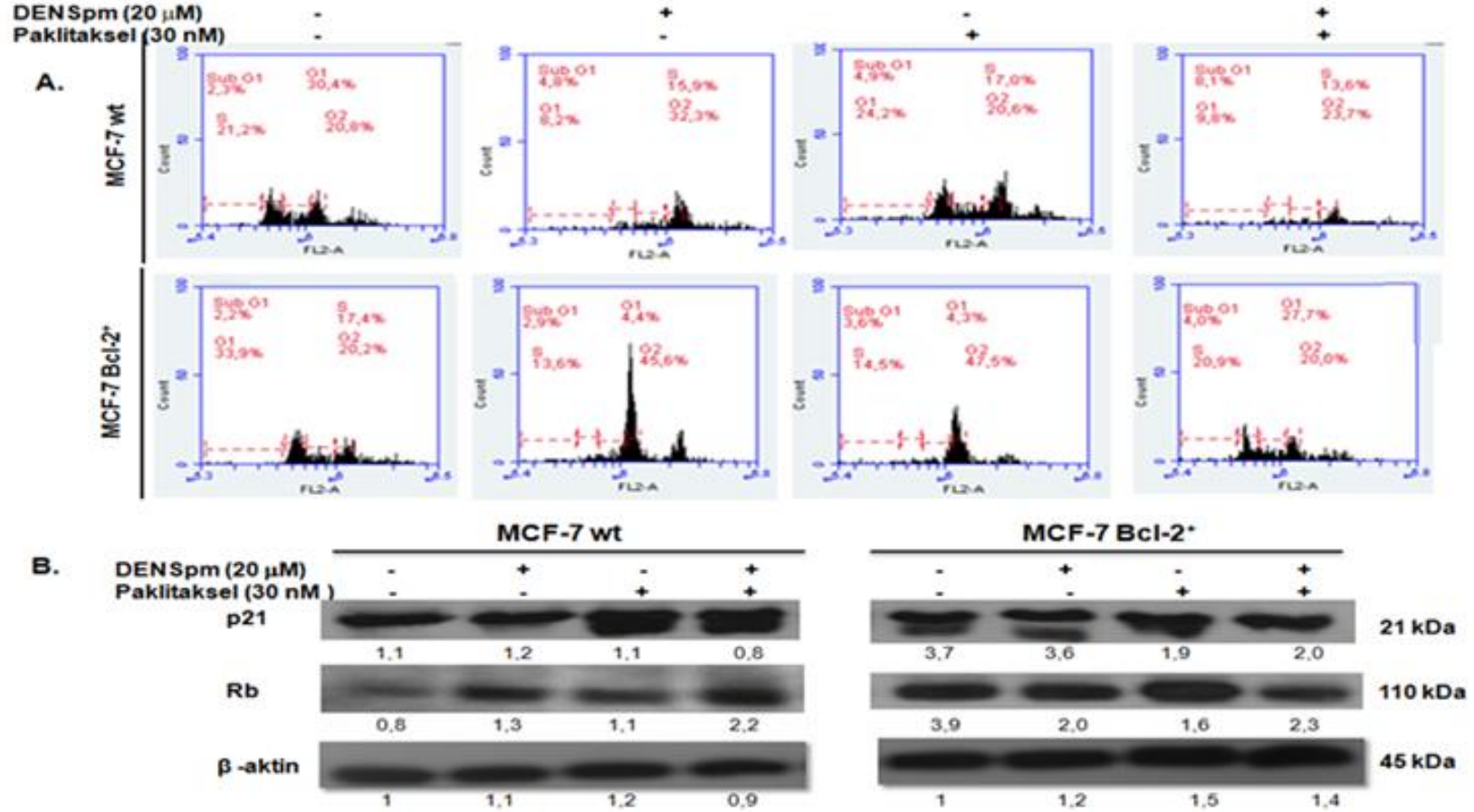


Şekil 24. DENSpm ve Paklitakselin zamana bağlı hücre ölümü üzerine etkisinin A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2 hücrelerinde Propidium İodide (PI) boyaması ile gösterimi.

4.5. Zamana bağlı DENSpM ve paklitaksel uygulamasının hücre döngüsü üzerindeki etkisinin gösterilmesi

DENSpM ve paklitaksel uygulanmasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsündeki değişimleri gösterebilmek amacıyla subG1, G1, S ve G2 fazlarındaki değişiklikleri hücre akış sitometresi yöntemi kullanılarak irdelenmiştir. Hücre akış sitometresi sonuçlarına göre; sub G1 oranının 24 saat DENSpM uygulanması ile MCF-7 wt hücrelerinde % 4,8, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 2,9 olduğu, paklitaksel uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde % 4,9 ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde %3,6 olduğu belirlenmiştir. İkili ilaç uygulamasıyla MCF-7 wt hücrelerde % 8,1 ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 4,0 olduğu belirlenmiştir (Şekil 25A).

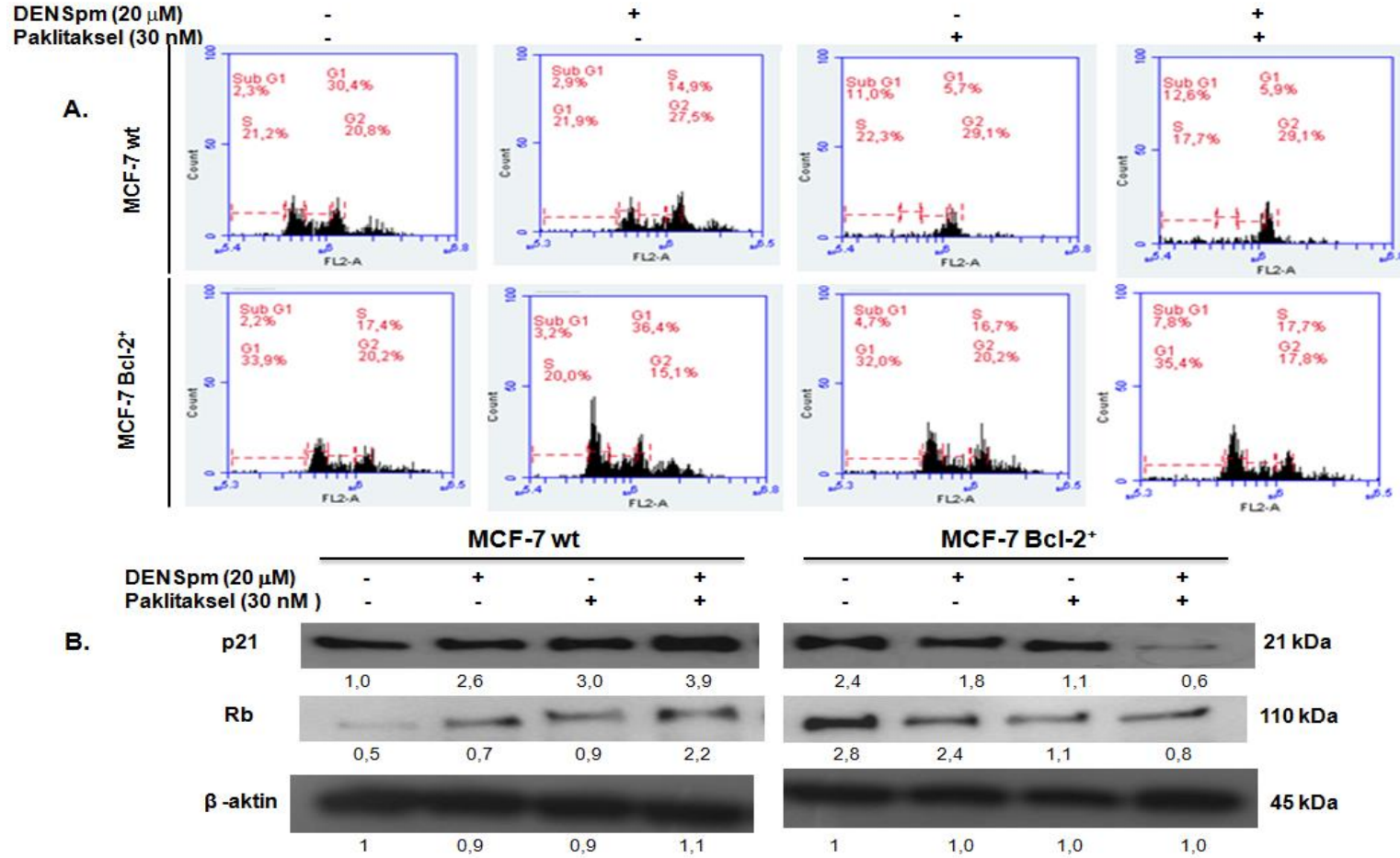
Hücre döngüsünde önemli rollere sahip olan p21 ve Rb proteininin hücrelerdeki anlatımı üzerindeki etkisinin irdelenmesi immünoblotlama yöntemi ile yapılmıştır. 24 saat DENSpM uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde p21 ve Rb proteininin anlatım ifadesini arttırırken, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise p21 ve Rb proteinlerinin anlatım ifadelerini azaltmakta olduğu gözlenmiştir. 24 saat paklitaksel uygulamasının her iki hücre hattında da p21 ve Rb proteinlerinin anlatımlarını arttırdığı görülmüştür. 24 saat ilaçların kombinasyonlarının uygulanmasıyla ise MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde p21'in anlatımını azalttığı Rb proteininin anlatımını ise MCF-7 wt hücrelerinde arttırırken, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kontrol hücrelere kıyasla anlatımının azaldığı saptanmıştır (Şekil 25B).



Şekil 25. DENSpm ve paklitakselin 24 saat uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2⁺ hücrelerinde hücre döngüsü üzerine ket vurucu etkisinin A) Hücre akış sitometresi ve B) İmmünoiblottama yöntemi ile gösterilmesi.

DENSp_m'in 48 saat uygulanmasının subG1 hücre popülasyonunu MCF-7 wt hücrelerinde % 2,9, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 3,2 olduğu, paklitaksel uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde % 11,0 ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 4,7'ye olduğu belirlenmiş ve ikili ilaç uygulamasıyla ise MCF-7 wt hücrelerinde % 12,6, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 7,8 olduğu belirlenmiştir (Şekil 25A). İlaçların beraber kullanılması ile subG1 oranının her iki hücre hattında da zamana bağlı anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Şekil 25-26A).

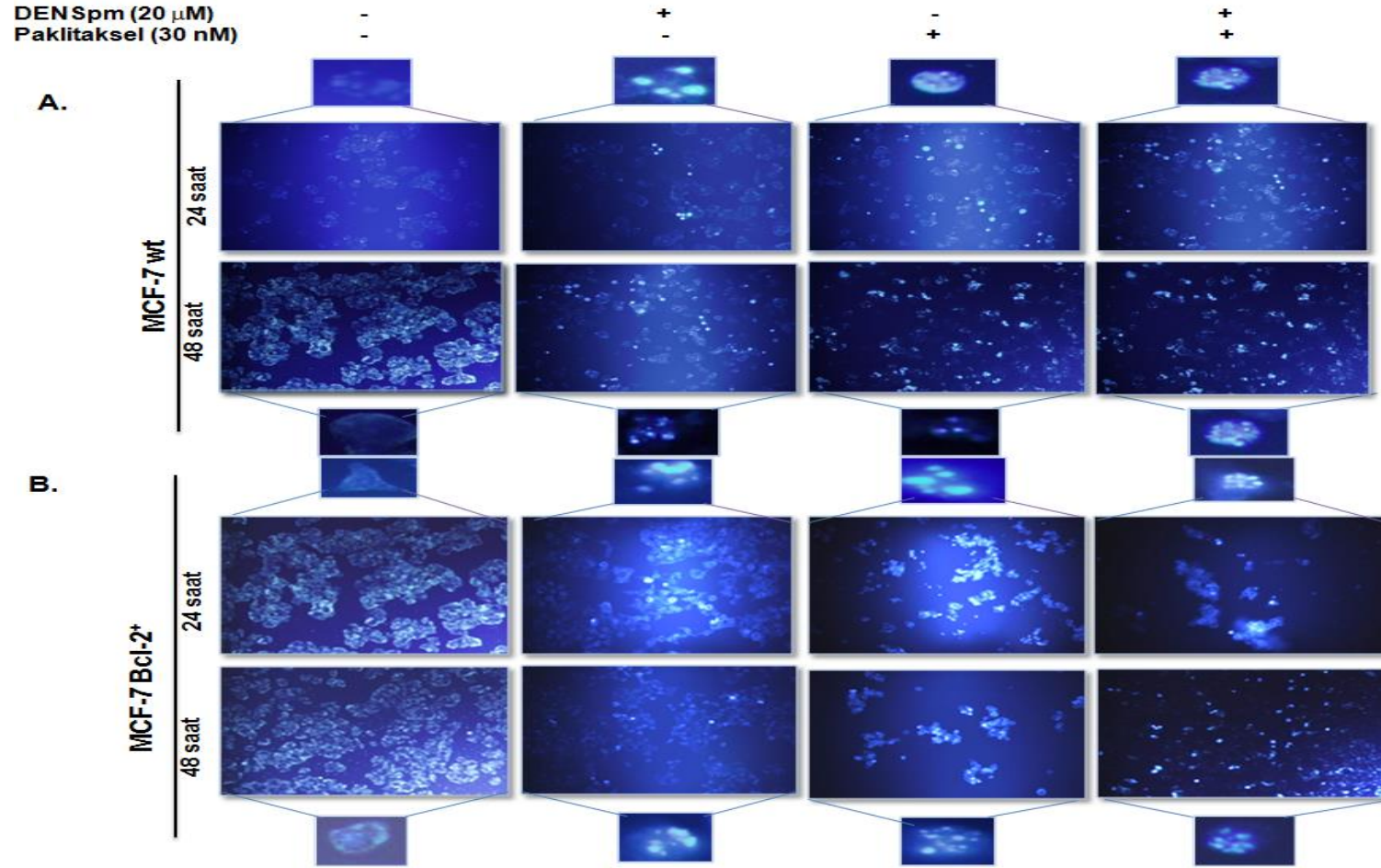
Hücrelerdeki p21ve Rb proteininin anlatım oranlarını 48 saat; DENSp_m uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde arttırırken MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaltmakta olduğu, paklitaksel uygulaması MCF-7 wt hücrelerinde arttırırken MCF-7 Bcl-2+ azaltmakta olduğu ve ilaçların kombinasyonlarının uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde arttırırken MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaltmakta olduğu belirlenmiştir (Şekil 26B).



Şekil 26. DENSpm ve paklitakselin 48 saat uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2⁺ hücrelerinde hücre döngüsü üzerine ket vurucu etkisinin A) Hücre akış sitometresi ve B) İmmünoiblottama yöntemi ile gösterilmesi.

4.6. DENSp_m ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki DNA kırıklarının oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi

DENSp_m, paklitaksel ve ikili ilaç kombinasyonlarının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik strese bağlı DNA fragmentlerinin oluşumundaki etkiyi gösterebilmek amacıyla DAPI boyaması yapılarak DNA fragmentlerinin ilaçlara göre değişimi belirlenmiştir. DENSp_m, paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde DNA fragmentlerinin 48 saat uygulamasının 24 saat uygulanmasından daha fazla olduğu ve ikili ilaç uygulanmasının her iki ilacın tek olarak uygulanmasından daha etkili olduğu belirlenmiştir. 24 saat ikili ilaç uygulaması MCF-7 wt hücreleri için DNA fragmentlerine neden olmuş olsada MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ancak 48 saat uygulamada bu etki görülmüştür (Şekil 27).



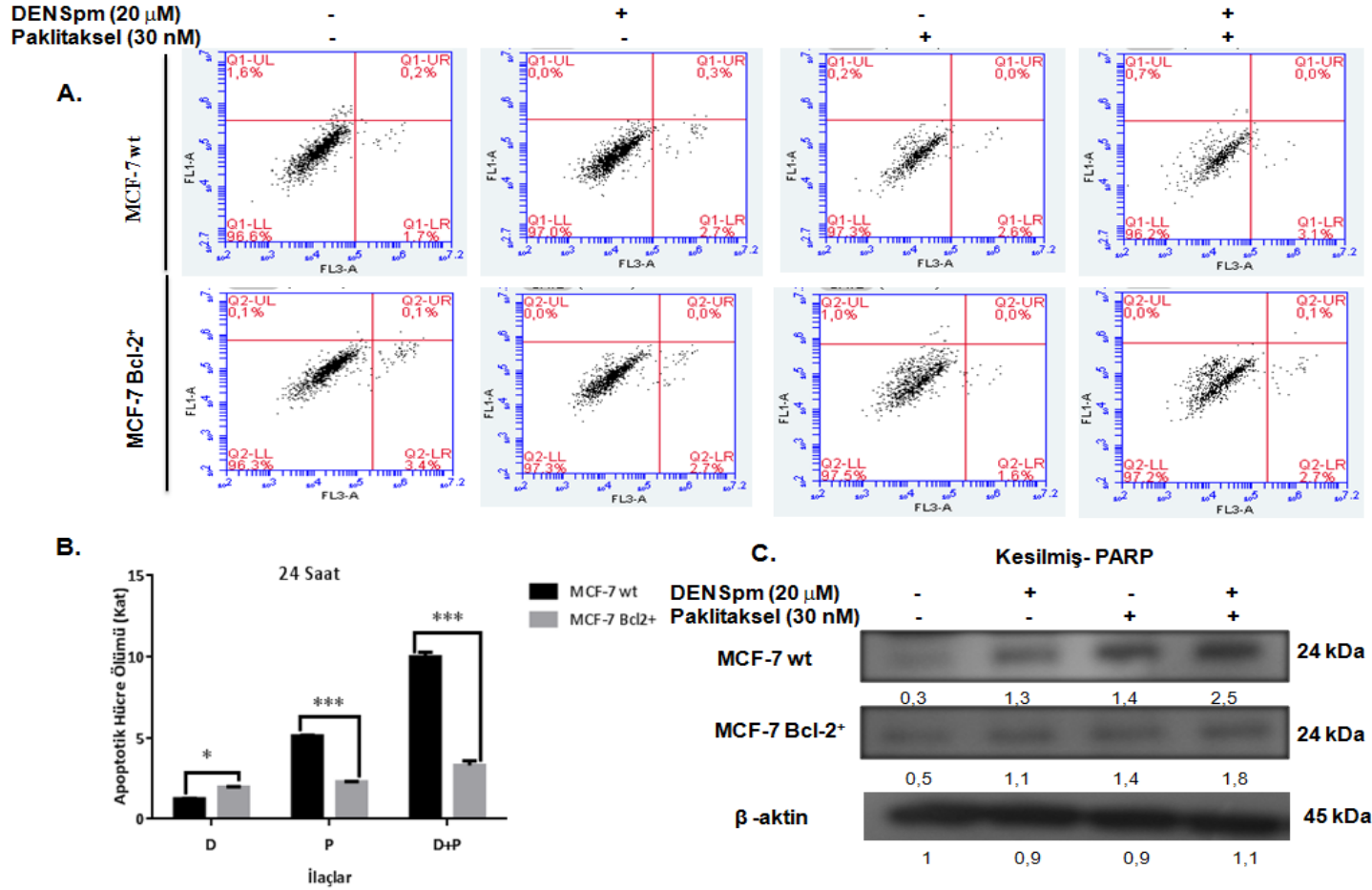
Şekil 27. DAPI boyaması ile DENSpm ve paklitaksel'in zamana bağlı DNA kondenzasyonu üzerine etkisinin gösterimi. A) MCF-7 wt B) MCF-7 Bcl-2+ (Büyütme: 20-40x).

