



PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE CİSPLATİN’NİN

4T1 KANSER HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ

Reyhan UZUN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz - 2018

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE CİSPLATİN'İN 4T1 KANSER
HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ

Reyhan UZUN

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA

Temmuz - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Reyhan UZUN tarafından hazırlanan "PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE CİSPLATİN'İNİN 4T1 KANSER HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ" adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

12/07/2018

Prof. Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Hayri DAYIOĞLU
Bölüm Başkanı, Biyoloji Bölümü

Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA
**Danışman, Temel Tıp Bilimleri Bölümü,
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi**

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA
Temel Tıp Bilimleri Bölümü,
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Prof. Dr. Hayri DAYIOĞLU
Biyoloji Bölümü

Doç. Dr. Ayşegül KÜÇÜK
Temel Tıp Bilimleri Bölümü,
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğine ve kaynaklar dizininde belirtildiğine, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan intihal programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 15 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA

Reyhan UZUN

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE CİSPLATİN'İN 4T1 KANSER HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ

Reyhan UZUN

Biyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 2018

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA

ÖZET

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ülkemizde en sık rastlanan hastalıktır ve birçok kanser türü için hala tam olarak tedavi bulunamamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada 4T1 meme kanseri hücrelerinde bortezomib ve cisplatin ilaçlarının tek başına veya kombine olarak sitotoksik etkilerinin olup-olmadığı incelenmiştir. Çalışmada, 4T1 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki (200 μ M; 100 μ M; 50 μ M; 10 μ M; 1 μ M; 0,5 μ M; 0,1 μ M veya 0,01 μ M) cisplatin ile 24 saat muamele edildiler. Daha sonra MTT testi kullanılarak hücrelerin % sağkalım grafikleri çıkarılarak IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu çalışmaya göre, cisplatinin IC_{50} değeri 14,2 μ M olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun 4T1 hücrelerindeki etkileri de araştırılmıştır. 4T1 hücrelerinin DMSO (kontrol), 10 nM bortezomib, 50 nM bortezomib, 1 μ M cisplatin, 5 μ M cisplatin ya da kombinasyonları ile 24 saat muamelesi sonucunda çıkan % sağkalım değerleri kontrol grubu ve diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Koloni oluşumunu gözlemlemek için yumuşak agar testi uygulandı. Yumuşak agar deneyi ilaçların sitotoksik etkilerini ve anti-tümör etkilerini gösteren bir tekniktir. Bortezomib + cisplatin kombinasyonu ile muamele edilen grupta koloni sayısının DMSO (kontrol), bortezomib ve cisplatin uygulanan gruplara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun kanser tedavisinde ilaçların yalnız kullanımından daha etkili olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, bortezomib, cisplatin, proteozom, 4T1, % sağkalım.

EFFECTS OF PROTEASOME INHIBITOR BORTEZOMIB AND CISPLATIN ON 4T1 CANCER CELLS

Reyhan UZUN

Biology, M.S.Thesis, 2018

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA

SUMMARY

After cardiovascular diseases, cancer is the most common disease in our country and for many cancer types there is still no cure up to now. Therefore, in this study it has been examined that whether there are cytotoxic effects of bortezomib and cisplatin drugs either alone or in combination in 4T1 breast cancer cells. In the study 4T1 cells has been treated with different concentrations of cisplatin (200 μ M; 100 μ M; 50 μ M; 10 μ M; 1 μ M; 0,5 μ M; 0,1 μ M or 0,01 μ M) for 24 hours. Afterwards, % survival of cells has been obtained using MTT tests and IC_{50} values has been evaluated. According to this study, the IC_{50} value of cisplatin was found as 14,2 μ M. Furthermore, the effects of combination of bortezomib and cisplatin in 4T1 cells has been examined. After 24 hours treatment with DMSO (control), 10 nM bortezomib, 50 nM bortezomib, 1 μ M cisplatin, 5 μ M cisplatin or with their combinations in 4T1 cells, % survival results were compared with control and with other groups. Soft agar assay has been applied to observe colony formation. Soft agar colony formation is a technique that shows cytotoxic and anti-tumor effects of drugs. Colony numbers in bortezomib + cisplatin treated combination group was observed to be less than that in DMSO (control), bortezomib or cisplatin treated groups. These results indicate that bortezomib and cisplatin combination may be more efficient than the individually treated drugs in cancer cure.

Keywords: Apoptosis, bortezomib, cisplatin, proteasome, 4T1, % survival.

TEŐEKKÜR

Bu tez alıŐma konusunun belirlenmesinden, yorucu bir sűre olan deney aŐamalarının bitimine kadar olan sűrete engin bilgisini, anlayıŐını, tecrűbelerini, sabrını ve her tűrlű desteęini esirgemeyen saygı deęer danıŐman hocam Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya ve laboratuvar çalıŐmalarında yardımını esirgemeyen çalıŐma arkadaŐım ArŐ. Gör. Emrah OKUR'a teŐekkűrű bir borç bilirim.

Ayrıca eęitim hayatım boyunca bana bilgileriyle, tecrűbeleriyle, sevgileriyle destek verip bugűnlere gelmemi saęlayan bűtűn hocalarıma teŐekkűr ederim.

Bu gűnlere gelmemi saęlayan, benden maddi ve manevi hiçbir desteęi esirgemeyen, hayatıma huzur, mutluluk, sevgi katan her zaman ve her koŐulda yanımda olduklarını hissettiren biricik anneme, abime ve ablalarıma, eŐime, kűűk prensim oęluma ayrıca bedeniyle yanımda olamasa da her zaman varlıęını ve desteęini hissettięim biricik babama teŐekkűrű bir borç bilirim. Mekanın cennet olsun babacıęım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TÜMÖR VE KANSER ARASINDAKİ FARKLAR	3
2.1. Tümör, Kist ve Kanser Tanımları	3
2.2. Tümör Türleri.....	3
2.3. İnsan Tümörlerinin Sınıflandırılması	4
2.4. Doku Tipi ve Histolojik Sınıflandırma.....	5
3. KANSER HÜCRESİ VE NORMAL HÜCRE ARASINDAKİ FARKLAR	8
3.1. Apoptozis	9
3.1.1. Apoptotik hücrenin karakteristik özellikleri	10
3.1.2. Apoptoziste kaspazların ve mitokondrinin rolü	11
3.2. Büyüme Faktörlerine Duyarlılık	12
3.3. Kontakt İnhibisyon	12
3.4. Otokrin Çoğalma	13
3.5. Proteazlar ve Anjiyogenez	13
3.6. Metastaz	14
4. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ	15
4.1. Onkogenler	15
4.2. Tümör Baskılayıcı Genler	16
4.2.1. Retinoblastoma (Rb) geni	17
4.2.2. p53 geni	18

İÇİNDEKİLER (devam)

5. KANSERİN NEDENLERİ	19
5.1. Virüsler.....	19
5.2. Kimyasal Ajanlar	20
5.3. Genetik Faktörler	20
5.4. Çevresel Faktörler	21
5.5. Sigara, Alkol, Yaşlanma ve Beslenme Faktörleri	21
6. PROTEİN YIKIM MEKANİZMALARI	24
7. TEZİN AMACI	27
8. MATERYAL VE METOT	28
8.1. Materyal	28
8.2. Hücre Kültürü İçin Besiyeri Hazırlanışı	28
8.3. Hücre Kültürü Pasajı	29
8.4. Hücre Ekimi	29
8.5. MTT Testi	29
8.6. Koloni Oluşumu için Yumuşak Agar Testi	30
8.7. Kaspaz-3 Aktivite Deneyi	30
8.8. Protein Tayini	31
8.9. İstatistik Analizler	32
8.10. Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar	32
8.11. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	32
9. SONUÇLAR	34
10. TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR DİZİNİ	42
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.1. Hedef bir protein üzerinde ubiquitinasyon mekanizması	26
7.1. Bortezomib (A) ve cisplatinin (B) kimyasal yapıları	27
9.1. Cisplatinin 4T1 hücrelerindeki IC ₅₀ değeri ve % sağkalım grafiği	34
9.2. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun 4T1 hücre morfolojisi üzerine etkisi	35
9.3. Farklı konsantrasyonlardaki bortezomib ve cisplatin kombinasyonlarının 4T1 hücrelerindeki sitotoksik etkisi	36
9.4. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun 4T1 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin yumuşak agar testi ile görüntülenmesi	37
9.5. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun etkisinin koloni assay ile belirlenmesi	38
9.6. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkisi	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörlerin farklarına göre sınıflandırılması	4
2.2. İnsan tümörlerinin doku tipine göre sınıflandırılması	7
3.1. Kanser hücresi ve normal hücreler arasındaki farklar	8
8.1. Bradford Macro-Assay metodunda kullanılan numunelerin hazırlanışı	31



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
dH ₂ O	Distile su
Hsp70	Isı şoku proteini 70
PEST	Prolin, glutamik asit, serin ve treonin amino asitleri içeren sekans
Ub	Ubiquitin
E1	Ubiquitin aktive edici enzim
E2	Ubiquitin konjuge edici enzim
E3	Ubiquitin ligaz enzimi
kDa	Kilo Dalton
p53	53 kDa moleküler ağırlığa sahip tümör baskılayıcı protein
Rb	Retinoblastoma
DNaz	Deoksiribonükleaz
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
FBS	Fetal bovin serum
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
UV	Ultraviyole
CAD	Kaspazla aktive olan DNaz
ICAD	CAD inhibitörü
AML	Akut miyelositik lösemi
CML	Kronik miyelositik lösemi
ALL	Akut lenfositik lösemi
CLL	Kronik lenfositik lösemi
GF	Growth factor (büyüme faktörü)
HDGF	Hepatoma derived growth factor
HMGB1	High mobility group protein B1

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Latince “yengeç” anlamına gelen kanser; vücutta oluşan malignant (habis = kötü huylu) tümörleri tanımlamak için kullanılmaktadır (Kırdar, 1979; Şenel ve Çırakoğlu, 2003). Kanser hücreleri, normal hücrelerin aksine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürmektedirler. Normal doku ve organları da istila ederek en sonunda tüm vücuda yayılmaktadırlar. Çok hücreli canlılarda hücrelerin çoğalması, farklılaşması (differensiasyon) ve sağkalımı (yaşamaları) organizmanın ihtiyaçları doğrultusunda düzenlenmektedir. Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığından dolayı özellikle moleküler ve hücresel düzeyde incelenen bir hastalıktır. Hücre döngüsü, sinyal iletimi ve programlı hücre ölümünün (apoptozis) düzenlenmesi gibi işlemlerde anahtar görev üstlenen proteinlerin çoğu ilk kez hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açan anormal aktiviteleri nedeniyle tanımlanabilmişlerdir. Kanser araştırmaları bu yönüyle hücrelerin çalışmasını düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuşlardır (Cooper ve Hausman, 2006). Kanser olduğu dokuya bağlı olarak çok fazla çeşidi olan bir hastalıktır ve yüzün üzerinde farklı kanser türü bulunmaktadır. Kanserler tümörlerin ilk olarak başladıkları organa göre sınıflandırılmaktadır. Örneğin ilk olarak karaciğerde meydana geldiyse karaciğer kanseri olarak isimlendirilmektedir (Soyak, 2006). Primer tümör ve metastazın bulunduğu anatomik yer (akciğer, meme, kalın bağırsak), doku tipi ve histolojik sınıflandırma, malignant dokunun histolojik sınıflandırılması, tümörün ilerleme derecesi, invazyon (metastatik yayılma), kanserin büyüklüğü ve derecesi kanser sınıflandırılmasında kullanılan kriterlerdendir.

Çok aşamalı bir süreç sonucunda oluşan kanserlerde ilk aşama tümör başlangıcıdır. Tümör ilerleme aşamasında genetik değişiklik nedeniyle anormal tek bir hücrenin çoğalması sonucu ortaya çıkan tümör topluluğunda yeni mutasyonların gelişmesiyle hücre topluluğu içinde hızlı çoğalan yeni hücreler bu topluluk içinde baskın özellikler kazanmaya başlamaktadır. Bu süreç sırasında gerek çoğalma hızı gerekse invazyon ve metastaz gibi birçok özellik açısından daha avantajlı olan yeni hücreler olduğu için buna klonal seçim de denilmektedir. Birçok kanser türünde malignant bir tümörün oluşumu tek bir protoonkogenin aktivasyonu veya tek bir tümör baskılayıcı proteinin inaktivasyonu sonucu değil; tümör oluşumu, gelişimi ve metastazı daha çok birden fazla farklı gende meydana gelen ve biriken mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir (Barth ve Barth, 2004; Cooper ve Hausman, 2006).

Meme kanserlerinde, memedeki süt kanallarında ve bez lopçuklarında kötü huylu hücreler çoğalmaktadır. Bu kötü huylu hücreleri sağlıklı hücrelerden ayırt eden özellikleri; renkleri, farklı büyüklükleri ve değişik biçimleridir. Bu hücreler farklı hızlarda çoğalmakta ve

yayılmaktadırlar. Tümör hücreleri organizmanın düzeltme mekanizmasından kendilerini kurtararak kontrolsüz bir biçimde önce süt kanallarında çoğalırlar (in situ) ve daha sonra çevredeki bez dokusuna ilerlerler (invazif büyüme). Kötü huylu tümörü oluşturan hücre birliklerinin ilk yayılışı hem süt kanallarında hem de bez lopçuklarında gerçekleşir ve bunun sonucu olarak iki tür meme kanseri ortaya çıkar. Bunlar;

1. Süt kanalı kanseri; süt kanalı karsinomu ya da duktal karsinom da denir. Süt kanalı sistemi hücrelerinden başlar. %80 oranında görülmektedir.