4.7. DENSpm ve paklitakselin zamana bağlı uygulamasının meme kanseri hücrelerindeki apoptotik ölüm üzerine etkisinin gösterilmesi

DENSpm, paklitaksel ve kombinasyonları uygulamasının meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde meydana gelen apoptoz fazlarının tespit edilmesi için hücre akış sitometresinde Annexin/PI boyaması yapılarak analiz edilmiştir. 24 saat DENSpm uygulanması ile MCF-7 wt hücrelerinde erken apoptoz oranı % 2,7, MCF-7 Bcl-2+ % 2,7 olduğu, paklitaksel uygulamasıyla MCF-7 wt % 2,8, MCF-7 Bcl-2+'de % 1,6 olduğu ve ikili ilaç uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde % 3,1, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 2,7 olduğu belirlenmiştir (Şekil 28A).

MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki apoptotik ölüm oranlarının hücre akış sitometresindeki sonuçları teyyit edilmesi için ELİZA yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerdeki apoptotik ölüm oranı, 24 saat; DENSpm uygulanmış MCF-7 wt hücrelerinde 2 kat, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde 3 kat (P:0,0145) artmış, paklitaksel uygulaması ile MCF-7 wt 5 kat (P:<0,0001) ve MCF-7 Bcl-2+ 4 kat arttığı görülmüştür. İkili ilaç uygulamasında ise MCF-7 wt hücrelerinde apoptotik ölüm oranını 10 kat arttırırken MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde 5 kat (P:<0,0001) arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 28 B).

Meme kanseri hücrelerindeki apoptotik yolak üzerinde apoptotik bir belirteç olan PARP proteininin anlatımının ise immünoyotlama yöntemi ile irdelenmesi hedeflenmiştir. İlaç uygulanmamış hücelere kıyasla MCF-7 wt hücrelerin paklitaksel uygulanması ile PARP kırılımına ve bu etki DENSpm ile beraber paklitaksel uygulamasında PARP kırılımı artmıştır fakat MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde MCF-7 wt hücelerine oranla PARP kırılımı açısından daha az etki görülmüştür (Şekil 28 C).



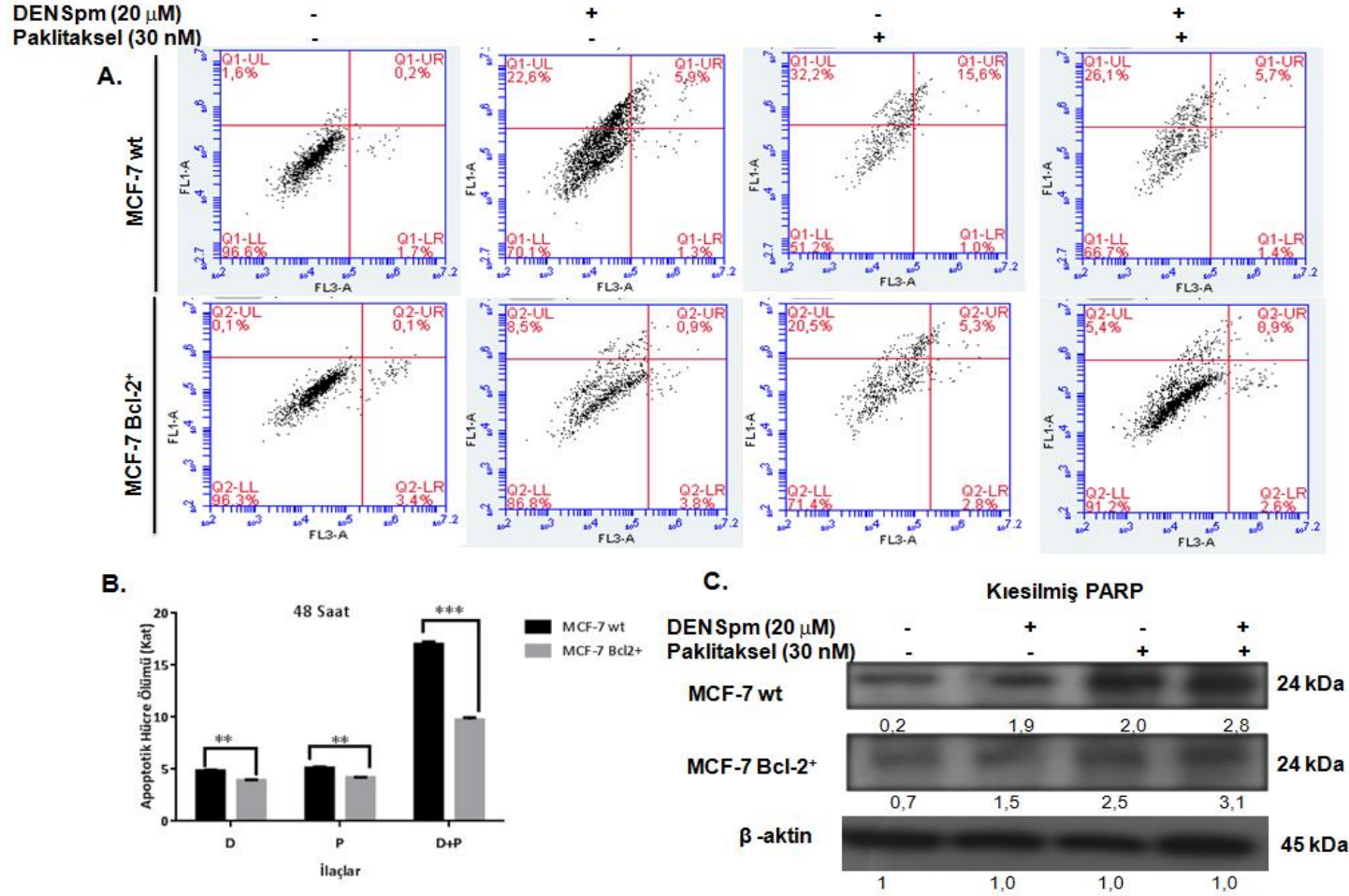
Şekil 28. DENSpm ve paklitaksel'in 24 saat uygulamasının apoptotic ölüm üzerine etkisinin gösterimi. A) Hücre Akış Sitometresi, B) ELİZA testi, C) İmmünoiblotlama.

Annexin/PI boyaması ile erken ve geç apoptotik ölüm irdelenmesinde, 48 saat; DENSPm uygulanması ile erken apoptoz oranının MCF-7 wt hücrelerinde % 1,3, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 3,8 olduğu, paklitaksel uygulaması ile MCF-7 wt hücrelerinde % 1,0, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 2,8 olduğu ve ikili ilaç kombinasyonları uygulanmasında ise MCF-7 wt hücrelerinde % 1,4, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 2,6 olduğu belirlenmiştir (Şekil 29A).

Hücrelerdeki apoptotik ölüm oranı, 48 saat; DENSPm uygulaması MCF-7 wt hücrelerinde 5 kat, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde 4,7 kat ($P:<0,0013$) arttığı, paklitaksel uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde 5,3 kat, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde 4,9 kat ($P:<0,0012$) arttırmış olduğu ve ikili ilaç uygulanmasıyla ise MCF-7 wt hücrelerinde 17 kat, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde 10 kat ($P:<0,0001$) arttırmış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 29B).

Hücrelerdeki PARP proteininin anlatım ifadelerine baktığımızda ise, kontrol grubu hücrelerine oranla 48 saat; DENSPm uygulamasıyla her iki hücre hattında da PARP kırılmalarının arttığı paklitaksel uygulamasıyla DENSPm'in etkisinden daha fazla PARP kırılmasına neden olduğu belirlenmiştir. İkili ilaç uygulanmasıyla ise PARP kırılmasının yalnız DENSPm ve paklitaksel uygulamasından daha fazla arttığı belirlenmiştir (Şekil 29C).

MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl2 + meme kanseri hücrelerinde 24 ve 48 saat ikili ilaç uygulamasının sadece DENSPm veya sadece paklitaksel uygulamasından daha fazla apoptotik ölüm üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 28-29).



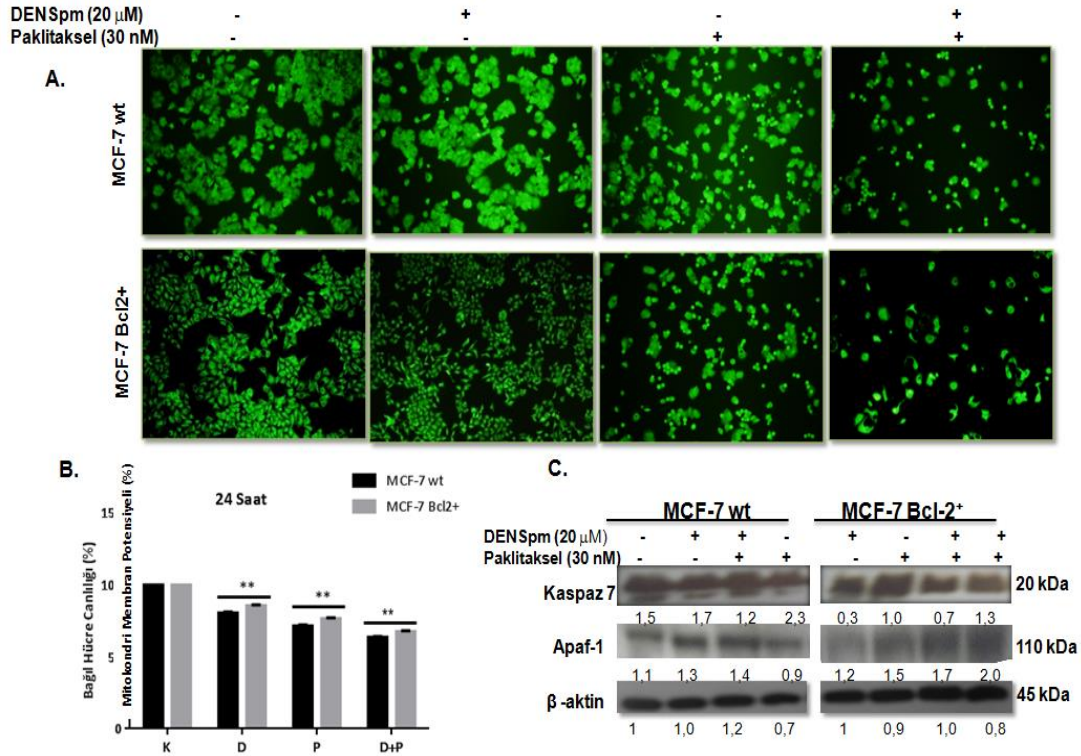
Şekil 29. DENSpm ve paklitaksel 48 saat uygulamasının apoptoz üzerine etkisinin gösterimi. A) Hücre Akış Sitometresi, B) ELİZA testi, C) İmmünoiblotlama

4.8. DENSp_m ve paklitakselin zamana bağlı meme kanseri hücrelerindeki mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisinin gösterilmesi

DENSp_m veya paklitaksel uygulanmasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinde DİOC₆ boyaması yapılarak mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına bağlı olarak hücre canlılığının irdelenmesi hedeflenmiştir. 24 saat; DENSp_m uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde kontrol hücrelerine ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine oranla daha fazla mitokondriyal membran potansiyeli kaybında artışa neden olduğu, paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde kontrol hücrelerine, DENSp_m uygulanan ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine oranla daha fazla mitokondriyal membran potansiyeli kaybına neden olduğu belirlenmiştir. Aynı zaman içerisinde ilaçların kombinasyonları MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kombine tedavinin kontrol gruplarına, sadece DENSp_m ve sadece paklitaksel uygulanan hücelere oranla mitokondri zar yapısında daha fazla bozulmalara neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 30A).

İlaçların uygulanması ile meydana gelen hücrelerdeki mitokondri membran potansiyelindeki değişiklikler floresandaki görüntüleri teyit etmek için florometre analizi sonuçlarına baktığımızda ise, 24 saat; DENSp_m uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde %19, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde %15, paklitaksel uygulaması ile MCF-7 wt hücrelerinde %29, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde %24 ve ilaçların kombinasyonunun uygulanması ile ise MCF-7 wt hücrelerinde %36, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde %33 oranda mitokondri membrane potansiyeli kaybına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 30B).

Uyguladığımız ilaçların apoptotik yolak üzerindeki önemli rollere sahip aktif kaspaz-7 ve Apaf-1 proteinlerinin anlatımı üzerindeki etkisini irdelenmesi hedeflenmiştir. Hücrelerdeki kontrol grubu hücrelerine oranla 24 saat; DENSp_m uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ kaspaz-7 ve Apaf-1 proteinlerinin anlatımını arttırdığı, paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde kaspaz-7 proteininin anlatımını azaltırken, Apaf-1 proteininin anlatımını arttırdığı görülmüş ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kaspaz-7 ve Apaf-1 proteinlerinin anlatımını arttırdığı saptanmıştır. Aynı zamanda combine tedavinin uygulanması ile MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kaspaz-7 ve Apaf-1 proteininin anlatımını anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 30C).



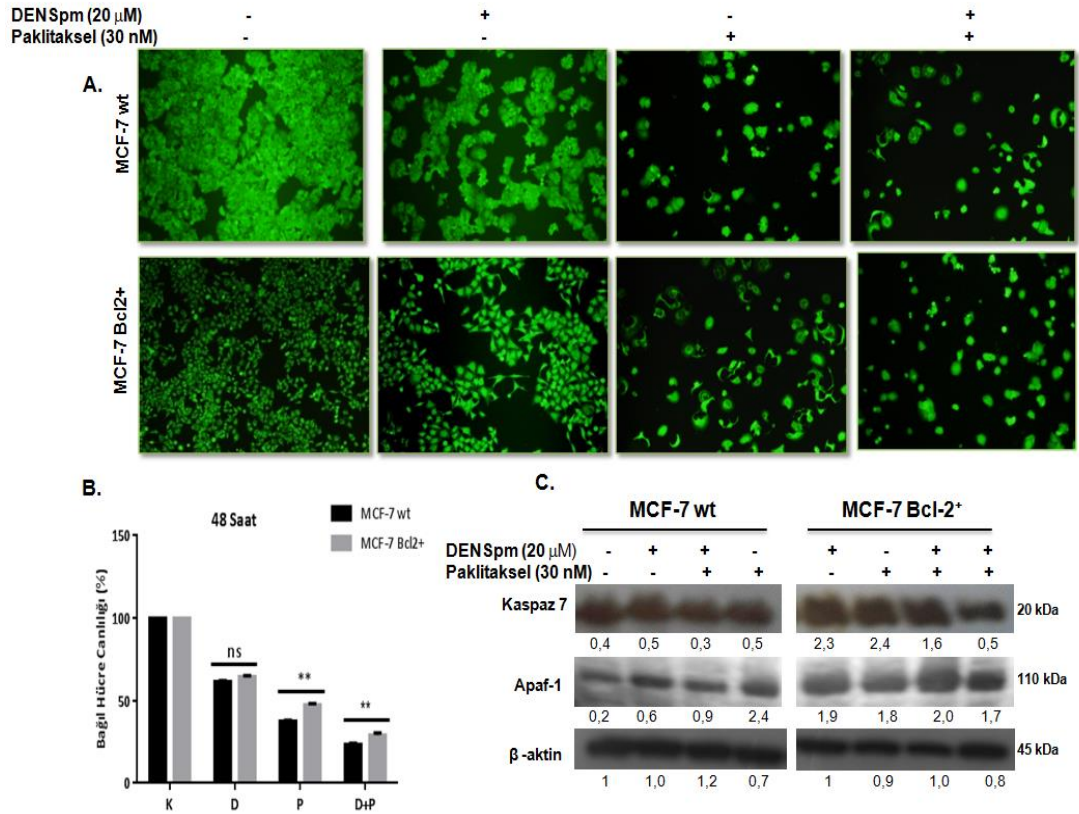
Şekil 30. DENSpm ve paklitaksel uygulamasının 24 saatte zamana bağlı mitokondriyal membran potansiyeli ve Kaspaz 7 ile Apaf-1 anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi. A) Floresan mikroskobu, B) Florometrik analiz ve C) İmmünoblotlama yöntemi.

48 saat; DENSpm uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde ilaç uygulanmamış ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinden daha fazla mitokondriyal membran potansiyelinde bozulma belirlenmiş, paklitaksel uygulamasıyla ise MCF-7 wt hücrelerinde, DENSpm uygulanan ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine oranla daha fazla mitokondriyal membranında bozulma olduğu, ikili ilaç uygulanmasıyla ise her iki hücre hattında da sadece DENSpm ve paklitaksel uygulamasından daha fazla mitokondri membran potansiyelindeki azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 31A).

48 saat; DENSpm uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde %39, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde %36, paklitaksel uygulaması ile MCF-7 wt hücrelerinde %63, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde %53 ve ilaçların kombinasyonunun uygulanması ile ise MCF-7 wt hücrelerinde %87, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde %83 oranda mitokondri membrane potansiyeli kaybına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 31B).

Apoptotik yolak üzerindeki proteinlerin anlatımlarında ilaç uygulanmamış hücrelerdeki anlatım oranlarına göre kaspaz-7 ve Apaf-1 proteinlerinin anlatımlarının 48 saat; DENSpM uygulamasıyla MCF-7 wt hücrelerinde kaspaz-7 ve Apaf-1 ifadelerinin arttırdığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kaspaz-7 ifadesini artırırken Apaf-1 ifadesini azalttığı görülmüştür. Paklitaksel uygulamasıyla ise her iki hücre hattında kaspaz-7 ve Apaf-1 proteininin anlatımını arttırdığı görülmüştür. Aynı zaman diliminde ikili ilaç uygulamasının MCF-7 wt hücrelerinde kaspaz-7 ve Apaf-1 proteinlerinin anlatımlarını arttırdığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kaspaz-7 proteininde artırırken Apaf-1 proteinlerinin anlatımını azalttığı saptanmıştır (Şekil 31C).

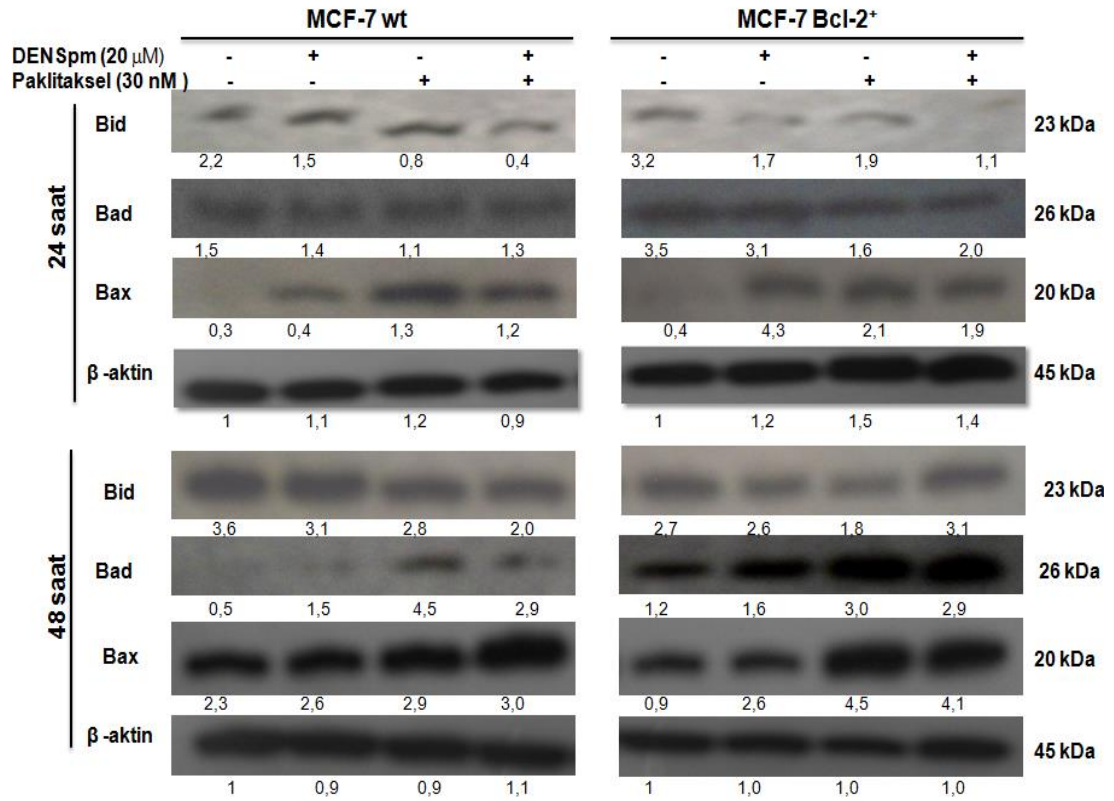
Uyguladığımız her iki ilacın kombine tedavisinin zamana bağlı olarak mitokondri membran yapısını bozarak intrinsik apoptotik ölümü uyardığı tespit edilmiştir (Şekil 30-31).