2. Lopçuk kanseri; lopçuk kanseri ya da lobuler neoplazm diye de adlandırılır. Öncelikle bez lopçuklarında oluşur ve %20 oranında görülürler.

Bu tez çalışmasında proteozom inhibitörü bortezomib ve kemoterapötik ajanlardan cisplatin kombinasyonunun 4T1 meme kanseri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. TÜMÖR VE KANSER ARASINDAKİ FARKLAR

2.1. Tümör, Kist ve Kanser Tanımları

Vücudun çeşitli bölgelerinde bulunan hücreler normal işleyişe aykırı bir şekilde bölünüp çoğaldığında vücutta oluşan fazlalıklara, gruplara veya kitlelere ur ya da tümör adı verilmektedir. Vücudun herhangi bir bölgesinde sıvı, kan veya yağ biriktiğinde etrafı zarla çevrili kümeler (şişlikler) oluşmaktadır. Bunlara da kist ismi verilmektedir. Tümörler kandan besleyici maddeleri alarak normal dokulara zarar veren ve üreyen bir parazit gibidir (Kırdar, 1979; Aykan vd., 1987). Tümörler, normal dokulara uyum göstermeyen ve kendisini oluşturan uyarı ortadan kalktığı takdirde bile büyümesini sürdüren anormal yapılardır (Lever, 1975; Canda ve Canda, 1982). Kanser terimi vücutta oluşan malign (kötü huylu yani habis) tümörleri tanımlamada kullanılmaktadır. Kanser, dünyanın birçok yerinde önemli bir sağlık sorunudur ve her yıl binlerce insan kanser yüzünden hayatını kaybetmektedir. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ölümlerin %25'i kanserden dolayı meydana gelmektedir. Gelişmiş ülkelerde her üç kişiden birinde kanser gelişimine rastlanmıştır. Çocuklar arasında en sık rastlanılan kanser türü lösemi ve daha sonra beyin kanseridir (özellikle nöroblastom). Ayrıca, dünya çapındaki kanserlerin yaklaşık üçte biri; sigara, alkol ve düzensiz beslenme gibi potansiyel değiştirilebilir risk faktörleri nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Obez olma ve cinsel yolla bulaşan bir enfeksiyona sahip olma da kanser risk faktörleri arasındadır (<https://www.news-medical.net/health/Cancer-Epidemiology.aspx>). Kanserlerin kadın ve erkeklerde görülme sıklığı farklılık göstermektedir. Bu farklılığın nedeni iki cinsiyetteki immun sistem etkinliğinin farklı olması ve özel cinsiyet hormonlarının farklılığıdır. Kanserlerin görülme sıklıkları yaş ile alakalı değildir (Aykan vd., 1987). Kanser seyrinin belirsizliği ve tedaviden olumlu sonuç alınıp alınmayacağına belli olmaması kişilerde kırılganlık, çaresizlik, bilinmezlik ve ölüm korkusuna sebep olmaktadır (Tavil, 1996).

2.2. Tümör Türleri

Tümör çeşitleri büyüme hızları ve morfolojik özelliklerine göre iki sınıfta incelenmektedirler. Bunlar:

1. Benign tümörler (iyi huylu tümörler de denir).
2. Malign tümörlerdir (habis veya kötü huylu tümörler de denir).

Çizelge 2.1. Benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörlerin farklarına göre sınıflandırılması (Kırdar, 1979; Cooper ve Hausman, 2006).

BENIGN (İYİ HUYLU) TÜMÖRLER	MALIGN (KÖTÜ HUYLU) TÜMÖRLER
Yavaş çoğalırlar.	Benign tümörlere göre çabuk çoğalırlar.
Normal doku yapısına büyük benzerlik gösterirler.	Malignant durum ilerledikçe köken aldıkları dokuya benzerlikleri azalmaktadır.
Köken aldıkları dokunun karakterini benimserler.	“ <i>Anaplastic</i> ” olurlar. Köken aldıkları dokuların normal hücrelerinden daha az farklılaşmışlardır.
Etrafları bir kapsül ile çevrilidir.	Bölünmede ve çoğalmada kural tanımayan, anarşik bir yapı gösterirler ve etraflarında kapsül yoktur.
Herhangi bir yayılma tehlikeleri yoktur. Lokal kalırlar ve bazen de kendiliğinden küçülebilirler.	En belirgin özelliklerinden bir tanesi vücudun diğer dokularına taşınmasıdır; bu duruma metastaz adı verilir.
Oluştukları yere ya da organa baskı yaparak onların işlevlerini bozabilirler.	Taşındıkları yere yerleşerek bir tümör meydana getirebilirler.
Genellikle ölüme sebep olmazlar.	Erken teşhis edilmezse ölüme neden olabilir.
Köken aldıkları hücreye göre isimlendirilirler (örneğin; kastan köken alıyorsa <i>miyom</i> adı verilir. Salgı bezinden köken alıyorsa <i>adenom</i> adı verilir.	Köken aldıkları hücreye göre isimlendirilirler. Kanserin çoğu üç ana grupta toplanabilir. Karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar.

2.3. İnsan Tümörlerinin Sınıflandırılması

Endoskopik teşhis için gerekli olan ultrasonografi, fiberoptik cihazlar, anjiyografi ve bilgisayar destekli tomografi tümörün teşhisi ve tümörün bulunduğu yerin incelenmesinde kullanılan bazı cihazlardır. Kesin teşhis uzman patolog tarafından yapılan histolojik/patolojik inceleme ile konulabilir.

İnsan tümörlerinin sınıflandırılması aşağıdaki kriterlere göre yapılmaktadır:

1. Primer tümörün bulunduğu anatomik yere göre yapılabilir (örneğin; akciğer, meme, kalın bağırsak gibi).
2. Doku tipi ve histolojik sınıflandırmaya göre yapılabilir.
3. Malignant dokunun (tümörün) histolojik sınıflandırılmasına göre yapılabilir.

4. Tümörün ilerleme derecesi, invazyonun (metastatik yayılmanın) büyüklüğü ve derecelendirilmesine göre yapılabilir.

Tümörün bulunduğu yer:

1. Tümörün vücut fonksiyonlarına olan etkisini.
2. Metastatik yayılmanın yönü ve ihtimalini.
3. Uygulanacak tedavi çeşidini gösterir.

Tümörün, primer (dokunun bulunduğu yerde oluşan tümörler) ya da sekonder (başka bir yerde oluşup metastazla o dokuya gelen tümörler) olduğunun bilinmesi çok önemlidir. Çünkü bunların tedavi edilmeleri ve hayatta kalma olasılıkları farklılık göstermektedir.

2.4. Doku Tipi ve Histolojik Sınıflandırma

Tümörlerin tanımlanmasında kullanılan en yaygın metot sitolojik ve histolojik sınıflandırmadır. Bu sınıflandırma hücre veya doku isimlerinin sonuna bazı eklerin getirilmesi ile yapılmaktadır. “Oma” son eki genelde benign tümörlerin isimlendirilmesinde kullanılırken, bazı hallerde malignant tümörler için de bu ek kullanılabilir. Bu durumda sözcüğün önüne malignant ifadesi getirilmektedir (örneğin; malignant lenfoma ve malignant melanoma). Malignant tümörlerde, epitel dokulardan köken alanlar “karsinoma”; bağ dokusundan köken alanlar ise “sarkoma” olarak isimlendirilmektedir (örnek olarak; meme adenokarsinoması). “Blastom” veya “blastoma” ekleri ise tümörün embriyonel hücreleri taklit ettiğinin göstergesidir. Bu eki alan tümörler genellikle çocukluk döneminde görülen malign tümörlerdir (Lever, 1975; Kırdar, 1979; Canda ve Canda, 1982).

Tümörün köken aldığı hücrelere işlevsel ve yapısal olarak benzerlik derecesine diferansiyasyon adı verilir. Bu benzerlik fazla ise iyi diferansiye, az ise kötü diferansiye olarak tanımlanır. Malignant bir tümör köken aldığı dokuya benzemiyor ise anaplastik ya da undifferentiated diye isimlendirilir.

Bir tümör eğer metastaz yaptıysa ona göre isimlendirilir (örneğin; karaciğere metastatik olan kolon adenokarsinoması) (Arslan, 2001). Histolojik sınıflandırılma; tümörlerin büyüme ve metastaz şekillerinin belirlenmesini ve tedavi şekillerinin kararlaştırılmasını sağlamaktadır.

Akciğer karsinomaları; üç genel kategoriye ayrılmaktadırlar. Bunlar; epidermoid ya da yassı hücre karsinomaları, undifferentiated (farklılaşmamış küçük ya da büyük hücreler) karsinomalar ve adenokarsinomalarıdır.

- *Epidermoid karsinomalar*; çok yavaş çoğalırlar ve diğer hücre tiplerine oranla daha uzun süre lokal olarak kalırlar. Bu karsinomaların çoğunluğu büyük bronşlarda meydana geldiği için hava yollarının tıkanmasına sebep olabilmektedirler. Bu durum ancak cerrahi operasyonlarla tedavi edilebilmektedir.
- *Undifferentiated (farklılaşmamış hücreler)*; oldukça hızlı çoğalırlar ve invaziftirler. Bu hücreler, küçük periferel bronşlarda görülmektedir. Teşhis edilene kadar %70 kadarı uzak noktalara metastaz yapabilmektedir. Özellikle otopsi esnasında patolojik olarak teşhis edildiğinde, küçük hücre karsinomasından çok yassı hücre karsinomasına benzedikleri görülmüştür. Bu durum, tümörün köken aldığı baskın hücre tipinin kemoterapi sonucunda ortadan kalkması ve ilaca dirençli küçük hücre popülasyonlarının çoğalmasından kaynaklanmaktadır.
- *Adenokarsinomalar*; akciğer periferinde oluşurlar ve çoğunlukla akciğerle ilişkili olan semptomlar göstermezler. Diğer akciğer karsinomalarının aksine sigarayla ilişkili olmadıkları bilinmektedir.

Lösemiler; kemik iliğinde bulunan hematopoetik adı verilen kanı oluşturan kök hücrelerden temel almaktadırlar. Beyaz kan hücresi tümörlerini tanımlamak için kullanılırlar. Kırmızı kan hücrelerinden kaynaklananlar ise eritrolösemi olarak tanımlanmaktadır. Lösemili vakaların çoğunda Philadelphia kromozomu [t(9;22)] görülmektedir. AML (akut miyelositik lösemi), CML (kronik miyelositik lösemi), ALL (akut lenfositik lösemi) ve CLL (kronik lenfositik lösemi) olmak üzere lösemilerin dört tane yaygın tipi bulunmaktadır:

- *AML*; yaşamın bütün dönemlerinde meydana gelme ihtimali bulunmaktadır. Çocuklarda ikinci en sık görülen bir kan kanseri türüdür.
- *CML*; hücre farklılaşmasında AML'ye kıyasla önemli bir fark yoktur. Granüllü kan hücrelerinin (eozinofil, bazofil) aşırı çoğalması sonucu görülen bir lösemi çeşitidir. Lösemilerin yaklaşık %10 kadarını oluştururlar.
- *ALL*; hastaların 2/3'ü 15 yaş altı bireylerden meydana gelmektedir. Anemi, kanama ve enfeksiyonlar en yaygın görülen semptomlardır. Yetişkinlerde en sık görülen ikinci akut lösemi türüdür. Tedavisi için birçok ilaç ve/veya kombine tedavi yöntemi geliştirilmiştir [JAK inhibitörü ruxolitinib, proteozom inhibitörü bortezomib, coltuximab ravtansine (anti-CD19 monoklonal antikor), obinutuzumab (anti-CD20 monoklonal antikor)] (Terwilliger ve Abdul-Hay, 2017).

- *CLL*; batıda en yaygın görülen lösemi türüdür. 2013'te Amerika Birleşik Devletleri'nde 15680 kişi CLL ile teşhis edilmiştir (Parikh vd., 2014). Hastaların %85'ini 55 yaş ve üzeri; %31'ini ise 75 yaş ve üzeri bireyler oluşturmaktadır. Lenfoid hücrelerde çoğalma ve kemik iliği, kan, lenf nodları, karaciğer ve dalakta birikme görülmektedir. Hastaların büyük bir kısmında lösemilerin çoğunda olduğu gibi yorgunluk, kilo kaybı, karaciğer ve dalakta meydana gelen büyümeden dolayı karın bölgesinde görülen rahatsızlıklar gibi hafif semptomlar izlenmektedir (Lever, 1975; Kırdar, 1979).

Çizelge 2.2. İnsan tümörlerinin doku tipine göre sınıflandırılması (Kırdar, 1979).

DOKUNUN ORJİNİ	BENİGN	MALİGNANT
<p><u>Epitel</u></p> <p>Yüzey epiteli (salgı yapmayan)</p> <p>Salgı epiteli</p>	<p>Papilloma</p> <p>Adenoma</p>	<p>Karsinoma (yassı hücre, epidermoid, geçiş hücresi)</p> <p>Adenokarsinoma</p>
<p><u>Bağ dokusu</u></p> <p>Fibröz doku (Lifli doku)</p> <p>Kıkırdak</p> <p>Kemik</p> <p>Yağ</p>	<p>Fibroma</p> <p>Kondroma</p> <p>Osteoma</p> <p>Lipoma</p>	<p>Fibrosarkoma</p> <p>Kondrosarkoma</p> <p>Osteosarkoma</p> <p>Liposarkoma</p>
<p><u>Endotel doku ve türevleri</u></p> <p>Lenf damarları</p> <p>Kemik iliği</p> <p>Granüositler</p> <p>Eritrositler</p> <p>Lenfositler</p> <p>Plazma hücreleri</p>	<p>Lenfangiyoma</p> <p>---</p> <p>Polisitemiya vera</p> <p>Enfeksiyöz mononükleosis</p> <p>---</p>	<p>Lenfangiyosarkoma</p> <p>Miyelositik lösemi</p> <p>Eritrositik lösemi</p> <p>Lenfositik lösemi</p> <p>Multiple miyeloma</p>
<p><u>Sinir doku ve türevleri</u></p> <p>Glial doku</p> <p>Menign</p> <p>Nöronal hücreler</p> <p>Sinir kılıfı</p>	<p>“Benign” gliomlar (bazı ependimomas ve oligodendrogliomaslar malignant değildir)</p> <p>Meningiyoma</p> <p>Ganliyonöroma</p> <p>Nörilemmoma</p>	<p>Glioblastoma multiforme</p> <p>Medullablastoma, astrositoma, ependimoma, oligodendroglioma</p> <p>Meningeal sarkoma</p> <p>Nöroblastoma</p>