Şekil 31. DENSpM ve paklitaksel uygulamasının 48 saatte zamana bağlı mitokondriyal membran potansiyeli ve Kaspaz 7 ile Apaf-1 anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi. A) Floresan mikroskopunda gösterilmesi B) Florometrik analiz ve C) İmmünoyotlama yöntemi.

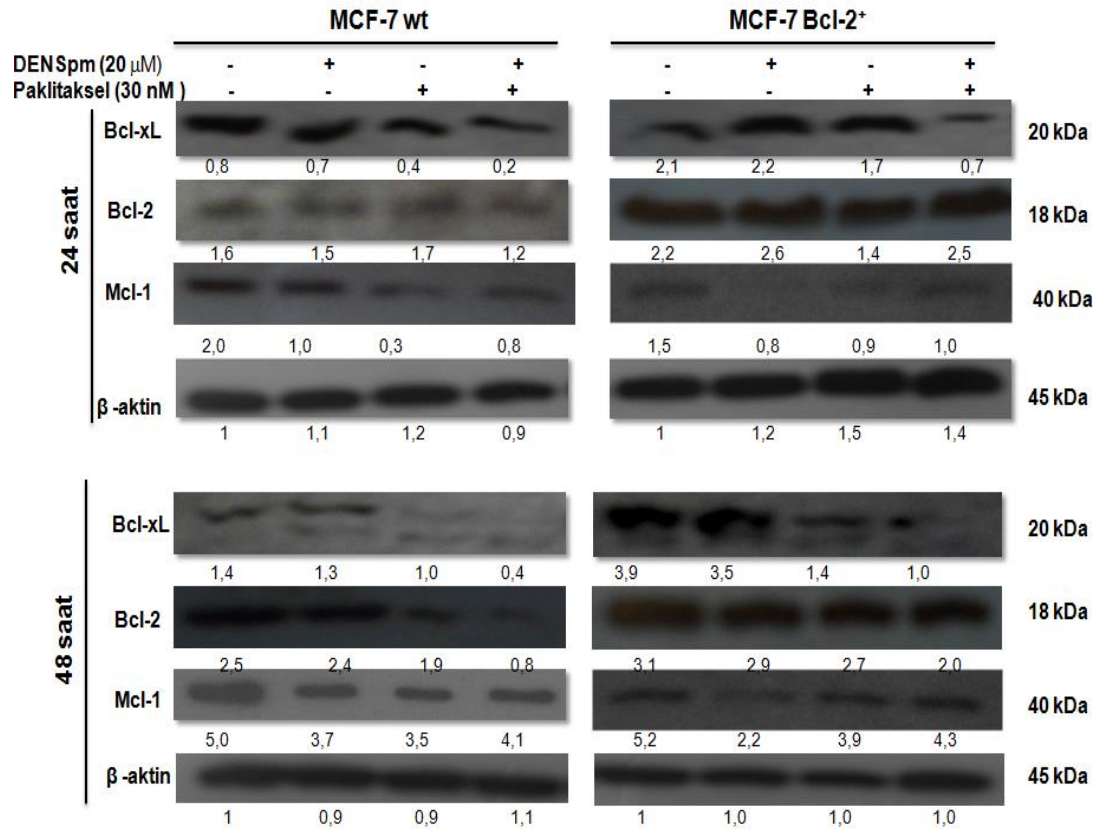
4.9. DENSPm ve paklitakselden kaynaklı apoptotik ölümdе Bcl-2 ailesi üyelerinin rolünün gösterilmesi

DENSPm, paklitaksel ve ilaçların kombinasyonlarının meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde Bcl-2 ailesindeki proteinlerin anlatımı üzerindeki etkisini irdelemek amacıyla immunoblotlama yöntemi kullanılmıştır. Pro-apoptotik proteinler olan; Bid, Bad, Bax proteinlerinin anlatım ifadeleri incelenmiştir. Proteinlerin anlatım ifadelerinin her iki hücre hattında da DENSPm ve paklitaksel uygulamasıyla Bid seviyesinin her iki zaman aralığında azaldığı Bax ifadesinin arttığı, Bad miktarının ise 24 saatte azaldığı 48 saatte arttığı belirlenmiştir. İlaçların kombinasyonlarının uygulanmasıyla Bid proteininin anlatımı 24 saatte her iki hücre hattında da azalırken 48 saat uygulamada MCF-7 wt hücrelerinde azalttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde arttığı, Bad proteininin anlatımını ise her iki hücre hattında 24 saatte azalırken 48 saat uygulamada arttığı ve Bax proteininin anlatımı ise her iki zaman aralığında artmıştır (Şekil 32).



Şekil 32. DENSPm ve Paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının pro-apoptotik protein anlatımları üzerine etkisinin gösterimi.

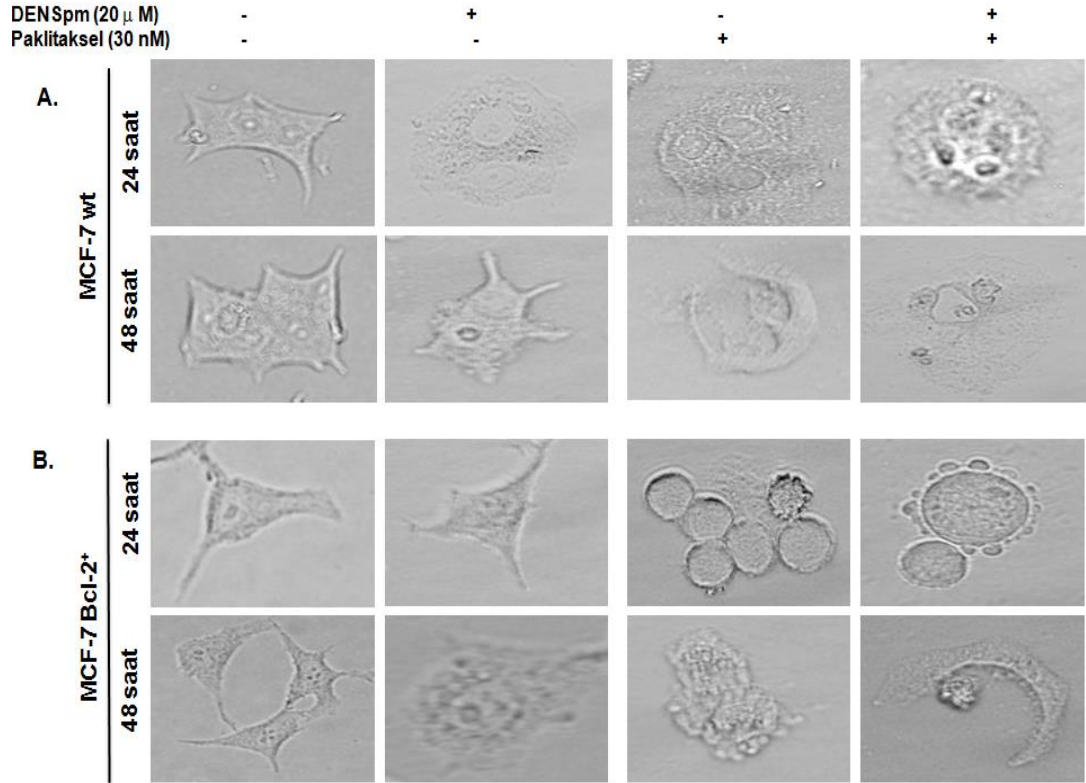
Anti-apoptotik proteinler olan; Bcl-xL, Bcl-2 ve Mcl-1 proteinlerinin anlatım seviyeleri incelenmiştir. DENSpM uygulamasının 24 saatte MCF-7 wt hücrelerinde Bcl-xL ve Bcl-2 anlatımının azaldığı görülürken MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde arttığı görülmüş ve 48 saatte her iki hücre hattında da azaldığı belirlenmiştir. Mcl-1 anlatımının ise her iki zaman aralığında da azaldığı belirlenmiştir. Paklitaksel uygulamasının Bcl-xL ve Mcl-1 anlatımının her iki zaman aralığında azaldığı, Bcl-2 anlatımının 24 saatte MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı ve 48 saatte her iki hücre grubunda da azaldığı belirlenmiştir. İlaçların kombinasyonlarının uygulanmasıyla Bcl-xL ve Mcl-1 anlatımlarının her iki zaman aralığında azaldığı, Bcl-2 anlatımının 24 saatte MCF-7 wt hücrelerinde azaldığı MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde arttığı ve 48 saat uygulamada ise her iki hücre grubunda da azaldığı belirlenmiştir (Şekil 33).



Şekil 33. DENSpM ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının anti-apoptotik protein anlatımlarının üzerine etkisinin gösterimi.

4.10. DENSpM ile paklitaksel uygulamasının otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi

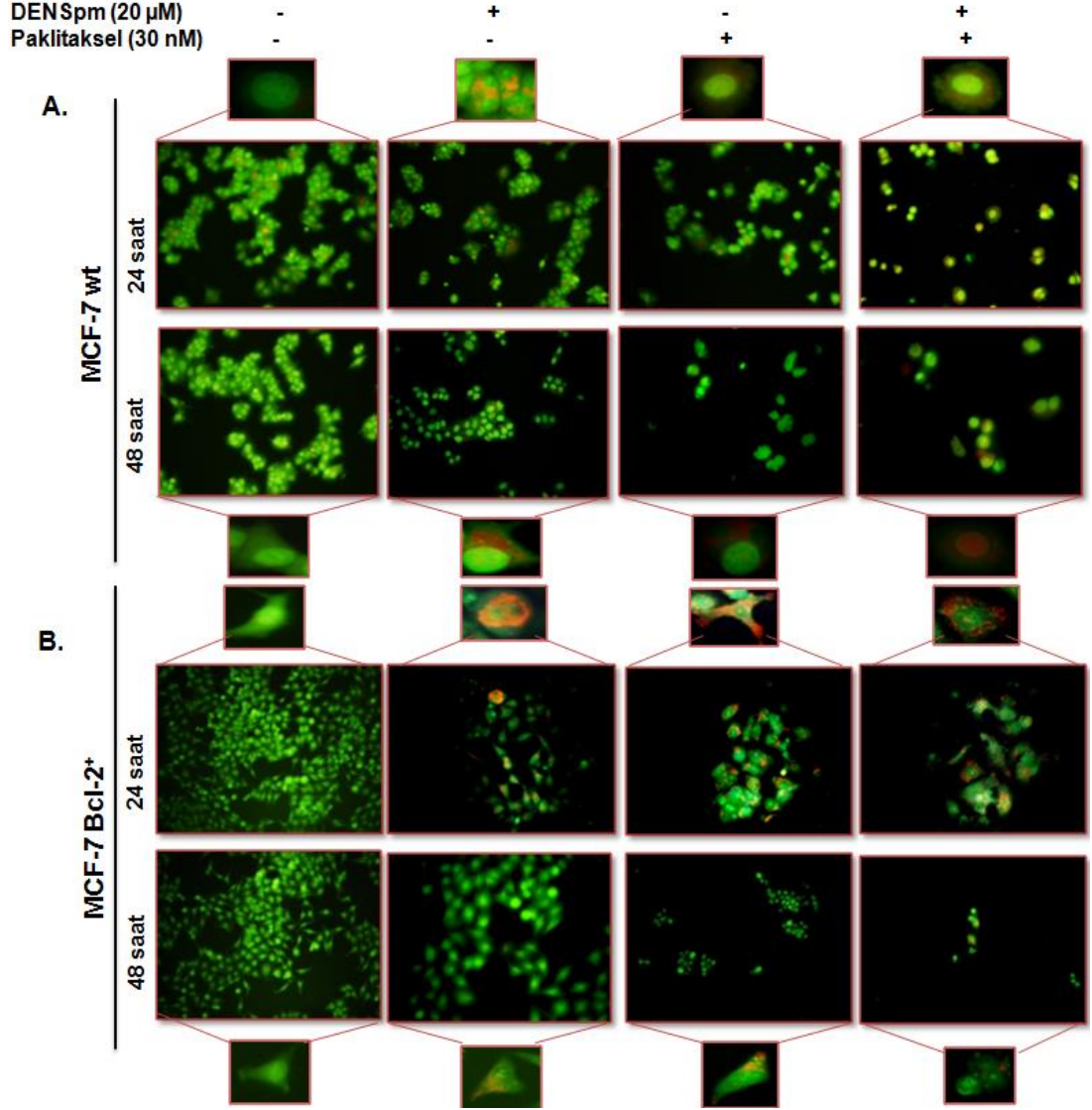
DENSpM, paklitaksel ve ilaçların kombinasyonlarının uygulaması meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinin morfolojisinde meydana gelen değişiklikler ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. DENSpM ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde 24 saatte hücrelerde vakuol oluşumunun arttığı ve 48 saatte ise vakuollerin azaldığı görülmüştür. İkili ilaç uygulamasının her iki hücre hattında da 24 saatte hücrelerdeki vakuol oluşumunu arttırdığı ve 48 saatte ise vakuollerin azaldığı görülmüş ve hücrelerin morfolojilerinin tamamen bozulduğu belirlenmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. DENSpM ve paklitakselin 24 ve 48 saat boyunca uygulamasının hücrelerin morfolojisi üzerine etkisinin ışık mikroskopu ile gösterimi. A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2+ (Büyütme: 40x).

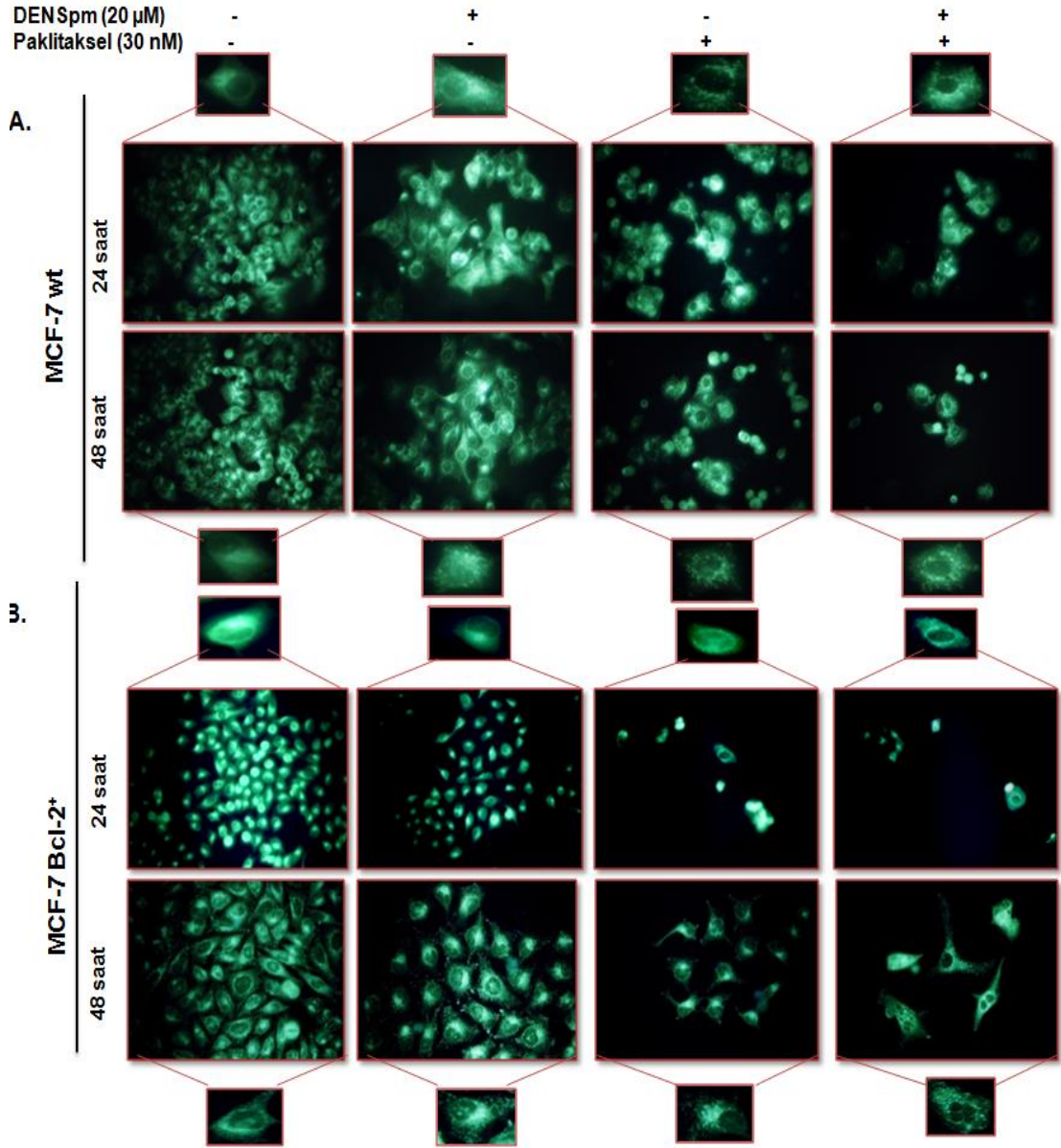
4.11. DENSpm ve paklitaksel uygulaması ile uyarılan asidik vakuol oluşumlarının otofajik boyalar ile gösterilmesi

DENSpm, paklitaksel ve kombinasyonlarının uygulamasıyla meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hürelerinde otofajik indikatörleri gösterebilmek amacı ile AO, MDC ve LysoTracker kırmızısı ile boyanarak floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. Kullanılan bu boyalar hücre içindeki lizozomların ve diğer asidik kısımlarının içine girerek buralarda protonlanır. Protonlanmış olan boya birikintileri floresan ışımalarla turuncu ve kırmızı ışımalar verir asidik olmayan kısımlar ise yeşil ışımalar meydana gelir bu şekilde asidik vakuoller belirlenir. DENSpm ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde kontrol 24 saatte hücrelerdeki asidik vakuolin oluşumunu arttırdığı ve 48 saatte ise vakuollerin oluşumunu engellediği belirlenmiştir. İkili ilaç uygulamasının ise her iki hücre hattında da sadece DENSpm ve sadece paklitaksel uygulanmasına oranla 24 saatte hücrelerdeki asidik vakuollerin arttırdığı, 48 saatteki uygulamanın vakuollerin oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Şekil 35).