3. KANSER HÜCRESİ VE NORMAL HÜCRE ARASINDAKİ FARKLAR

Hücrelerde ortaya çıkan ve onları normal eş değerinden ayıran çevresel ya da genetik olabilen multiple faktörlü bazı değişiklikler sonucunda kanser gelişebilmektedir. Kanser temelinde öldürücü olmayan genetik hasar vardır. Kanser hücrelerinde hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülmektedir. Kanser hücreleri, hücre kültürlerinde de kontrolsüz *in vivo* çoğalma sırasında sergiledikleri davranışları taklit etmektedirler (Crane, 2001; Cooper ve Hausman, 2006).

Çizelge 3.1. Kanser hücresi ve normal hücreler arasındaki farklar (Kırdar, 1979; Cooper ve Hausman, 2006; Cummings vd., 2006; Özensoy, 2006).

KANSER HÜCRESİ	NORMAL HÜCRE
Apoptozis (programlı ölüm) görülmez.	Apoptozis görülür.
Kanser hücrelerinde telomerler, telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler.	Normal hücrelerde telomeraz enzimleri zamanla azalır ve telomerler yenilenemez.
Kanserli hücrelerin morfolojileri farklılık ve değişiklik gösterir.	Normal hücrelerin morfolojileri birbirine yakındır.
Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre çekirdekleri büyüktür ve hiperkromatiktir. Çekirdek/sitoplazma oranı yüksektir ve çok belirgin çekirdekçiğe (nükleolusa) sahiptir.	Çekirdek, çekirdekçik ve sitoplazma normal sağlıklı hücre yapılarındadır.
Mitoz bölünme normal hücrelere göre fazladır (1000 hücrede 20 veya daha fazla).	Mitoz bölünme normal sayıda görülür (1000 hücrede 1'den daha az).
Hücreleri ölümsüzdür (immortal).	Hücrelerin belli bir yaşam süresi vardır.
Kanser hücreleri hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Çoğalmak için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileri salgılayabilirler (otokrin çoğalma uyarımı).	Hücre dışı büyüme faktörlerine gereksinim duyarlar.
Kontakt inhibisyon görülmez.	Kontakt inhibisyon vardır.
Yeni kan damarı oluşumunu (anjyogenez) hızlandıran büyüme faktörü salgırlar.	Yeni kan damarı oluşumu görülmez.
Kanserli hücreler serbest şekilde çoğalırlar ve metastaz yapabilirler.	Normal hücreler buldukları yere yapışarak çoğalırlar.

3.1. Apoptozis

Apoptozis (programlı hücre ölümü) kan hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücrede görülen fizyolojik bir hücre ölüm tipidir. Kanser hücrelerinde apoptozis görülmediğinden dolayı normal hücelere göre daha uzun yaşamaktadırlar. Apoptozis, fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılmaktadır. Nekrozis ve apoptozis olmak üzere temel olarak iki tür hücre ölüm tipi bulunmaktadır. Nekrozis programlanmamış hücre ölümü; apoptozis ise programlanmış hücre ölümüdür. Nekroziste hücre kontrolsüz biçimde ölüme gider ve hücre parçalanır. Apoptoziste hücrenin kendi ölümü sırasında aktif rol alması ve kendi ölümünün her aşamasına katkıda bulunmasından dolayı apoptozise hücre intiharı ismi de verilmektedir. Nekroziste patlayan hücrenin içerikleri komşu hücelere de zarar verirken; apoptoziste ise patlayan hücreler çevre hücelere zarar vermemektedir (Kırdar, 1979; Ulukaya, 2003; Altınbaş, 2005; Cummings vd., 2006; Cooper ve Hausman, 2006; Pınarbaşı, 2007). Organizmanın bazı hücrelerinde ve dokularında sürekli olarak apoptotik hücreler oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece apoptozis ve mitozis bu dokularda homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelmektedir. Bu hücre ve dokulara örnek olarak; göz, nöronlar, uterus, deri, timus ve ince bağırsak verilebilir (Denizli ve Gürzumar, 1999; Ulukaya, 2003). Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı fazla hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Örneğin; embriyo gelişimi sırasında parmaklar arasındaki perdenin ve sinir sistemindeki nöronların %50'sinin ortadan kaldırılması apoptozis ile gerçekleşmektedir. Ayrıca memeli hücrelerinde ölüm almaçı dış yol ve mitokondriyel iç yol olmak üzere iki tane büyük apoptotik yol belirlenmiştir (Pınarbaşı, 2007). Apoptozisteki bozukluğun neden olduğu aşırı hücre artışı kanser ve otoimmün hastalıklara; hücre azalışı ise AIDS ve nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır. Apoptozisin özellikle embriyonun gelişim ve farklılaşmasında önemli rolü bulunmaktadır. Bunun yanı sıra bağışıklık sisteminde sitotoksik bazı lenfosit hücrelerinin eliminasyonunun apoptozis ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Apoptozisin diğer bir fonksiyonu ise hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin yıkımını sağlamasıdır. Bu tip hücreler mutasyon birikimine uğramadan ve bir tümör hücresine dönüşmeden önce apoptotik program ile yok edilmektedir. Doku homeostazisi için hücreler ortamdan programlı olarak ölecek kaybolmaktadırlar (Casciato ve Lowitz, 2004; İncesu ve Akalın, 2004).

Kanser hücrelerinin apoptozisten etkilenmemesi tümör gelişimini hızlandırmaktadır. Normal çevresel sinyaller ortadan kalktığında tümör hücrelerinin apoptozise girmemesi sadece primer tümörün gelişmesi açısından değil; ayrıca metastatik hücrelerin vücudun başka bölgelerinde canlılıklarını korumaları ve çoğalmaları açısından da önem taşımaktadır. DNA

hasarı meydana geldiğinde normal hücreler apoptozise girerken kanser hücreleri apoptozise giremediği için sınırsız sayıda bölünerek fazla miktarda hücre oluşturmaktadırlar. Kanser hücrelerindeki telomerler RNA ve proteinden oluşan telomeraz denilen enziminin etkisiyle yenilenmektedirler. Kanser hücrelerinde bulunan telomerlerin uzunluğu normal hücrelerdeki telomerlerin aksine sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır. Bunun sonucunda kanser hücreleri DNA hasarına yol açarak kemoterapötik ajanlara direnç göstermektedirler (Kırdar, 1979; Cooper ve Hausman, 2006; Özensoy, 2006; Kirman, 2012). Hücreler yaşlandıkça hasar gören kısımları hücrelerden gelen sinyallere göre kendilerini yok ederler. Bu durum plazma membranının şişmesi, hücrede büzüşme ve DNA fragmantasyonu gibi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler şeklinde meydana gelir. Bazı hormonların apoptozisi arttırdığı, azalttığı veya apoptozisin başlamasını engellediği bilinmektedir (Warner, 1972). Apoptozis, memelerin normal gelişimlerinde oldukça sık karşılanan bir özelliktir (Akdaş ve Çevik, 1996; Yan vd., 2008). Apoptotik hücreler mikroskobik olarak tanınır. Apoptozis sırasında çekirdek yoğunlaşır ve fragmanlarına ayrılır. Hücreler apoptotik cisimciklere ayrıldığında, bu cisimcikler fagositozla makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından alınır. Nekrozisin tersine apoptozis enflamasyona yol açmaz. Apoptozis bazı spesifik proteinlerin sentezi/aktivasyonu ile (yani kaspazlar) gerçekleşmektedir (Ersoy, 2011).

3.1.1. Apoptotik hücrenin karakteristik özellikleri

Apoptozise uğrayan hücrede biyokimyasal ve morfolojik düzeyde birçok değişiklik meydana gelmektedir. Apoptozisin erken dönemlerinde kaspazlar aktive olmaktadır. Kaspazlar normal hücre fonksiyonları için gerekli olan proteinlerin ve DNA tamirinde rol alan nükleer proteinlerin yıkımından sorumludurlar. Ayrıca kaspazlar DNazlar gibi çekirdekte DNA'yı parçalayan başka yıkıcı enzimleri aktive etmektedirler. Bu biyokimyasal değişiklikler sonucunda hücrede bazı morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlar:

1. Hücre küçülür ve büzülür.
2. Çekirdekte küçülme ve kırılma meydana gelir.
3. Membran yüzeyinde küçük kesecikler oluşur.
4. Hücre kültürlerinde petri kabına yapışık olarak büyüyen apoptotik hücreler, kabın dibinden sökülerek besiyerinde asılı dururlar. Dokularda ise apoptotik hücreler komşu hücrelerden ayrılmaktadırlar.

5. Hücre küçük parçacıklara bölünür ve apoptotik veziküller oluşmaktadır. Bu küçük veziküller içerisinde organeller bozulmadan durmaktadır ve hücre içeriği dışarıya salınmamaktadır. Meydana gelen apoptotik veziküller komşu hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagozite edilmektedirler.
6. Normalde membran yapısı asimetriktir. Ancak apoptotik hücrelerde asimetrik yapı korunmamaktadır. Çift katlı lipid membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine fosfolipidlerin molekülleri transfer olmaktadır.
7. Apoptotik hücrelerde kromatin 200 baz çifti (bç) fragmentlere kırılmaktadır ve agaroz jel elektroforezinde merdivenimsi görüntü meydana gelmektedir (A. Koşar ve Özçelik, 1998; Çalışkan, 2000; İncesu ve Akalın, 2004; Ö. Kandaş, 2004; Yerlikaya, 2009; Okur, 2010).

3.1.2. Apoptoziste kaspazların ve mitokondrinin rolü

Kromatin kondensasyonu, DNA fragmantasyonu ve membranla çevrili vezikül oluşumunun görüldüğü bir dizi olay içeren apoptozis yaklaşık 30-60 dakika sürmektedir. Apoptozis esnasında kaspazlar tarafından yıkılan 40 tane substrat tespit edilmiş olup bu substratların yıkımı apoptozisi tetiklemektedir. Kaspazlar, hücreyi apoptozisten koruyan proteinleri ortadan kaldırırlar ve inaktivite ederler. Bu proteinlerden bir tanesi I^{CAD}'dir. Bu protein normalde CAD (kaspaz ile aktivite olan deoksiribonükleaz) proteinine bağlanarak hücre içinde bu enzimi inaktif halde tutmaktadır. Apoptotik bir uyarı meydana geldiğinde kaspazlar aktive edildiğinde I^{CAD} inhibitörünü yıkarak CAD enzimini serbest bırakırlar. Serbest kalan CAD enzimi nükleozomlar arasındaki DNA'yı kırarak 200 bç uzunluğunda DNA fragmentleri meydana getirir. Oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezinde DNA merdiveni şeklinde görülmektedirler (Enari vd., 1998; Yerlikaya ve Dokudur, 2009).

Bunların yanında kaspazlar ayrıca apoptozisi inhibe eden negatif regülatörleri yıkarak hücre ölümünü tetiklemektedirler. En önemli negatif apoptozis inhibitörü Bcl-2'dir. Bcl-2 ailesi; hücre kaderini belirlemede önemli rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan meydana gelmektedir. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozisi indükleyici etkiye sahipken; anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri ise apoptozisi baskılayıcı etkiye sahiptir. Pro-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını uyarılmaktadır. Anti-apoptotik proteinler ise sitokrom-c salınmasını baskılamaktadırlar. Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik proteinler Bcl-2 gibi işlev gören ve benzerlik gösteren bazı apoptozis inhibitörleridir. Bax, Bak, Bad ve Bcl-xs proteinleri ise yine Bcl-2 proteinine

benzerlik gösteren fakat apoptozisi indükleyen bazı pro-apoptotik proteinlerdir (Reed, 2000; Ulukaya, 2003; İncesu ve Akalın, 2004; Holcik vd., 2005; Yerlikaya ve Dokudur, 2009).

Kaspaz zinciri ve apoptozisin düzenlenmesinde en önemli rolü oynayan organel mitokondridir. Mitokondriden sitokrom-c salınması, kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivasyonuna neden olmaktadır. Mitokondriyel yol ile apoptozis uyarılması apoptozom oluşumu ile sağlanmaktadır. Apoptozom çok proteinli bir yapı olup sitokrom-c, Apaf-1, prokaspaz-9 ve ATP içermektedir. Mitokondri membranında bulunan anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri (Bcl-2 ve Bcl-xl) hücre yaşamını teşvik ederken aynı protein ailesinden olan Bax ve Bad proteinleri hücreleri ölüme sürüklemektedir. Bax proteini, dış mitokondri membranında por oluşturarak membran potansiyelinin kaybolmasını ve porlardan sitokrom-c salınmasına neden olmaktadır. Bcl-2 ve Bcl-xl proteinleri mitokondri membranında por oluşmasını engellemektedirler. Bax ya da Bad proteinleri Bcl-2 veya Bcl-xl ile heterodimer oluşturarak Bcl-2 ve Bcl-xl proteinlerinin koruyucu etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Böylece mitokondriden salınan sitokrom-c, Apaf-1 ve prokaspaz-9 apoptozomu oluşturarak kaspaz zincirini aktive etmekte ve hücre ölümünü gerçekleştirmektedir (Pınarbaşı, 2007; Şeker, 2010).