Şekil 35. DEN Spm ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının lizozomlar gibi asidik vakuollerin üzerine etkisinin Akridin Turuncusu (AO) boyaması ile gösterimi. A) MCF-7 wt, B) MCF-7 Bcl-2+ (Büyütme: 20x-40x).

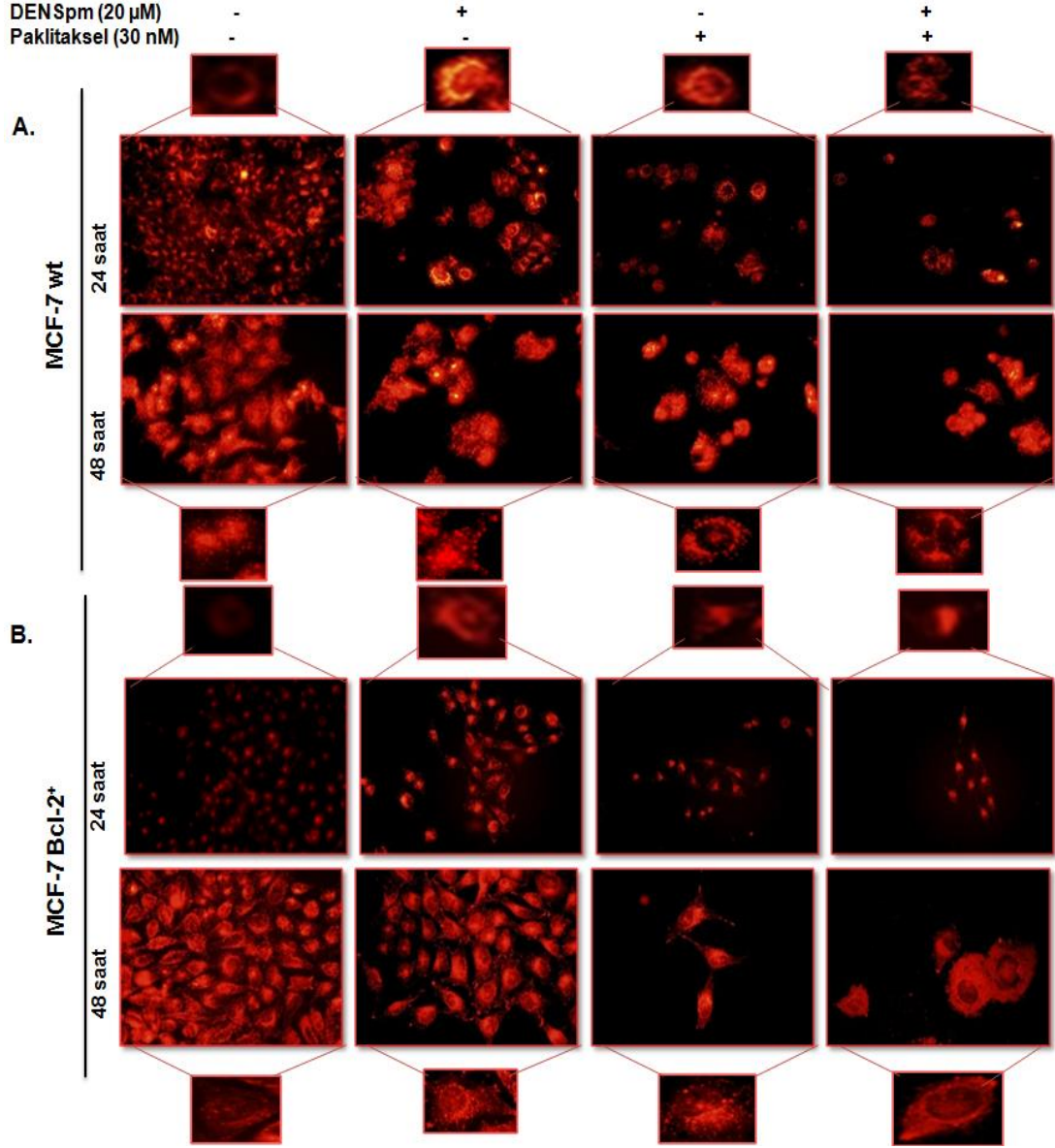
AO boyaması ile elde edilen sonuçlarından sonra otofaji tespitinde belirteç olarak görev yapan MDC boyaması ile sonuçlar tekrardan irdelenmiştir. MDC boyamasına göre MCF-7 wt hücrelerde 24 saat ilaç uygulamasının otofajik vakuol oluşumu üzerinde etkinliğinin az olması ile apoptotik ölümün artış gösterdiği 48 saatlik zaman süreci sonunda apoptotik ölümden etkilenmeden kalan az sayıda hücrede dot varlığı az da olsa belirlenmiştir. Ancak MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ilaçların apoptotik etkisine direnç oluşturan 24 saatte MDC ile boyanan dotlar belirlenmiştir. Bu dotların varlığı apoptotik etkinin artış gösterdiği 48 saatte 24 saate oranla azaldığı belirlenmiştir (Şekil 36).



Şekil 36. DEN Spm ve paklitaksel'in 24 ve 48 saat uygulamasının otofajik vakuoller üzerine etkisinin MDC boyaması ile gösterimi. A) MCF-7 wt B) MCF-7 Bcl-2+ hücreleri görüntüledi (Büyütme: 20x-40x).

AO ile MDC boyamasında elde edilen sonuçlardan sonra otofaji tespitinde belirteç olarak görev yapan başka bir boya olan Lyso Tracker kırmızı boyası ile sonuçlar tekrardan irdelenmiştir. Lyso Tracker kırmızı boyamasına göre MCF-7 wt hücrelerde 24 saat ilaç uygulamasının asidik vakuol oluşumu üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. İlaçların 24 saat uygulanmasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde apoptotik ölüme karşı geliştirdiği otofajik vakuollerin oluşumu

gözenmiş fakat ilaçların inkübasyon süresi 48 saate çıkardığında ilaçlara karşı geliştirilen direncin vakuol oluşumunun azalması ile kırıldığı belirlenmiştir (Şekil 37).



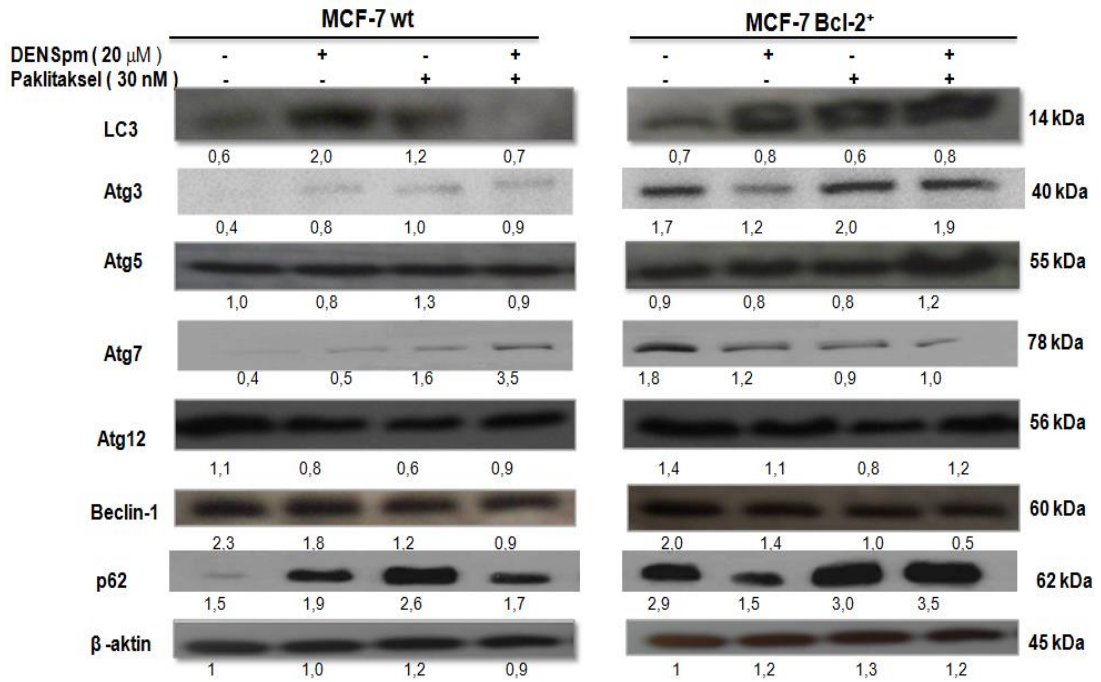
Şekil 37. DENSpM ve paclitaxel'in 24 ve 48 saat uygulamasının asidik vakuollerin üzerine etkisinin Lyso Tracker kırmızı boyaması ile gösterimi. A) MCF-7 wt B) MCF-7 Bcl-2+ hücreleri görüntülendi (Büyütme: 20x-40x).

4.12. DENSpM ve paclitaxel uygulamasının zamana bağlı olarak otofajik yolak üzerindeki etkisinin gösterilmesi

DENSpM ve paclitaxel uygulamasının zamana bağlı olarak meme kanseri hücrelerinin otofajik vakuollerin AO, MDC ve Lyso Tracker kırmızısı boyaması ile

belirlenmesinin ardından, otofajik yolakta görev alan LC3, Atg3, Atg5, Atg7, Atg12 ve Beclin-1 proteinlerinin anlatım seviyelerine bakılmıştır.

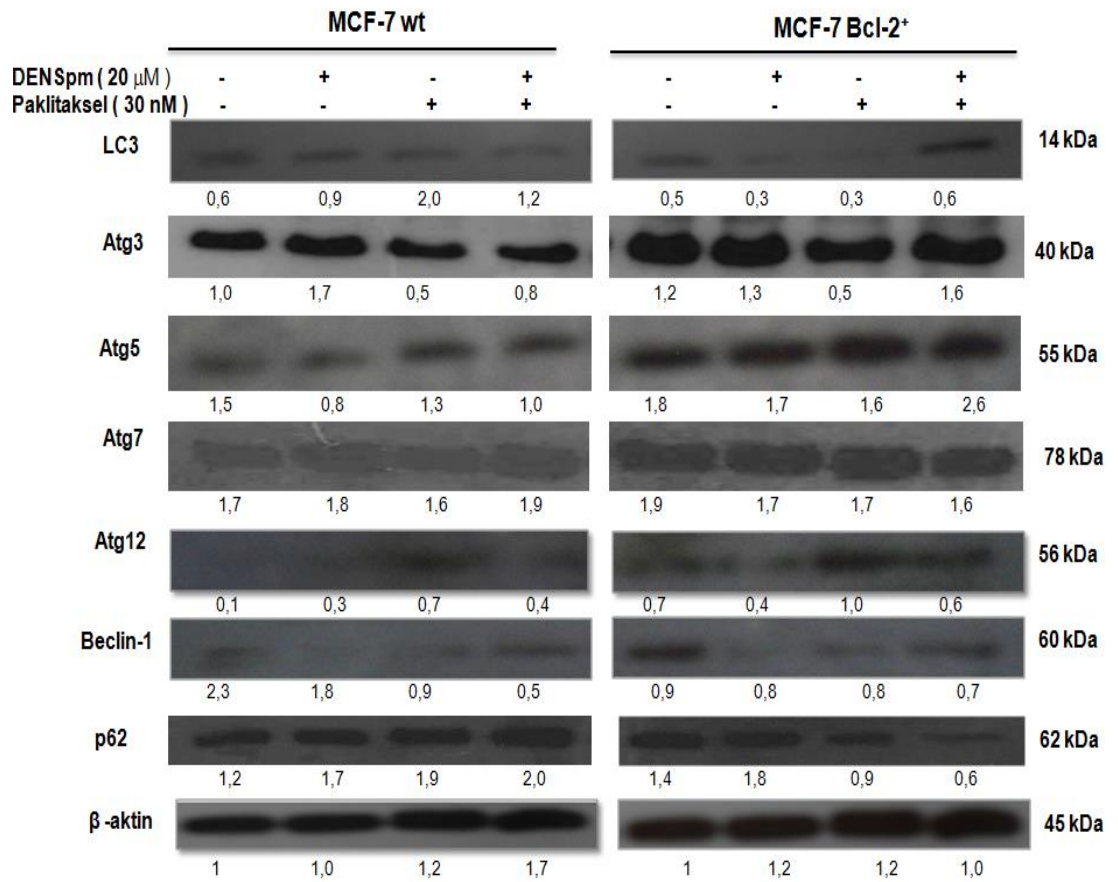
24 saat; DENSPm uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde LC3 ve p62 anlatımının arttığı, Atg12, Atg5 ve Beclin-1 anlatımının azaldığı, Atg3 ve Atg7 anlatımının ise MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı belirlenmiştir. Paklitaksel uygulamasının LC3, Atg5 ve Atg7 anlatımının MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı, Her iki hücre hattında da Atg12 ve Beclin-1 anlatımının azaldığı Atg3 ve p62 anlatımının ise arttığı belirlenmiştir. İlaçların kombinasyonlarının uygulamasıyla MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde LC3, Atg3 ve p62 anlatımının arttığı, Atg12 ve Beclin-1 proteininin anlatımının azaldığı, Atg5 anlatımının MCF-7 wt hücrelerinde azaldığı MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde arttığı, Atg7 anlatımının ise MCF-7 wt hücrelerinde arttığı MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 38).



Şekil 38. DENSPm ve paklitakselin 24 saat uygulamasının otofajik yolak protein anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi.

48 saat; DENSPm uygulamasının LC3, Atg7, Atg12 ve p62 anlatımının MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı, Atg3 anlatımının MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde değişmediği, Atg5 ve Beclin-1 anlatımının ise her iki hücre hatında da azaldığı belirlenmiştir.

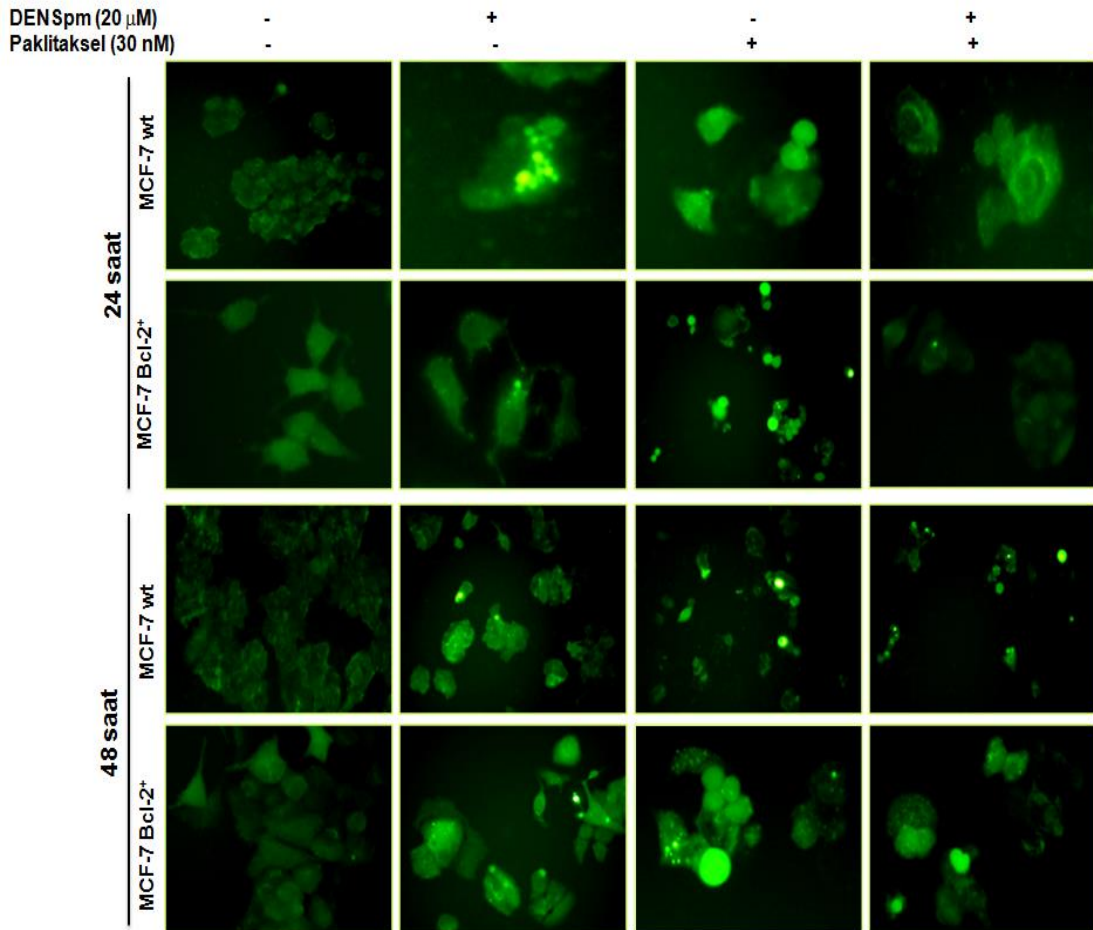
Paklitaksel uygulamasının her iki hücre hattında da Atg5, Atg7, Beclin-1 ve p62 anlatımının azalttığı, Atg12 anlatımının arttığı görülürken LC3 anlatımının MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı, Atg3 anlatımının ise MCF-7 wt hücrelerinde azaldığı MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde arttığı belirlenmiştir. İlaçların kombinasyonlarının uygulamasıyla ise her iki hücre hattında da LC3 anlatımının arttığı, Beclin-1 ve p62 anlatımının azaldığı, Atg3, Atg5 ve anlatımının ise MCF-7 wt hücrelerinde azaldığı MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde arttığı, Atg7 ve Atg12 proteininin anlatımını MCF-7 wt hücrelerinde arttırırken MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azalttığı belirlenmiştir (Şekil 39).



Şekil 39. DENSpm ve paklitakselin 48 saat uygulamasının otofajik yolak protein anlatımları üzerine etkisinin gösterilmesi.

4.13. DENSpm ve paklitaksel uygulamasının ROS üzerindeki etkisinin DCFH-DA boyaması ile gösterilmesi

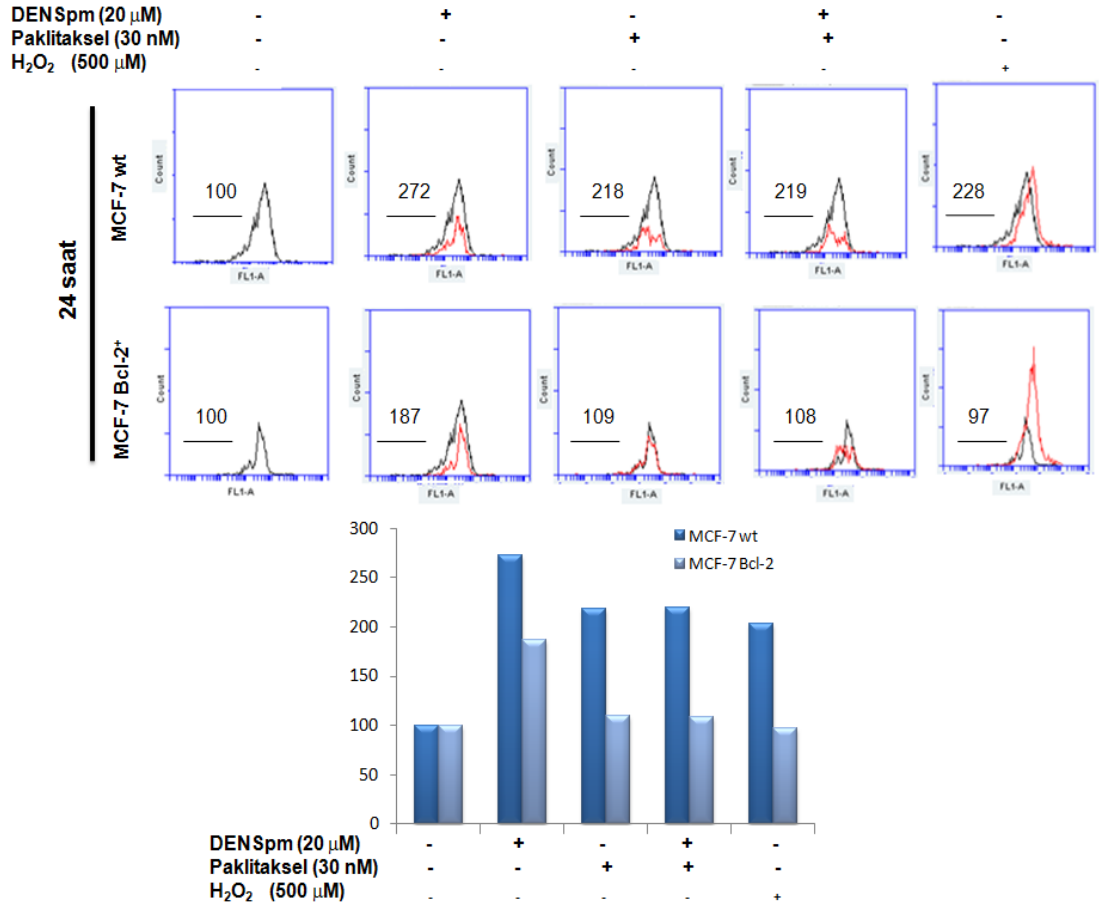
PA analogu olan DENSpm paklitakselin apoptotik etkisinin artırılmasında PA katabolizmasının aktivitesinin artırılmasına bağlı ROS oluşumu ile ilişkili olabileceği için DCFH-DA boyası ile floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. 24 ve 48 saat; DENSpm ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ROS oranının arttığı görülmüştür. İlaçların kombinasyonunun uygulanması ile her iki hücre hattında da sadece DENSpm ve sadece paklitaksel uygulanmış hücrelere oranla daha yüksek miktarda ROS oluşumunu arttırdığı görülmüştür (Şekil 40).



Şekil 40. DENSpm ve paklitakselin 24 ve 48 saat uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin DCFH-DA boyaması ile floresan mikroskopunda gösterilmesi.

Meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde DENSpm, paklitaksel ve ilaçların kombinasyonlarının uygulanmasının ROS üzerindeki

etkisinin floresan mikroskobu görüntülerinin irdelenmesi için hücre akış sitometresinde incelenmiştir. MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde 24 saat; DENSpM uygulamasıyla ROS oranının MCF-7 wt hücrelerinde % 272, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 187 olduğu, paklitaksel uygulamasıyla MCF-7 wt hücrelerinde % 218, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise %109 olduğu, ilaçların kombinasyonlarının uygulamasıyla ise MCF-7 wt hücrelerine % 219, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 108 olduğu belirlenmiştir. Hücre içerisindeki H₂O₂ miktarlarını karşılaştırmak için 500 µM H₂O₂ 2 saat uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerine % 228, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 97 olduğu belirlenmiştir (Şekil 41).

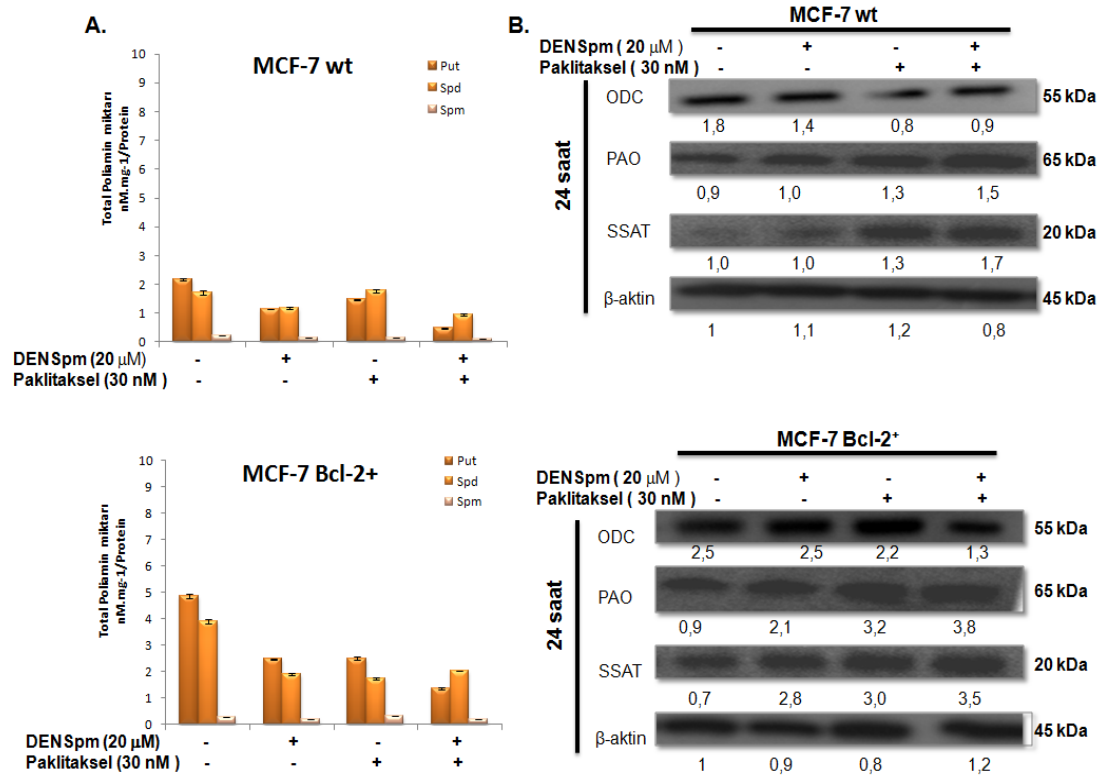


Şekil 41. DENSpM ve paklitakselin 24 saat uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin DCFH-DA boyaması ile hücre akış sitometresinde gösterilmesi.

4.14. DENSPm ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücreleri poliamin havuzu üzerindeki etkisinin gösterilmesi

DENSPm, paklitaksel ve ilaçlarının kombinasyonlarının uygulanmasının meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücreleri PA havuzundaki putresin, spermidin ve spermin etkisine bakmak için HPLC analizi yapılmıştır. 24 saat; DENSPm uygulamasıyla MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde putresin, spermidin ve spermin miktarlarının azaldığı, paklitaksel uygulamasıyla putresin, spermidin ve spermin miktarlarının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı tespit edilmiştir. İkili ilaç uygulamasıyla ise her iki hücre hattında da putresin, spermidin ve spermin miktarının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 42A).

Meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki PA biyosentezin sonunda ODC enziminin ve PA katabolizmasında rol alan PAO ve SSAT enzimlerinin anlatım düzeylerini belirleyebilmek için immünoablottama yapılmıştır. 24 saat; DENSPm, paklitaksel ve ilaçların kombinasyonlarının uygulanmasıyla her iki hücre hattında da ODC anlatımının azaldığı, PAO ve SSAT anlatımının arttığı belirlenmiştir (Şekil 42B).

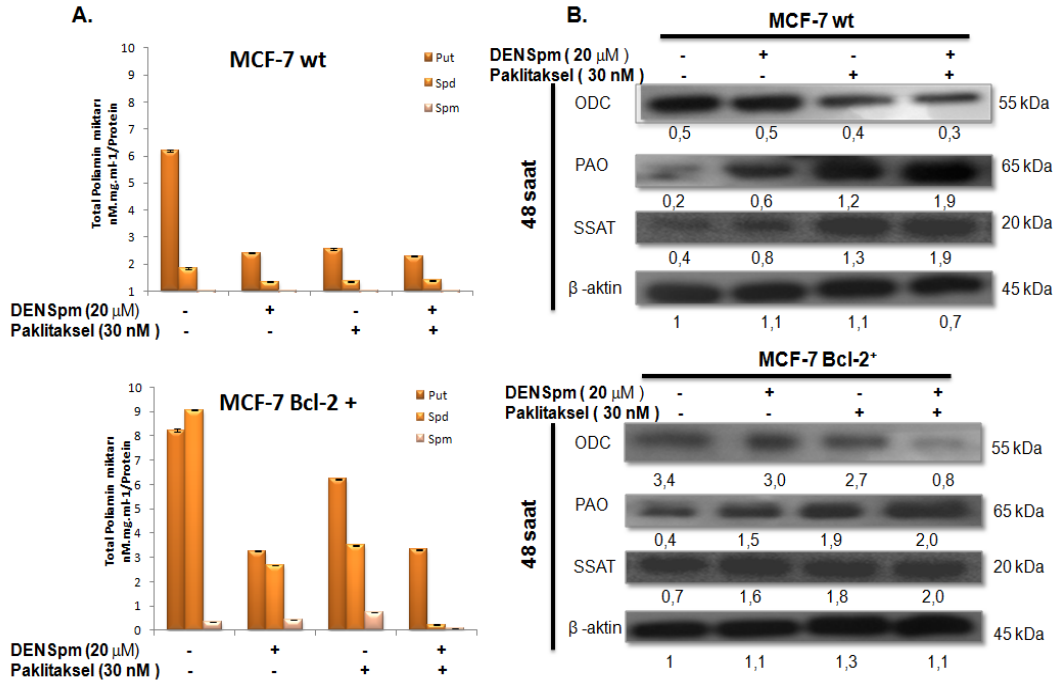


Şekil 42. DENSPm ve paklitakselin 24 saat uygulamasının hücre içi PA üzerine etkisinin gösterilmesi. A) İlaça bağlı hücre içi PA havuzunda meydana gelen değişiklik HPLC ile analiz edilmiş, B) PA

metabolizmasında rol alan enzimleri anlatımındaki değişiklik ise immünoiblotlama ile irdelenmiştir (Put: Putresin, Spd: Spermidin, Spm: Spermin).

48 saat; DENSPm uygulamasıyla her iki hücre hattında da putresin, spermin ve spermidin miktarının azaldığı, paklitaksel uygulaması ile MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde putresin, spermidin ve spermin miktarının azaldığı, ilaçların kombinasyonlarının uygulamasıyla ise her iki hücre hattında da putresin, spermidin ve spermin miktarının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 43A).

48 saat; DENSPm, paklitaksel ve ilaçların kombinasyonlarının uygulanmasıyla MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ODC anlatımının azaldığı, PAO ve SSAT anlatımının arttığı belirlenmiştir (Şekil 43B).



Şekil 43. DENSPm ve paklitakselin 48 saat uygulamasının hücre içi PA üzerine etkisinin gösterilmesi. A) İlaça bağlı hücre içi PA havuzundaki değişiklik HPLC ile analiz edilmiş, B) PA metabolizmasında rol alan enzimleri anlatımındaki değişiklik ise immünoiblotlama ile irdelenmiştir (Put: Putresin, Spd: Spermidin, Spm: Spermin).

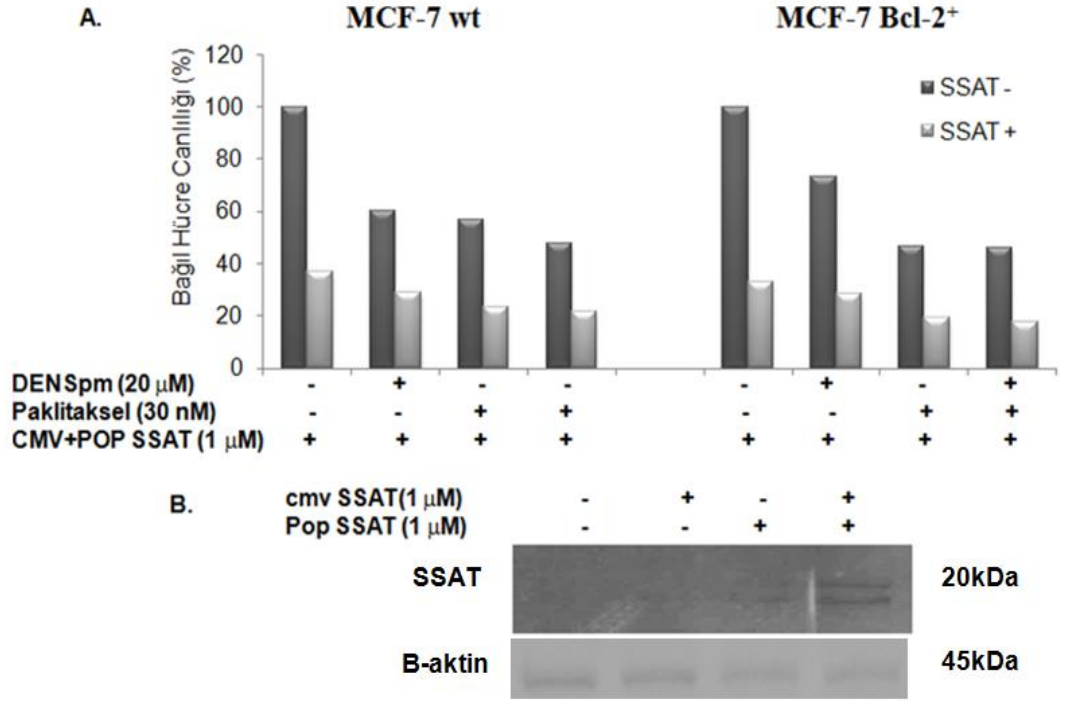
4.15. SSAT anlatımı plazmit aracılığı ile arttırılan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde DENSPm ve paklitakselin etkisinin irdelenmesi

DENSPm'in PA havuzunu azaltması ile paklitakselin apoptotic etkisini arttırması nedeni ile DENSPm'in hedef aldığı SSAT anlatımının plazmit aracılığı ile arttırılması ile apoptotik ölümdaki değişik incelenecektir.

MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine aktarılan cmv SSAT, pop SSAT ve (cmv+pop) SSAT anlatım sonucuna göre (cmv+pop) SSAT plazmitlerinin beraber uygulamasının hücre içi PA seviyesindeki azalmanın daha anlamlı olduğu düşünülerek hücrelere (cmv+pop) SSAT seçilmiştir (Şekil 44 B).

Seçilen plazmitlerin uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin irdelenmesi amacıyla MTT testi ile hücre canlılığı analizi yapılmıştır. Her bir hücre hattına (pop+cmv) SSAT geni aktarıldıktan sonra 24 saat % 5 CO₂ ve 37°C'lik hücre büyütme etüvünde % 95 nem ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra; plazmit aktarımını takiben hücrelerdeki hücre canlılığı MCF-7 wt hücrelerinde % 38, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 36 olduğu belirlenmiştir. 24 saat DENSPm uygulanmasının hücre canlılığını MCF-7 wt hücrelerinde % 60, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 77 olduğu belirlenmiştir. Ancak SSAT plazmiti aracılığı ile SSAT anlatımı arttırılan hücrelere DENSPm uygulaması yapıldığında MCF-7 wt hücrelerinde hücre canlılığı % 32, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 34 kadar düştüğü belirlenmiştir. Hücre canlılığı paklitakselle uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde % 58, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 52 olduğu ve paklitakselle SSAT geninin birlikte uygulanması MCF-7 wt hücrelerinde % 25, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 20 olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığının 24 saat ikili ilaç uygulamasının ise MCF-7 wt hücrelerinde % 50, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 49 olduğu, ikili ilaç ile SSAT geninin birlikte uygulanmasıyla ise MCF-7 wt hücrelerinde % 22, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 18 olduğu belirlenmiştir (Şekil 44A).

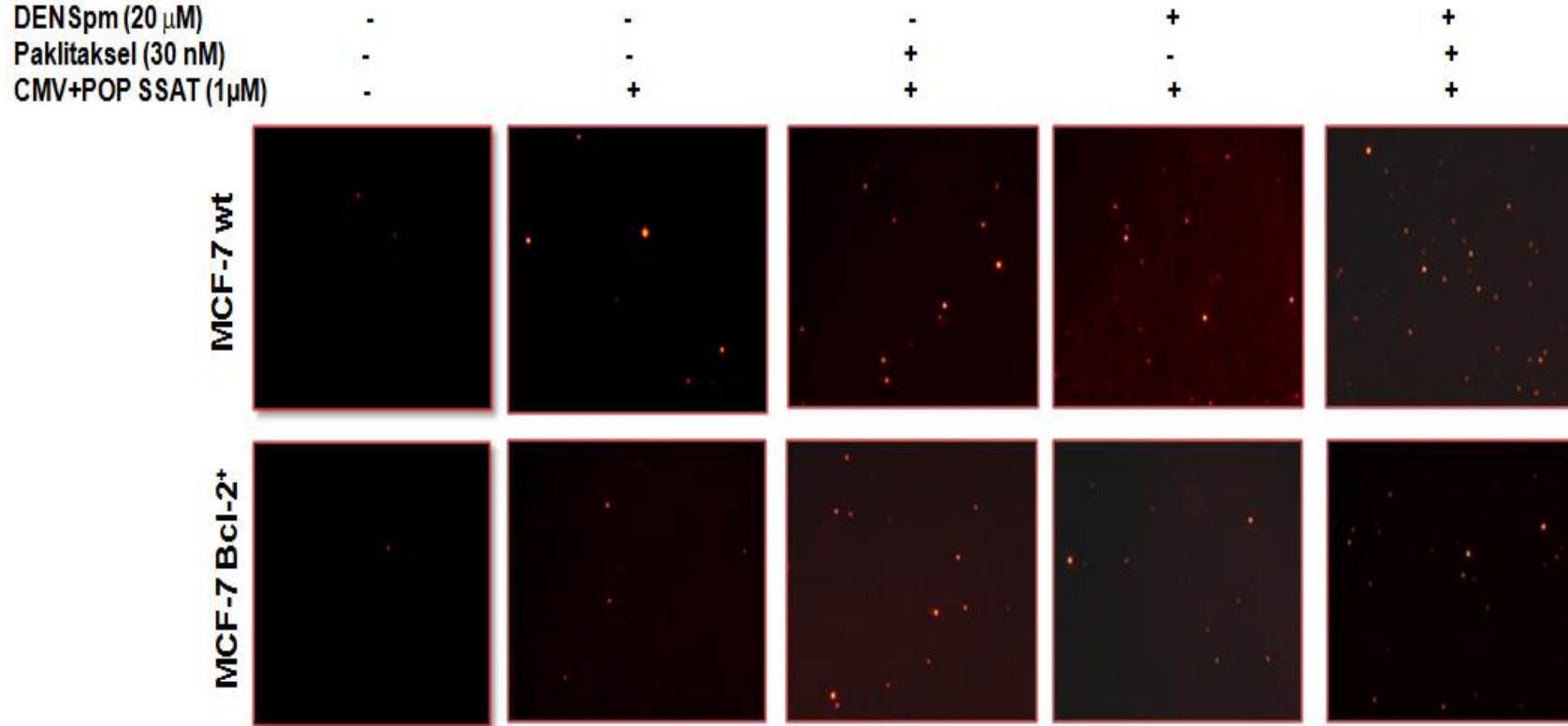
Bcl-2 yüksek miktarda anlatımı olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ilaca direnç mekanizmasının olduğu 24 saat ilaç uygulamasında otofajik yolak ile ilişkili olarak görülse de SSAT geninin aktarılmasıyla bu direncin ortadan kalkacağı ve ilaç etkinliği üzerinde artırıcı etkisi ortaya konulmuştur.



Şekil 44. DEN Spm ve paklitaksel ile birlikte SSAT plazmiti uygulamasının A) MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi B) SSAT gen anlatımının immunoblotlama ile gösterilmesi.

4.16. SSAT anlatımının plazmit aracılığıyla arttırılması ile DEN Spm ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücreleri hücre ölümünün PI boyaması ile gösterilmesi

PI floresan boyası kullanılarak DEN Spm, paklitaksel ve kombinasyonlarının SSAT geni plazmit aracılığı ile anlatımı arttırılan meme kanseri hücrelerine 24 saat uygulanmasının hücre ölümü üzerine etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. DEN Spm, paklitaksel ve ilaç kombinasyonlarının uygulanmasının hücre ölümünü indüklediği tekrardan gösterilmiştir (Şekil 24). Ancak kullandığımız ilaçlarla birlikte SSAT geni içeren plazmit uygulanmasının sadece ilaçların uygulanmasına göre MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ölü hücre oranını daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 45).

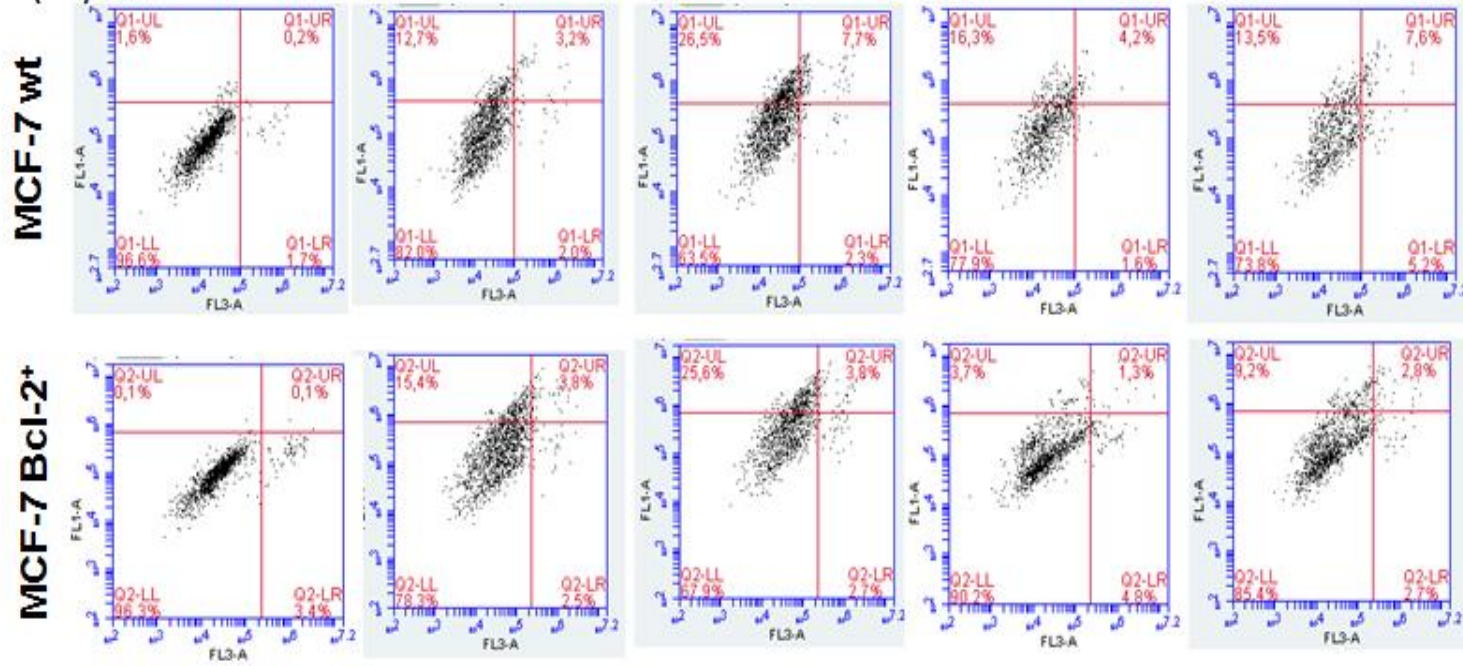


Şekil 45. DENSpm ve paklitakselin ve SSAT geninin MCF-7 wt ve MCF7 Bcl-2+ hücrelerindeki hücre ölümü üzerindeki etkisinin PI boyaması ile gösterilmesi.

4.17. SSAT anlatımının plazmit aracılığıyla arttırılması ile DENSPm ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin/PI boyaması ile gösterilmesi

DENSPm, paklitaksel ve ilaçların kombinasyonları ile SSAT geni içeren plazmit aktarımı ile birlikte 24 saat uygulanmasının meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki erken apoptozun hücre akış sitometresi ile gösterilmesi hedeflenmiştir. Erken apoptoz oranı 24 saat SSAT geni içeren plazmit uygulamasında MCF-7 wt hücrelerinde % 2,0, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 2,5 olduğu, DENSPm ile SSAT geni içeren plazmitin birlikte uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde % 2,3, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 2,7 olduğu, paklitaksel ile SSAT geni içeren plazmitin birlikte uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde % 1,6, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 4,8, ilaçların kombinasyonu ile SSAT geni aktarılan MCF-7 hücrelerinde % 5,2, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise % 2,7 olduğu belirlenmiştir (Şekil 46).

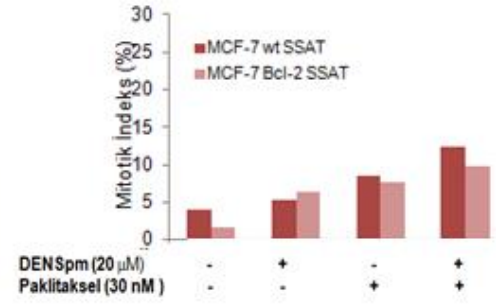
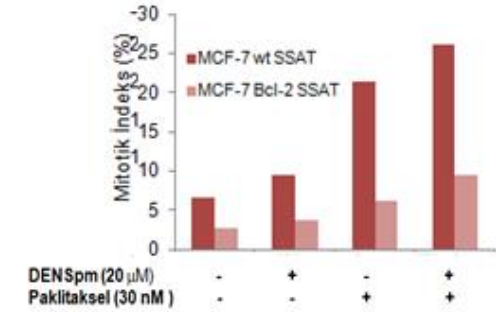
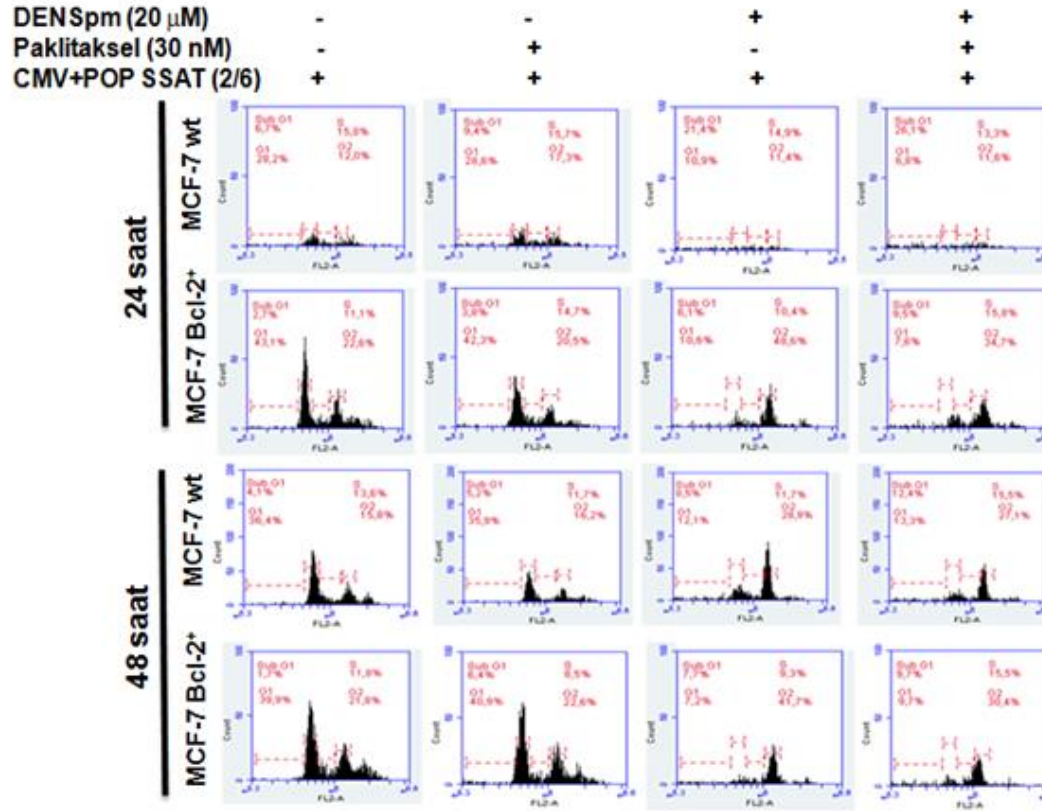
DENSpm (20 μ M) - - - + +
Paklitaksel (30 nM) - - + - +
CMV+POP SSAT (2/6) - + + + +



Şekil 46. SSAT geni içeren plazmit aktarılan MCF-7 wt ve MCF7 Bcl-2+ hücrelerindeki DENSpm ve paklitakselin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin/PI boyaması ile hücre akış sitometresinde gösterilmesi.

4.18. SSAT anlatımının plazmit aracılığıyla arttırılması ile DENSp_m ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisinin hücre akış sitometresi ile gösterilmesi

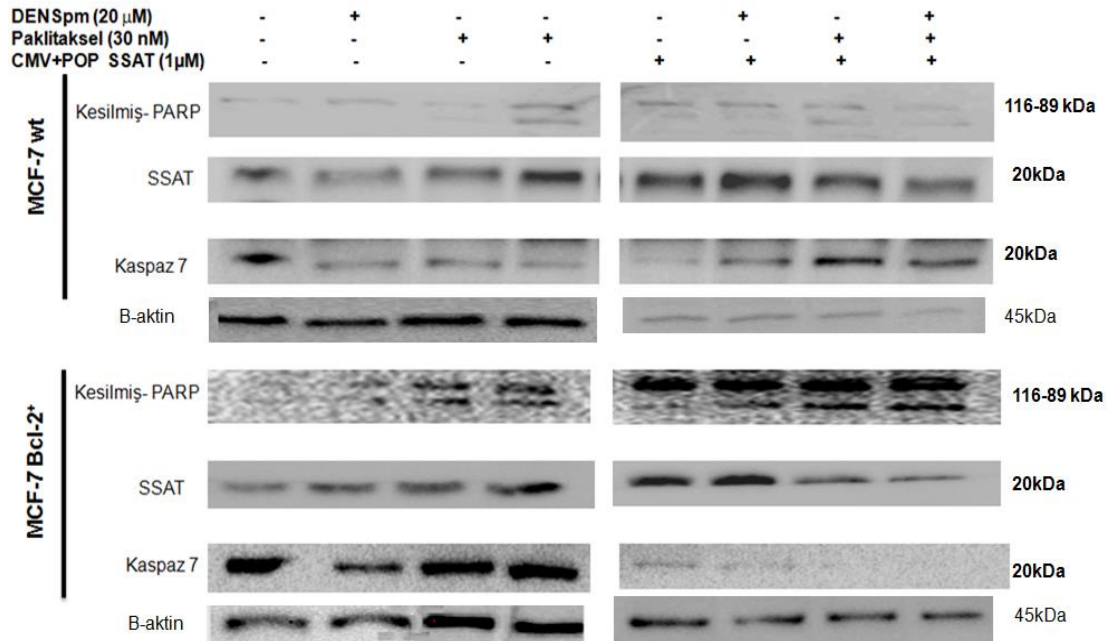
DENSp_m, paklitaksel ve ikili ilaç kombinasyonları ile SSAT geni içeren plazmit uygulanmasıyla meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde hücre döngüsündeki değişimleri irdelemek için subG1, G1, S ve G2 fazlarındaki değişiklikleri hücre akış sitometresi ile belirlenmiştir. SSAT geninin plazmit aracılığı ile anlatımının arttırılması sonucu subG1 oranının 24 saat uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde % 6,7, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 2,7 olduğu, 48 saat uygulanmasıyla ise MCF-7 wt hücrelerinde % 4,1, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 1,7 olduğu belirlenmiştir. SSAT anlatımı arttırılmasını takiben 24 saat DENSp_m uygulanan MCF-7 wt hücrelerinde % 9,4, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 3,8, 48 saatte MCF-7 wt hücrelerinde % 5,2, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 6,4 olduğu belirlenmiştir. SSAT plazmit aktarılan hücrelere Paklitaksel uygulanması 24 saatte MCF-7 wt hücrelerinde % 21,4, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 6,1 iken, 48 saatte MCF-7 wt hücrelerinde % 8,5, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 7,7 olduğu görülmüştür. İlaçların ikili kombinasyonlarının SSAT geni anlatımı plazmit ile arttırılan MCF-7 wt hücrelerinde 24 saat ilaç uygulaması % 26,1, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 9,5 tespit edilmiştir. İlaç uygulaması 48 saate uzatıldığında ise MCF-7 wt hücrelerinde % 12,4, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde % 9,7 olduğu tespit edilmiştir (Şekil47).



Şekil 47. SSAT geni içeren plazmit aktarılan MCF-7 wt ve MCF7 Bcl-2+ hücrelerinde 48 saat DEN Spm ve paklitakselinin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin/PI boyaması ile hücre akış sitometresinde gösterilmesi.

4.19. SSAT anlatımının plazmit aracılığıyla arttırılması ile DENSp_m ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde apoptotik belirteçler ve SSAT anlatımı üzerindeki etkisinin gösterilmesi

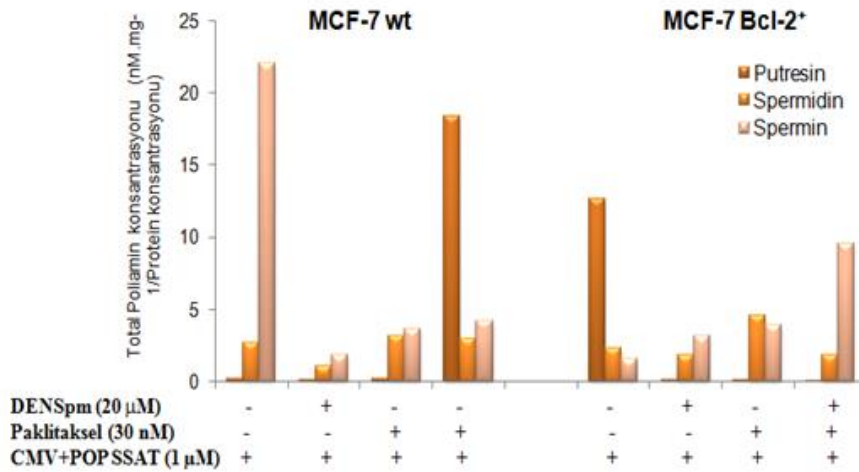
DENSp_m, paklitaksel ve SSAT cDNA içeren plazmit uygulanmasıyla meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki apoptotik yolak üzerinde bulunan proteinlerin etkisinin irdelenmesi amacıyla apoptotik belirteçler olan PARP ve kaspaz 7, katabolik yolak geninin aktiflenmesi ile SSAT proteininin anlatımı immünoiblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. 24 saat; DENSp_m, paklitaksel ve ikili ilaç kombinasyonlarının uygulamasıyla PARP kesilmesinin arttığı, ilaçlarla birlikte SSAT geninin uygulanmasıyla ise daha fazla PARP kesilmesine neden olduğu ve kaspaz-7 anlatımının her iki hücre hattında da sadece ilaçların uygulanmasıyla azaldığı fakat SSAT geni ile birlikte uygulamalar sonucunda MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise azaldığı belirlenmiştir. SSAT aktarılması ile DENSp_m beraber uygulanması SSAT anlatımını arttırdığı, fakat paklitaksel ile DENSp_m'in kombinasyonunun SSAT aktarılmış hücrelere uygulamasıyla SSAT anlatımının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 48).



Şekil 48. DENSp_m, paklitaksel ve SSAT plazmiti aktarılan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki apoptotik belirteçler ve SSAT anlatımının üzerindeki etkisinin immünoiblotlama ile gösterilmesi.

4.20. SSAT anlatımının plazmit aracılığıyla arttırılması ile DENSp_m ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki PA seviyeleri üzerindeki etkisinin gösterilmesi

DENSp_m, paklitaksel ve ilaç kombinasyonları ile SSAT geninin uygulanmasıyla meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerin PA havuzundaki putresin, spermidin ve spermin üzerindeki etkisinin irdelenmesi HPLC yöntemi ile yapılmıştır. MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerine 24 saat SSAT uygulanmasıyla MCF-7 wt hücrelerinde putresin ve spermidinin azaldığı, sperminin ise arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise putresinin arttığı, spermidin ve sperminin azaldığı belirlenmiştir. 24 saat; DENSp_m ile SSAT uygulanmasıyla her iki hücre hattında da putresin, spermin ve spermidinin azaldığı belirlenmiştir. Paklitaksel ile SSAT uygulanmasıyla MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde putresin, spermin ve spermidinin azaldığı görülürken, ilaçların kombinasyonu ile SSAT uygulanmasıyla putresinin MCF-7 wt hücrelerinde arttığı, MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde azaldığı, spermidin ve sperminin ise her iki hücre hattında da azaldığı belirlenmiştir (Şekil 49).



Şekil 49. DENSp_m, Paklitaksel uygulamasının SSAT plazmiti aktarılan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerindeki PA havuzu üzerindeki etkisinin HPLC analizi ile gösterilmesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kansere bağlı ölümlerden sorumlu tümörler arasındaki en yaygın gözlenen kanser global anlamda meme kanseridir. Meme kanseri genelde kadınlarda görülen ve her yıl 1,1 milyondan fazla kadında rastlanan ve yeni teşhis edilen tüm kanserlerin % 23'ünü oluşturan kanser tipi olarak bilinmektedir [2]. Teknolojinin gelişmesi ile erken teşhis ve ilerleyen tedavi imkanlarıyla hastalara müdahale edilse bile bazen bu hastalıktan dolayı insanların yaşamları sonlanmaktadır. Kanserden gerçekleşen ölümlerin ortadan kaldırılması için terapötik tedavilerin geliştirilmesinin; karsinogenez, kanserli hücre proliferasyonu ve tümör gelişimi üzerinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Meme kanseri hastalarının % 50-70'inde Bcl-2'nunda içinde bulunduğu çeşitli protoonkogenlerin anlatımlarının arttığı bilinmektedir. Protoonkogenlerin anlatımlarının artması ile kemoterapiye direnç geliştiğı bilinmektedir [113]. Kemoterapötik hedeflerin geliştirilmesinde önemli rollere sahip ajanlardan biride PA'dir. Son yıllarda kanser hücrelerinin tedavisinde çeşitli kanser ilaçlarının PA ile ilişkili pek çok çalışma bulunmaktadır [113, 80, 81].

Kanser hücrelerindeki normal hücrelere göre artan metabolizmaları ile dikkat çeken PA'in terapatik bir hedef olabilecekleri üzerinde durulmaktadır [80]. PA hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması gibi önemli olaylarda rol almaktadırlar [80]. Kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere oranla daha fazla miktarda PA içerdikleri, ve PA biyosentez enzimi olan ODC anlatımının fazla olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [81]. Son dönemde yapılan çalışmalarda çeşitli ajanlar ile PA katabolizmasının tetiklenmesi ve hücre içi PA seviyelerinin azaltılması yönündedir [114]. PA katabolizması enzimlerinin tetiklenmesiyle hücrede PA seviyelerinde azalma meydana geldiğı gibi, SSAT tarafından asetillenen PA'in PAO ile oksidasyonları ya da Spm'nin SMO ile doğrudan oksidasyonu sırasında H₂O₂ gibi toksik maddelerin açığa çıkması da tetiklenmektedir [115]. Açığa çıkan H₂O₂ ve aldehitlerin kanser hücrelerinde apoptotik ölümü tetiklediğine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır [114].

PA katabolik enzimlerinin aktivasyonunu hedef alan ajanlar arasında birçok PA analogu sentez edilmiştir [82]. Bu analoglardan biri ve klinikte kullanılan olan DENSp_m olarak literatürdeki pek çok çalışmada gösterilmiştir [83-85]. DENSp_m hücrelerdeki hücre içi PA miktarını azaltarak hücre içindeki PA dengesinin bozulmasına ve PA katabolizmasında görev alan SSAT enziminin anlatımının arttığı belirlenmiştir [116]. SSAT'nin platin türevli kemoterapetik ajanlardan oksaliplatin ve sisplatin tarafından DNA kırıklarını tetikleyen genlerden biri olduğu tespit edilmiştir [117].

Son yıllarda PA hedef alınarak normal hücelere zarar vermeden kanserli hücreleri apoptotik ölüme götürmesi için ajanların belirlenmesi ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yaptığımız çalışmada meme kanseri model hücre hattı olan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde, PA analogu olan DENSp_m ve Taksol grubundan paklitakselin zamana bağlı olarak otofajik ve apoptotik mekanizmasının PA yolağı hedef alınarak anlaşılması hedeflenmiştir.

DENSp_m biyosentetik enzimlerin aktivitesini azaltarak hücre içerisindeki PA seviyesinin azalmasına neden olduğu ve katabolik yolak enzimi olan SSAT'nin aktivitesini arttırarak hücre hasar mekanizmalarını uyararak hücre ölüm mekanizmaları devreye girerek hücreleri ölüme götürdüğü bilinmektedir [116]. Paklitaksel ise; hücrelerin mitoz bölünmesi sırasında iğ ipliklerinin yıkımını engellediği ve hücre bölünmesini durdurduğu [6] bilgisinden yola çıkarak paklitaksel hücrelerin hücre döngüsünde G2 fazından G1 fazına geçişini engelleyerek hücreleri apoptoza götürdüğü ve otofagozom oluşumunu, lizozom oluşumunu ve mikrotübül organizasyonunu baskılayarak Beclin-1 üzerinden vesikül oluşumunu meydana getirdiği belirlenmiştir [105, 106]. Paklitaksel kanser tedavisinde kullanılan bir ilaç olduğundan kanser hücreleri üzerindeki etkinliği bilinmektedir [4].

Kanserle ilgili yapılan çalışmalardan yola çıkarak meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde DENSp_m, paklitaksel ve kombinasyonlarının uygulanmasının hücrelerin ölüm mekanizmalarının araştırılması yapılmıştır. MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ meme kanseri hücrelerinde etkin olan paklitaksel ve DENSp_m dozunu belirleyebilmek için hücre canlılığı analizi yapılmıştır. Her iki hücre hattında da hücre canlılığının %50 ve altına düşüren DENSp_m ve paklitaksel doz oranları belirlenmiştir. Hücrelerdeki etkin dozlar

belirlendikten sonra kullanılan dozun hücre sağkalımı üzerine etkisi irdelenmiştir. Hücrelere paklitaksel, DENSp_m ve paklitaksel ile ikili ilaç kombinasyonlarının 24 saat uygulamasının hücre canlılığını azalttığı ve ikili ilaç uygulamasının meme kanseri hücrelerinde 48 saatten itibaren sitotoksik bir etki yaratarak hücre çoğalmasına ket vurduğu belirlenmiştir (Şekil 21-22).

Hücrelerdeki hücre canlılığını azaltan doz oranlarının belirlenmesinden sonra hücrelerdeki 24 saat DENSp_m ve paklitaksel uygulamasının MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde, DENSp_m'in ise MCF-7 wt hücrelerindeki büyümeyi durdurduğu görülmüş ama ikili ilaç uygulamasında hücre büyümeleri engellenmiştir. İlaçların 48 saat uygulamasında ise hücre büyümelerinin durdurulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 23). Bu durumun PA türevlerinden olan DENSp_m daha önce yapılan çalışmalarda hücre büyümesini azalttığı tespit edilmiştir [80].

Kullanılan ilaçların hücre büyümesini engellediği görüldükten sonra hücrelerin hücre döngüsündeki değişiklikler incelenmiştir. Uyguladığımız ilaçların her iki hücre hattında da subG1 oranını arttırdığı, hücre döngüsündeki önemli rollere sahip olan proteinlerden p21 anlatımını arttırarak siklin/cdk aktivitesini düşürerek G1 evresinden S evresine geçişini engellediği bilinmektedir [6]. Bu bilgi doğrultusunda ilaçların 24 saat uygulamasının p21 anlatımını arttırdığı ve hücrelerin G1 evresinde durduğu belirlenmiştir (Şekil 25-26). Bu bilginin hücrelerin hücre büyümesinin 24 saatte durduğu ilaçlara direnç gösterdiğini desteklemektedir.

Sisplatin tarafından SSAT'nin aktifleterek DNA kırıklarını meydana getirdiği belirlenmişti [117]. DENSp_m ile paklitakselin kombinasyonlarının uygulanmasıyla DNA fragmentleri üzerindeki etkisine baktığımızda kullanılan ilaçların her iki zaman aralığında da SSAT uyarılarak DNA kırıklarına sebep olduğu görülmüştür (Şekil 27) ayrıca bu sonuçlar PI boyaması ile gösterilmiştir.

Tedavi amaçlı uygulanan ilaçların hücrelerde meydana getirdiği DNA'nın kırılması ile hücrelerde meydana gelen apoptotik ölüm mekanizmasının aktivasyonu ile ilgili olup olmadığı incelenmiştir. 24 ve 48 saatlerde ikili ilaç uygulaması ile tetiklenen hücre canlılığı kaybının apoptotik hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirleyebilmek için hücrelerdeki mitokondri membran yapısında meydana gelen bozulma floresan mikroskobu ile belirlenmiştir (Şekil 30-31). Uygulanan ilaçların 24 saat uygulamasının mitokondri membranı üzerindeki etkisinin florometre sonuçlarının t testi istatistiksel analizi ile anlamlı olmadığı

yukarıda bahsedilen direnç mekanizmasından olduğu düşünülmektedir. İlaçların 48 saat uygulamasının hücrelerde meydana getirdiği mitokondri membranındaki bozulmaların arttığı belirlenmiştir (Şekil 30-31A). Mitokondrinin membran yapısında meydana gelen bozulma ile mitokondrinin çift zarı arasında bulunan, elektron transport zinciri üyesi olan sitorom c'nin sitoplazmaya geçişini sağlamaktadır. Mitokondriyel yolağın aktive olması ile sitoplazmaya geçen sitokrom c, kaspaz aktivasyonunun tetiklenmesiyle [97] kaspaz-Apaf-1 ve sitokrom c üçlüsünden oluşumundan hücrelerin apoptotik ölüme yolağını kullandığı kaspaz-7'nin kesilmesi ve Apaf-1 anlatımının artmasında (Şekil 30-31C), DENSp_m kaspazların aktifleşmesinde etkili olduğu bilinmektedir [90]. Uygulanan ilaçlar hücrelerdeki apoptotik ölümü başlatıcı olan etkili kaspazların aktivasyonuna sebep olarak kaspazların hedefi PARP'ın kesimine neden olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan ilaçların hücrelerde meydana getirdiği apoptotik belirteç olan PARP'ın kesilmesinin 48 saatte 24 saatten daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 28-29C). İlaçların 24 saat uygulamasının apoptotik ölüm üzerindeki etkiliğinin az olmasının sebebi hücrelerde geliştirilen direnç mekanizmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hücelere uygulanan ilaçların sitokrom-c salınımını arttırması ile kaspaz kaskadının oluşmasında rol oynadıkları belirlenmiştir [98]. İlaçların uygulanmasıyla hücrelerin mitokondri membranındaki bozulmaların; Bax ve Bad proteininin anlatımının artmasıyla, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinler hücrenin yaşamının devamında görevli [99] olduklarından, Bcl-2/xL ve Mcl-1 proteininin anlatımının azalması ile sitokrom c'nin salınımını arttırdığı görülmüştür (Şekil 32-33).

Hücrelerin mitokondri membranında meydana gelen bozulmadan dolayı hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikleri belirlenmiştir. Işık mikroskobu görüntüleri sonucunda ilaçların 24 saat uygulanmasının hücrelerde vakuol oluşumuna neden olduğu 48 saatlik uygulamanın ise vakuol oluşumunu yok ettiği belirlenmiştir (Şekil 34). Yukarıdaki deneylerde ilaçların 24 saat uygulanmasına gösterdikleri direncin hücrelerde meydana getirdiği otofajik vakuollerden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekazması olarak apoptozun durdurulmasına ve ölümün engellenmesine yol açmakta olduğu bilinmektedir [105, 106].

Otofajik vakuollerin belirlenmesinden sonra hücrelerin otofagozom yapılarının görüntülerinin hücre içindeki otofagozom yapısında görevli olan Beclin-1, Atg, LC3 ve p62 proteinlerinin anlatımlarındaki değişiklikleri incelenmiştir. Hücrelerdeki anti-apoptotik (Bcl-xL ve Mcl-1) anlatımlarının azalması Bcl-2-Beclin-1 kompleksinin ayrılmasına sebep olmaktadır. Beclin-1 anlatımının azalması ile otofagozom zarı oluşmaya başlar oluşan zarın uzaması için görevli olan Atg5-12, LC3 ve P62 proteinlerinin ilaçların uygulanması ile MCF-7 Bcl-2 hücrelerinde anlatımlarının kombinasyonla birlikte artması ile otofagozom oluşumu meydana gelmektedir [118]. İlaçların 48 saat uygulaması ile vakuollerin yok olmasındaki sebep otofagozomların içlerindeki Atg5-12, LC3 proteinleri ve p62'nin taşıdığı proteinlerin lizozomlarla yıkılmasının otofajik ölümü gerçekleştirdiği belirlenmiştir [118] (Şekil 38-39).

Hücrelerdeki besin yokluğunda otofajiye bağımlı hücrelerin ATP düzeyinin sürdürülmesi için fosfotidilserinlerin hücre zarının dışına geçişini sağlar ve apoptozda görülen hücre zarı tomurcuklanması için ATP ihtiyaç duyulmaktadır [109]. Uyguladığımız ilaçların hücrelerdeki mitokondrial yapının bozulmasına neden olduğu için hücrelerde enerji yoksunluğundan meydana gelen stres sonucunda açığa çıkan ROS miktarını arttırması [115] ile hücre içerisindeki PA seviyesinin düşmesi ile meydana gelen H₂O₂ oranındaki artışın sebebinin araştırılması için hücrelerdeki PA seviyesine bakılmıştır. İlaçlarının kombinasyonunun 24 ve 48 saat uygulamasının hücre içerisindeki PA miktarını azalttığı, PA biyosentezinde görevli olan ODC'nin ekspresyonunun azaldığı ve katabolik yolda görevli olan PAO ve SSAT'nin ise anlatımlarının arttığı belirlenmiştir (Şekil 42-43). Hücre içerisindeki PA miktarının azaltılması ile hücre ölümünün tetiklendiği belirlenmiştir [116].

Hücre içerisindeki PA seviyesinin düşürülmesi ile hücrelerin ölüme gittiği belirlendikten sonra hücrelerdeki ilaçların 24 saatlik uygulanmasına gösterdikleri direncin ortadan kaldırılması için hücrelere katabolik yolağı aktifleştirmek için SSAT geni aktarılmıştır. SSAT geninin aktarılması ile 24 saat ilaçlarla beraber uygulamasının hücrelerdeki hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir (Şekil 44). Hücre canlılığının azalmasının ölü hücreleri boyayan PI boyaması ile ölü hücrelerin oranlarının artması ile olduğu belirlenmiştir (Şekil 45). SSAT enzim anlatımının artmasının hücre ölümü üzerinde etkili olduğu belirlendikten sonra hücrelerin hücre döngüsündeki subG1 oranının SSAT geninin uygulanmamış hücrelerine oranla arttığı belirlenmiştir (Şekil 46). Apoptotik belirteç olan PARP ve kaspaz-7'nin

kesilmesinin sadece ilaçların kullanımına oranla daha fazla arttığı görülmüştür (Şekil 47). Hücrelerdeki ROS miktarlarının artması ile hücrelerdeki PA miktarlarının MCF-7 wt hücrelerinde ikili ilaç uygulaması ile SSAT geninin aktarılmasının spermin ve spermidin miktarlarının azalmasıyla putresine dönüştürdüğü [72], MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde ise putresin sentezinin engellenmesine neden olduğu belirlenmiştir [70].

Yaptığımız çalışmada paklitaksel ile DENSpM kombinasyonunun meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde SSAT ve PAO ekspresyonunu tetiklediği anlaşılmıştır [116]. Hücre içi PA katabolik yolak enzimleri olan SSAT ve PAO ekspresyonunun artması ile PA katabolik yolunun aktifleşmesi ile hücre içi PA miktarını azaltarak hücre proliferasyonunu engellediği anlaşılmıştır [81]. Ayrıca SSAT, PA'den spermin ve spermidini asetilleyerek spermin oksidaz ve PA oksidaz enzimleri için substrat oluşturmaktadır. Oluşan reaksiyon sonucu hücrelerde artan hidrojen peroksidazın hücrelerde hasar sinyalinin meydana gelmesini sağlar bu sinyallerin hücrelerin ilaçlara gösterdiği direncin kırılması ile otofajik ve apoptotik ölüm mekanizmalarını uyardığı belirlenmiştir [107].

Sonuç olarak; SSAT geninin aktifleştirilmesi ile DENSpM, paklitaksel ve ikili ilaç kombinasyonlarının meme kanseri MCF-7 wt ve MCF-7 Bcl-2+ hücrelerinde hücre içi PA miktarını azaltarak hücrelerdeki direncin kırılması ile apoptotik ölüm mekanizmasını uyardığı belirlenmiştir [107]. Çıkan sonuçlar doğrultusunda DENSpM gibi PA analoglarının paklitaksel ile birlikte kanser tedavisinde kullanılmasının tedaviye verilen olumlu cevabın daha erken sürede gerçekleşmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir

EKLER

Tablo 4. Kullanılan cihazların listesi

Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	D56412	TKA-Pacific
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	EN 025	Nüve
Floraslan Mikroskopu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Sistemi	165-8000	BioRad

Elektroforez Transfer sistemi	170-4155	BioRad
-------------------------------	----------	--------

Tablo 5. Hücre kültürü donanımları

Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75 cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25 cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100 mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60 mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5 ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10 ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Tripsin-EDTA	P10-0231	Pan Biotech
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	Pan Biotech
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
DMEM Besi yeri	O04-01500	Pan Biotech
MCF-7	HTB-22	ATCC

Tablo 6. Kullanılan kimyasalların listesi

Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
2-merkaptolanol	S4805940517	Merck
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas

Agaroz	A2114,1000	Applichem
Akrilamit / Bis-Akrilamit 30% çözelti	A3699	Sigma-Aldrich
Amonyum Asetat	1,110115,1000	Merck
Amonyum persülfat	A3678	Sigma
Asetik Asit	K37230062	Merck
Coomassie Blue Belirteci	500-0006	BioRad
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DMSO	D5879	Sigma
EDTA	A3452,1000	Sigma-Aldrich
Etanol	A3452,1000	Sigma-Aldrich
Etidyum Bromür	46067	Fluka
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Glisin	A1067	AppliChem
Hidrojen peroksit	K39218400838	Merck
İzopropanol	24137	Rieel-de Haen
Laemli Tamponu	S3401-1V	Sigma
Luminol	A8511	Sigma Aldrich
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
MTT Solüsyonu	M2003-1G	Sigma
Page Ruller Prestained Protein Ladder	SM0671	Fermentas
p-Koumaric Asit	C9008	Sigma Aldrich
Phosphate buffered saline (PBS)		Pan Biotech
Propidium Iodide	A2261,0025	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	K0301	Fermentas
Saf Etanol	32221	Rieel-de Haen
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	A3452,1000	Applichem
Sığır Serum Albumin (PSA)	500-0007	BioRad

TEMED	A1148,0100	Applichem
Tris Baz	A2264,1000	Applichem
Tris-HCl	A3452,1000	Applichem
Tween 20	S4927784 802	Merch
Yağsız Süt Tozu	Food club	Amerika

Tablo 7. %12'lik SDS-PAGE Jel İçeriği

	Alt Jel	Üst Jel
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-HCl	2,5ml (1,5M,pH: 8,8)	1,125ml (0,5M, pH: 6,8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
Amonyum Persulfat (APS)	0,05 ml	0,025ml
TEMED	0,005ml	0,005ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05ml

Çözeltiler

Hücre Özütleme Tamponu (1 L)

10 mM Tris-HCl pH: 8.0

0.1 M EDTA pH: 8.0

% 0.5 SDS

Distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanır.

0.5 M EDTA (pH 8) (1 L)

186.1 gr EDTA 700 ml distile su içerisinde çözündürülür.

10 M NaOH kullanılarak pH'sı 8'e ayarlanır.

Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlanır.

1 M Tris (pH 9) (1 L)

121 gr Tris baz 800 ml distile su içerisinde çözdürülür.

HCl kullanılarak pH'sı 9'a ayarlanır.

Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlanır.

Otoklav ile steril edilerek saklanır.

1 M Tris (pH 8) (1 L)

121 gr Tris baz 800 ml distile su içerisinde çözdürülür.

HCl kullanılarak pH'sı 8'e ayarlanır.

Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlanır.

Otoklav ile steril edilerek saklanır.

10 M Amonyum Asetat

770 gr Amonyum asetat 800 ml distile su içerisinde çözdürülür.

Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlanır.

Filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanır.

50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Elektroforez Tamponu (1 L)

242 gr Tris baz

57.1 ml Glasiyal asetik asit

100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

242 gram Tris baz 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit eklenmelidir. EDTA en son eklenir ve hacim yine distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanır.

Poliakrilamit Jel Elektroforez Tamponu (1 L)

3.6 gr Tris baz

14,4 gr glisin

800 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra pH'sı 8.6'ya ayarlanır.

Hacim distile su kullanarak 1 litreye tamamlanır.

1X PBS (Fosfat Tamponu)

8 gr NaCl

0.2 gr KCl

1.44 gr NaH₂PO₄

0.24 gr KH₂PO₄

800 ml distile su içerisinde çözdürülür ve pH'sı 7.4'e ayarlanır. Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlanır. Otoklav ile steril edilerek saklanır.

%20 SDS (w/v) (100 ml)

20 gr SDS 80 ml distile su içerisinde gece boyu karıştırarak çözdürülür.

Hacim yine distile su kullanılarak 100 ml'ye tamamlanır.

6X DNA Jel Yükleme Tamponu

%30 gliserol

% 0.25 (w/v) Bromofenol mavisi

Hacim steril distile su ile 1 ml'ye ayarlandıktan sonra +4°C'de saklanır.

Özütleme Tamponu

10 M Tris (pH 8)

0.5 M EDTA (pH 8)

0.5 % SDS

Hacmin ayarlanmasında steril distile su kullanılmalıdır.

% 10 APS (1ml)

100 mg Ammonium persulfate

1 ml distile su eklenerek -20'de saklanır.

Coomassie Blue (500 ml)

% 0.2 gr coomassie blue

% 45 EtOH

% 10 Asetik asit

Ponceau Red (% 0,1) (100 ml)

0.1 gr Panceau Red

Distile su ile 100 ml' tamamlanır.

ECL Solüsyonu**1.solüsyon:**

9 ml distile su

1 ml 1M Tris-HCl pH: 8,5

45 µl Coumaric acid

100 µl Luminol

2.solüsyon

9 ml distile su

1 ml Tris-HCl pH: 8,5

7.5 µl H₂O₂

10x Running Tamponu (pH 8,3) (1 L)

30.3 gr Tris-base

144 gr Glycine

800 ml distile su eklenerek çözülür

1 gr SDS

pH ayarlanır distile su ile 1 litreye tamamlanır.

10x Transfer Tamponu (pH 8,3) (1 L)

30,3 gr Tris-base

144 gr Glycine

800 ml distile su

pH ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlanır.

10x TBS (pH 7,6) (1 L)

87,66 gr NaCl

12,11 gr Tris-HCl

800 ml distile su

pH ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlanır.

1X TBS Hazırlanışı

Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS'e dönüştürülür.

1X TBS-Tween Hazırlanışı

1X TBS içine 500µl Tween 20 konularak hazırlanır.

Yürütme tamponunun Hazırlanışı

30,3 gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözünür. Hazırlanan 10X yürütme tamponu hazırlanır. Jel yürütmesi sırasında kullanılmak için 1X'e dönüştürülür.

Transfer Tamponunun Hazırlanışı

200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 100 ml metanol konularak distile su ile 1000ml'e tamamlanır.

Yürütme Jelinin Hazırlanması Tablo.4'te sunulmuştur.

Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması

9 ml filtre edilmiş Fetal sığır serumu ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlanan dondurma medyası yardımıyla hücreler uzun süreli olarak sıvı azot tankının içinde saklanabilir.

KAYNAKLAR

1. Manjer, J., et al., *Breast cancer incidence in relation to smoking cessation*. Breast Cancer Res Treat, 2000. **61**(2): p. 121-9.
2. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
3. Baum, M., *Hormone replacement therapy and the breast. Women still want to have hormone replacement therapy*. BMJ, 2002. **324**(7342): p. 915; author reply 915.
4. Seidman, A.D., et al., *Taxol plus recombinant human granulocyte-colony stimulating factor as initial and as salvage chemotherapy for metastatic breast cancer: a preliminary report*. J Natl Cancer Inst Monogr, 1993(15): p. 171-5.
5. Crown, J., *Evolution in the treatment of advanced breast cancer*. Semin Oncol, 1998. **25**(5 Suppl 12): p. 12-7.
6. Fitzpatrick, F.A. and R. Wheeler, *The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), and related agents*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(13-14): p. 1699-714.
7. Wallace, H.M. and A.V. Fraser, *Polyamine analogues as anticancer drugs*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(2): p. 393-6.
8. Mizushima, N., S. Tsukamoto, and A. Kuma, *[Autophagy in embryogenesis and cell differentiation]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2008. **53**(16 Suppl): p. 2170-4.
9. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. **306**(5698): p. 990-5.
10. DeSantis, C., et al., *Temporal trends in breast cancer mortality by state and race*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(5): p. 537-45.
11. DeSantis, C., et al., *Breast cancer incidence rates in U.S. women are no longer declining*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011. **20**(5): p. 733-9.
12. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
13. Jemal, A., E. Ward, and M.J. Thun, *Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(3): p. R28.
14. Ravdin, P.M., et al., *The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States*. N Engl J Med, 2007. **356**(16): p. 1670-4.
15. Smith, R.A., et al., *American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer*. CA Cancer J Clin, 2002. **52**(1): p. 8-22.
16. Jemal, A., et al., *Widening of socioeconomic inequalities in U.S. death rates, 1993-2001*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2181.
17. Ozmen, V., et al., *Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study*. World J Surg Oncol, 2009. **7**: p. 37.
18. Filazoglu, G. and K. Griva, *Coping and social support and health related quality of life in women with breast cancer in Turkey*. Psychol Health Med, 2008. **13**(5): p. 559-73.
19. Ceber, E., et al., *Nutrition, lifestyle, and breast cancer risk among Turkish women*. Nutr Cancer, 2005. **53**(2): p. 152-9.

20. Bonadona, V., et al., *Contribution of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations to the incidence of breast cancer in young women: results from a prospective population-based study in France*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **43**(4): p. 404-13.
21. Friebel, T.M., S.M. Domchek, and T.R. Rebbeck, *Modifiers of Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Systematic Review and Meta-Analysis*. J Natl Cancer Inst, 2014.
22. Balasundaram, D. and A.K. Tyagi, *Polyamine--DNA nexus: structural ramifications and biological implications*. Mol Cell Biochem, 1991. **100**(2): p. 129-40.
23. Campbell, J.B., *Breast cancer-race, ethnicity, and survival: a literature review*. Breast Cancer Res Treat, 2002. **74**(2): p. 187-92.
24. Manjer, J., et al., *Survival of women with breast cancer in relation to smoking*. Eur J Surg, 2000. **166**(11): p. 852-8.
25. Green, B.B. and S.H. Taplin, *Breast cancer screening controversies*. J Am Board Fam Pract, 2003. **16**(3): p. 233-41.
26. Cuzick, J., *Radiotherapy for breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(6): p. 406-7.
27. Matsui, A., et al., *[Developments in endocrine therapy for breast cancer]*. Gan To Kagaku Ryoho, 2002. **29**(7): p. 1138-45.
28. Manjer, J., et al., *Intra-urban differences in breast cancer mortality: a study from the city of Malmo in Sweden*. J Epidemiol Community Health, 2000. **54**(4): p. 279-85.
29. Nagata, C., *Assessment of preference for breast cancer chemoprevention in Japanese young women*. Jpn J Cancer Res, 1997. **88**(9): p. 792-6.
30. Ganz, P.A., J.N. Casillas, and A. Coscarelli, *Estimating the human costs of cancer survivorship in children*. Ann Intern Med, 2010. **152**(7): p. 465-6.
31. Lopez Deogracias, M., et al., *Rectal metastasis from lobular breast carcinoma 15 years after primary diagnosis*. Clin Transl Oncol, 2010. **12**(2): p. 150-3.
32. Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, and I.O. Ellis, *Basal-like breast cancer: a critical review*. J Clin Oncol, 2008. **26**(15): p. 2568-81.
33. Rakha, E.A., et al., *Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **111**(1): p. 121-7.
34. Bamias, A., et al., *Rectal metastases from lobular carcinoma of the breast: report of a case and literature review*. Ann Oncol, 2001. **12**(5): p. 715-8.
35. Hanby, A.M. and T.A. Hughes, *In situ and invasive lobular neoplasia of the breast*. Histopathology, 2008. **52**(1): p. 58-66.
36. Luck, A.A., et al., *Breast carcinoma with basal phenotype: mammographic findings*. AJR Am J Roentgenol, 2008. **191**(2): p. 346-51.
37. Luck, A.A., et al., *The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2008. **20**(1): p. 40-5.
38. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
39. Smith, R.A., et al., *American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003*. CA Cancer J Clin, 2003. **53**(1): p. 27-43.
40. Baum, M., *Teaching the humanities to medical students*. Clin Med, 2002. **2**(3): p. 246-9.

41. Lumachi, F., et al., *Usefulness of CT scan, MRI and radiocholesterol scintigraphy for adrenal imaging in Cushing's syndrome*. Nucl Med Commun, 2002. **23**(5): p. 469-73.
42. Segura, J.M., et al., *Utilization of screening mammography as a preventive practice prior to initiating a population-based breast cancer screening program*. J Clin Epidemiol, 2000. **53**(6): p. 595-603.
43. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(4): p. 212-36.
44. Samant, R., et al., *Radiotherapy for the treatment of primary vaginal cancer*. Radiother Oncol, 2005. **77**(2): p. 133-6.
45. Barton, M.B., *Screening mammography for women aged 40-49: are we off the fence yet?* CMAJ, 2001. **164**(4): p. 498-9.
46. Yang, L., et al., *[Mortality time trends and the incidence and mortality estimation and projection for lung cancer in China]*. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2005. **8**(4): p. 274-8.
47. Kronowitz, S.J., et al., *Determining the optimal approach to breast reconstruction after partial mastectomy*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(1): p. 1-11; discussion 12-4.
48. Arrangoiz, R., et al., *Case report and literature review: Metastatic lobular carcinoma of the breast an unusual presentation*. Int J Surg Case Rep, 2011. **2**(8): p. 301-5.
49. Fornari, F.A., et al., *Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(4): p. 649-56.
50. Pigram, W.J., W. Fuller, and L.D. Hamilton, *Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA*. Nat New Biol, 1972. **235**(53): p. 17-9.
51. Daniel, B.L., et al., *Magnetic resonance imaging of intraductal papilloma of the breast*. Magn Reson Imaging, 2003. **21**(8): p. 887-92.
52. Hoff, P.M., J. Cassidy, and H.J. Schmolli, *The evolution of fluoropyrimidine therapy: from intravenous to oral*. Oncologist, 2001. **6 Suppl 4**: p. 3-11.
53. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(3): p. 719-26.
54. Walker, R.A., et al., *HER2 testing in the UK: further update to recommendations*. J Clin Pathol, 2008. **61**(7): p. 818-24.
55. Ravdin, P.M., *Docetaxel (Taxotere) for the treatment of anthracycline-resistant breast cancer*. Semin Oncol, 1997. **24**(4 Suppl 10): p. S10-18-S10-21.
56. Mertens, W.C., et al., *Docetaxel in advanced renal carcinoma. A phase II trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. Ann Oncol, 1994. **5**(2): p. 185-7.
57. Lyseng-Williamson, K.A. and C. Fenton, *Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer*. Drugs, 2005. **65**(17): p. 2513-31.
58. Zhao, J., et al., *Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer (Review)*. Int J Oncol, 2005. **27**(1): p. 247-56.
59. Horwitz, S.B., et al., *Taxol: mechanisms of action and resistance*. J Natl Cancer Inst Monogr, 1993(15): p. 55-61.

60. Pegg, A.E. and P.P. McCann, *Polyamine metabolism and function*. Am J Physiol, 1982. **243**(5): p. C212-21.
61. Pegg, A.E., et al., *Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues*. Fed Proc, 1982. **41**(14): p. 3065-72.
62. Moinard, C., L. Cynober, and J.P. de Bandt, *Polyamines: metabolism and implications in human diseases*. Clin Nutr, 2005. **24**(2): p. 184-97.
63. Murray-Stewart, T., et al., *Spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) activity in human small-cell lung carcinoma cells following transfection with a genomic SSAT construct*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 2): p. 629-34.
64. Pegg, A.E., L.M. Shantz, and C.S. Coleman, *Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation*. Biochem Soc Trans, 1994. **22**(4): p. 846-52.
65. Gerner, E.W. and F.L. Meyskens, Jr., *Polyamines and cancer: old molecules, new understanding*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 781-92.
66. Matsufuji, S., et al., *Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme*. Cell, 1995. **80**(1): p. 51-60.
67. Coleman, C.S., et al., *Rapid exchange of subunits of mammalian ornithine decarboxylase*. J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3155-8.
68. Coffino, P., *Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation*. Biochimie, 2001. **83**(3-4): p. 319-23.
69. Mitchell, J.L., et al., *Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells*. Biochem J, 1994. **299** (Pt 1): p. 19-22.
70. Ivanov, I.P., et al., *Discovery of a spermatogenesis stage-specific ornithine decarboxylase antizyme: antizyme 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4808-13.
71. Casero, R.A., Jr. and P.M. Woster, *Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents*. J Med Chem, 2009. **52**(15): p. 4551-73.
72. Casero, R.A., Jr., et al., *The role of polyamine catabolism in anti-tumour drug response*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(2): p. 361-5.
73. Ragione, F.D. and A.E. Pegg, *Purification and characterization of spermidine/spermine N1-acetyltransferase from rat liver*. Biochemistry, 1982. **21**(24): p. 6152-8.
74. Persson, L. and A.E. Pegg, *Studies of the induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase using a specific antiserum*. J Biol Chem, 1984. **259**(20): p. 12364-7.
75. Wallace, H.M., et al., *Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(9): p. 3657-61.
76. Wallace, H.M., *Polyamines and their role in human disease--an introduction*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(2): p. 354-5.
77. Pfeffer, L.M., et al., *Polyamine depletion induces rapid NF-kappa B activation in IEC-6 cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45909-13.
78. Ferioli, M.E., L. Pirona, and O. Pinotti, *Prolactin and polyamine catabolism: specific effect on polyamine oxidase activity in rat thymus*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **165**(1-2): p. 51-6.
79. Yoshida, M., et al., *Nitric oxide increases matrix metalloproteinase-1 production in human uterine cervical fibroblast cells*. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(10): p. 979-85.

80. Lamond, S. and H.M. Wallace, *Polyamine oxidase activity and growth in human cancer cells*. *Biochem Soc Trans*, 1994. **22**(4): p. 396S.
81. Casero, R.A. and A.E. Pegg, *Polyamine catabolism and disease*. *Biochem J*, 2009. **421**(3): p. 323-38.
82. Amendola, R., et al., *Spermine metabolism and anticancer therapy*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**(2): p. 118-30.
83. Kramer, D.L., et al., *Effects of novel spermine analogues on cell cycle progression and apoptosis in MALME-3M human melanoma cells*. *Cancer Res*, 1997. **57**(24): p. 5521-7.
84. Hegardt, C., O.T. Johannsson, and S.M. Oredsson, *Rapid caspase-dependent cell death in cultured human breast cancer cells induced by the polyamine analogue N(1),N(11)-diethylnorspermine*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(3): p. 1033-9.
85. Zagaja, G.P., et al., *Effects of polyamine analogues on prostatic adenocarcinoma cells in vitro and in vivo*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998. **41**(6): p. 505-12.
86. Casero, R.A., Jr. and L.J. Marton, *Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(5): p. 373-90.
87. Schipper, R.G., et al., *Polyamines and prostatic cancer*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(2): p. 375-80.
88. Nagourney, R.A., et al., *Gemcitabine plus cisplatin repeating doublet therapy in previously treated, relapsed breast cancer patients*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(11): p. 2245-9.
89. Kramer, D.L., et al., *Polyamine analogue induction of the p53-p21WAF1/CIP1-Rb pathway and G1 arrest in human melanoma cells*. *Cancer Res*, 1999. **59**(6): p. 1278-86.
90. Chen, Y., et al., *Loss of inhibitor of apoptosis proteins as a determinant of polyamine analog-induced apoptosis in human melanoma cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(32): p. 4964-72.
91. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
92. Searle, J., J.F. Kerr, and C.J. Bishop, *Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance*. *Pathol Annu*, 1982. **17 Pt 2**: p. 229-59.
93. Thompson, E.B., *Apoptosis and steroid hormones*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(6): p. 665-73.
94. Lumachi, F. and S. Basso, *Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases*. *Thyroid*, 2002. **12**(1): p. 27-34.
95. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
96. Howley, B. and H.O. Fearnhead, *Caspases as therapeutic targets*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(5A): p. 1502-16.
97. Olson, M. and S. Kornbluth, *Mitochondria in apoptosis and human disease*. *Curr Mol Med*, 2001. **1**(1): p. 91-122.
98. Barr, P.J. and L.D. Tomei, *Apoptosis and its role in human disease*. *Biotechnology (N Y)*, 1994. **12**(5): p. 487-93.

99. Tsujimoto, Y., *Role of anti-apoptotic Bcl-2 protein in spinal muscular atrophy*. J Neural Transm Suppl, 2000(58): p. 41-52.
100. Huerta, S., et al., *Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF*. J Surg Res, 2007. **142**(1): p. 184-94.
101. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
102. Ohsumi, Y., *Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 211-6.
103. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
104. Yang, C., et al., *Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(4): p. F777-87.
105. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 741-52.
106. Liang, J., et al., *The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 218-24.
107. Karantza-Wadsworth, V., et al., *Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis*. Genes Dev, 2007. **21**(13): p. 1621-35.
108. Mathew, R., et al., *Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability*. Genes Dev, 2007. **21**(11): p. 1367-81.
109. Qu, X., et al., *Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development*. Cell, 2007. **128**(5): p. 931-46.
110. Espert, L., et al., *Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2161-72.
111. Thorburn, A., *Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes*. Apoptosis, 2008. **13**(1): p. 1-9.
112. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
113. Berardo, M.D., et al., *bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma*. Cancer, 1998. **82**(7): p. 1296-302.
114. Ferioli, M.E. and A. Armani, *Polyamine oxidase activity in rats treated with mitoguanzone: specific and permanent decrease in thymus*. Amino Acids, 2003. **24**(1-2): p. 187-94.
115. Cervelli, M., et al., *Increased spermine oxidase (SMO) activity as a novel differentiation marker of myogenic C2C12 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(4): p. 934-44.
116. Libby, P.R., et al., *Characterization of human spermidine/spermine N1-acetyltransferase purified from cultured melanoma cells*. Arch Biochem Biophys, 1991. **284**(2): p. 238-44.
117. Eisenhauer, E.A., et al., *Combination 13-cis-retinoic acid and interferon alpha-2a in the therapy of solid tumors*. Leukemia, 1994. **8**(10): p. 1622-5.
118. Kihara, A., et al., *Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network*. EMBO Rep, 2001. **2**(4): p. 330-5.

ÖZGEÇMİŞ



1. **Adı Soyadı:** Zeynep AKYOL
2. **Doğum Tarihi:**
3. **Unvanı:** Biyolog
4. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Kafkas Üniversitesi	2010
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014

5. **Akademik Unvanlar:**

6. **Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri**

6.1. **Yüksek Lisans Tezleri**

6.2. **Doktora Tezleri**

7. **Yayımlar :**

7.1. **Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)**

7.2. **Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler**

7.3. **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:**

Zeynep Akyol, Ajda Çoker-Gürkan, Elif Damla Arısan, Narçin Palavan Ünsal. "N1, N11-Diethylnorspermine (DENSpM) Modulates the Paclitaxel-Induced Apoptosis in MCF-7 wt and Bcl-2 Overexpressing Breast Cancer Cells", Polyamines Biological and Clinical Perspectives, 2-7 September 2012, İstanbul-Turkey (Poster sunumu: Zeynep Akyol)

7.4. **Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler**

7.5. **Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler**

7.6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

7.7. Diğer yayınlar

7.8. Uluslararası atıflar

8. Ulusal & Uluslararası Projeler

9. İdari Görevler :

10. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler:

- Moleküler Biyoloji Derneği

11. Ödüller ve Burslar

Katıldığı Uluslararası Bilimsel Etkinlikler:

- International Congress on Polyamines: Clinical and Biological Perspectives, September 2-7, 2012, Istanbul Turkey
- First International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 23-24 November 2012, İstanbul-TURKEY

Organizasyonunda Görev Aldığı Bilimsel Etkinlikler:

- Istanbul Kultur University, HARVARD-MIT Joint meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, Aralık 2013
- DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, 16-18 Nisan 2013
- Polyamines: Biological and Clinical Perspectives, 2-7 Eylül 2012