3.2. Büyüme Faktörlerine Duyarlılık

Kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki ilk fark normal hücrelerin çoğalmasının yoğunluğa bağlı inhibisyondan etkilenmesidir. Normal hücreler kültür ortamında bulunan büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalırlar. Bu yoğunluğa eriştiklerinde ise çoğalmayı kesip sessiz faza geçerler ve hücre döngüsünün G₀ fazında dururlar. Kanser hücreleri ise yoğunluğa bağlı inhibisyondan etkilenmeyip çoğalmalarına devam etmektedirler. Kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki diğer bir fark ise kanser hücrelerinin hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duymasıdır (Cooper ve Hausman, 2006; Cummings vd., 2006).

3.3. Kontakt İnhibisyon

Hücre - hücre etkileşimleri açısından kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki bir diğer fark kontakt inhibisyonudur. Normal fibroblastlar kültür kabında komşu hücrelerden birine temas edinceye kadar ilerlemektedir. Başka bir hücre ile temas kurdukları anda ise hareketlerine son vermektedir. Böylece hücrenin daha fazla hareket etmesi engellenmekte ve normal hücreler birbirlerine tutunarak kültür kabı yüzeyinde düzenli bir şekilde sıralanmaktadır. Tümör hücreleri ise komşu hücrelerle temas ettikten sonra bile hareketlerini sürdürürler ve yanlarındaki hücrelerin üzerine çıkarak çok katlı ve düzensiz kümeler oluştururlar. Normal hücreler bu

etkileşim sonucunda sadece hareketlerine değil çoğalmalarına da son verirlerken; kanser hücreleri ise çoğalmaya devam ederler (Cooper ve Hausman, 2006).

3.4. Otokrin Çoğalma

Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine bağıllığı normal hücrelere göre daha az olduğu için bu özellik tümör hücrelerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda kontrolsüz çoğalmalarını sağlamaktadır. Kanser hücreleri bazı durumlarda çoğalmak için gerekli olan büyüme faktörlerini kendileri de sağlayabilmektedir. Hücrenin gerek duyduğu büyüme faktörünün bu şekilde kendisi tarafından salgılanması hücreyi sürekli olarak çoğalmaya uyarılmaktadır. Bu duruma otokrin çoğalma uyarımı ismi verilmektedir (Cummings vd., 2006).

Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaması; hücre çoğalmalarını sağlayan sinyal yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerinden, hücre içi sinyal sistemlerinde meydana gelen anormalliklerden ya da Ras proteinleri gibi proteinlerin kontrolsüz aktivitesinden kaynaklanabilmektedir (Cummings vd., 2006).

3.5. Proteazlar ve Anjiyogenez

Kanser hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren ve bu yüzden invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan proteazlar ve anjiyogenez olmak üzere iki özelliği bulunmaktadır. Proteazlar malign hücrelerde hücre dışı matris bileşenlerini parçalayarak kanser hücrelerinin normal komşu dokunun içine girmesine izin verirler. Örneğin, hücrelerden salgılanan kollajena enzimi karsinomların bazal laminayı parçalayıp aşarak altındaki bağ dokusuna girebilmesini sağlayan önemli bir proteazdır. Anjiyogenez, mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi olup, vücutta doğal olarak meydana gelen bir süreçtir. Bazı durumlarda anjiyogenez patolojik olabilmektedir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenirken; patolojik anjiyogenez ise çeşitli kanserlerde (meme, kolon, uterus, serviks, pankreas gibi), inflamatuvar hastalıklarda ve göze hastalıklarında ortaya çıkmaktadır. Kan desteği olmayan kanser kolonileri çap olarak 1 mm'den daha fazla büyüyememektedirler. Hücre sayısı bir milyonu aştığında oksijen ve besin maddelerinin hücrelere ulaşması ve tümörün büyümeye devam edebilmesi için yeni kan damarların oluşması gerekmektedir. Kanser hücreleri yeni damarların oluşumunu hızlandıran büyüme faktörleri salgılamaktadırlar. Tümör hücresi tarafından salgılanan ve çevre doku kapillerinin duvarlarındaki endotel hücrelerin çoğalmalarını uyararak büyüme faktörlerine yanıt olarak yeni damarlar ortaya çıkar ve sonuçta tümörün içine doğru uzanan yeni kapiller meydana gelir. Bu yeni damarların oluşumu sadece tümörün büyümesi açısından değil, aynı zamanda metastaz

açısından da çok önemlidir. Tümör hücreleri anjiogenik uyarı sonucunda gelişen yeni kılcallara kolayca girebildiği için bu olay kanser hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastazın başlamasına imkan sağlamaktadır. Anjiogenezin düzenlenmesi, tümör ve stroma hücreleri tarafından salınan çoklu molekül tarafından gerçekleştirilmektedir. Anjiogenez tümör gelişimi üzerinde güçlü bir etken olmakla birlikte kötü huylu tümörler için olduğu kadar; iyi huylu tümörler için de vazgeçilmez bir büyüme faktörüdür (Henderson vd., 1988; Alberts vd., 2002; Cooper ve Hausman, 2006; Mermercioğlu, 2008).

3.6. Metastaz

Primer tümör kitlesinden ayrılan kanser hücrelerinin buldukları dokunun dışında, doğrudan ya da lenf damarları aracılığıyla başka doku ve organlara yerleşmesine metastaz adı verilmektedir. Malign tümörlerin belirleyici bir özelliği olan metastaz, erken veya geç dönemde ortaya çıkabilmektedir. Metastatik kitle, primer tümör gibi davranıp yeni metastazların çıkmasına yol açabilmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimi düzensiz olup, yüzey adhezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin çoğunda tutunma yeteneği normal hücrelere göre daha azdır. Bu da kanser hücresinin yayılma ve metastaz yapma yeteneğini artırır. Kanser hücrelerinin tutunma yeteneğinin azalması ise hücre morfolojisi ve iskeletinde değişikliklere yol açmaktadır (Kırdar, 1979; Preiss vd., 2002; Altınbaş, 2005; Karan, 2006; Cooper ve Hausman, 2006).

4. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ

Birçok kanserin çoğalması sadece tek bir hücreden meydana gelmektedir. Normal bir hücrenin kanser hücresi haline dönüşmesi için onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hücrenin normal sınırının çok ötesinde çoğalmasını sağlayacak birkaç değişiklik geçirmesi gerekmektedir. Bu süreç birçok özellik kazanmış malign hücrelerden oluşan bir klonun oluşumuna yol açmaktadır. Eğer organizma bu klonu tolere edip rahatsız edilmeden kalırsa çoğalmaya devam edebilir ve bu süreçte içerdiği hücreler artan bir modifikasyon gösterir. Bu durumda en uygun ve en saldırgan hücreler daha örgütsüz olan hücrelerin yerini alacaktır. Tümörler bu şekilde malign hale gelmektedirler. Kanser tedavisinin zor olmasının sebeplerinden biri de budur (Boyle ve Levin, 2008). Negatif veya pozitif uyarılar genetik lezyona yatkın olan hücrelerde malign çoğalmaya neden olabilmektedir. Nekroz, malign gelişimi en aza indirmeye yardımcı mekanizmalardan biridir ve organizma homeostasis mekanizmalarının bir parçasıdır. Bu nedenle nekroz indüklenmesi olası tedavi mekanizması olarak değerlendirilmektedir. HDGF (hepatoma derived growth factor) ve HMGB1 (high mobility group protein B1) gibi nekrozda ölen hücrelerden moleküllerin salınımının immün yanıtı uyardığı veya yara onarımını aktif hale getirdiği düşünülmektedir (Guimaras ve Linden, 2004; Zong ve Thompson, 2006). Hasarlı dokuların onarımı destek dokunun ve somatik hücrelerin çoğalması ile gerçekleşmektedir. Hücrelerin farklılaşmasında, büyümesinde ve çoğalmasında etkili olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar ve hücre döngüsünün inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine yol açan tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine neden olmaktadır (Vermeulen vd., 2003). Homeostasis, hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis ile sürdürülmektedir. DNA onarımı ve apoptozisin engellenmesi kanser gelişiminde büyük paya sahiptir (Bellamy, 1996).

4.1. Onkogenler

Onkogenler hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında rol alan büyüme faktörleri ile bu büyüme faktörlerinin sinyal iletiminde yer alan proto-onkogenlerin değişikliğe uğramış homologlarıdır. Onkogenler, kontrolünü kaybetmiş protein kodlayan genlerdir. Bu genler kanser gelişiminin başlangıcında rol oynadıkları gibi ayrıca gen ekspresyonunu hızlandıran yada kodladıkları proteinlerde kontrolsüz aktivite artışına neden olan genetik değişikliklerin sonucunda anormal hücre çoğalmasına da sebep olmaktadır. Onkogenler hücrenin malign değişimine yol açan çeşitli proteinlerin sentezinden sorumludur. Onkogen ürünü olan onkoproteinler hücrede sürekli olarak etkin kalmakta ve inaktive olamamaktadırlar. (Cooper ve Hausman, 2006; Dinçer, 2013).

Onkogenler, büyüme faktörü reseptörü olarak işlev görmektedirler. Bazı onkogenlerin yapısında değişmiş bir takım reseptörler kodlanmaktadır ve bunlar büyüme faktörünün yokluğunda bile işlev yapmaktadır. Birçok onkogen hücre içi sinyal iletici olarak da görev almaktadır. Bunlara örnek olarak SRC ve ras ailesi üyeleri verilebilir. Bazı onkogenler ise transkripsiyon faktörleridir. Hücrenin büyüme durumunda değişiklik olması için gende de bazı kalıcı değişikliklerin olması gerekmektedir. Bu yüzden onkogenlerin en son hedefi gen transkripsiyonunu değiştirmek olmalıdır. Onkogenlerdeki mutasyonlar dışarıdan bir uyarı olmaksızın sürekli olarak hücre bölünmelerine neden olmaktadır. Tek bir mutasyon hiçbir zaman transformasyon fenotipi için yeterli değildir. Transformasyon fenotipi oluşturmak için en az iki faktörün olması gerektiği iki darbe (vuruş) hipotezi ile savunulmaktadır. Örneğin, myc ve ras onkogenlerinin tek başlarına hücrede transformasyon fenotipine neden olmadıkları ancak birlikte verildiklerinde ise transformasyon fenotipine neden oldukları tespit edilmiştir (Kırdar, 1979; Başaran, 1999; Dilsiz, 2004).

İnsan tümörlerinde hücrel onkogenlerin etkinliğine ilişkin ilk bulgu 1981 yılında Robert Weinberg tarafından gen transfer deneyleri ile elde edilmiştir. Ras, gen transfer deneyleri ile ilk tanımlanan insan onkogenidir. Normal hücrelerde ras onkogenleri bulunmamaktadır. Genellikle tümör gelişimi sırasında gerçekleşen mutasyonlar sonucunda tümör hücrelerinde ortaya çıkmaktadırlar (Şenel ve Çırakoğlu, 2003).

4.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Hücrel onkogenlerin aktivasyonu, tümör gelişmesi ile ilgili iki temel genetik değişiklikten birincisidir. Diğeri ise tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Tümör baskılayıcı genlerin hücre üzerindeki etkileri resesif oldukları için her iki allelde değişiklik olmasıyla genler inaktive olabilmekte ve böylece hücre üzerindeki fonksiyonu tamamen ortadan kalkmaktadır. İnaktivasyon sonrasında ise hücre üzerindeki kısıtlayıcı etki ortadan kalkarak kanser gelişimi meydana gelebilmektedir. Tümör baskılayıcı genler normal koşullarda hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılamaktadır. Anti-onkogenlere tümörü baskılayan genler ismi de verilmektedir. Bunlar doğal hallerindeyken hücre bölünmesini ve çoğalmasını durduran genlerdir. Tümör baskılayıcı genler zarar görmüş DNA'yı tamir ederler veya hücre hasarı varsa apoptozisi başlatarak tümör büyümesini baskılayan proteinleri kodlamaktadırlar. En önemli tümör baskılayıcı proteinler retinoblastoma ve p53'tür (Cooper ve Hausman, 2006; Jones, 2001; Çavga, 2013).

4.2.1. Retinoblastoma (Rb) geni

DNA tümör virüslerindeki onkogenlerin retinoblastoma (Rb) ile etkileştiğinin tespit edilmesi kanser açısından en önemli keşiflerden biridir. Ender görülen bir çocukluk dönemi göz retiansı tümörü olan retinoblastomun incelenmesi ile ilk tümör baskılayıcı gen ortaya çıkmıştır. Retinoblastom hastalarının çoğunda 13. kromozomda delesyon olduğu tespit edilmiş ve bu etkilenen gene retinoblastoma adı verilmiştir. Alfred Knudson 1971 yılında retinoblastomun gelişmesi için iki mutasyonun gerekli olduğu hipotezini ortaya atmıştır. Günümüzde bu hipotezin normal diploid hücrelerdeki homolog kromozomlar üzerinde yer alan Rb geninin iki sağlam kopyasının da ortadan kalkması gerektiği düşünülmektedir. Retinoblastomun kalıtsal ve kalıtsal olmayan olmak üzere iki türü bulunmaktadır. Kalıtsal retinoblastomda, Rb geninin kusurlu bir kopyası genetik olarak kalıtılmaktadır. Ancak genin bir kopyasının bu şekilde ortadan kalkması tümörü başlatmak için yeterli değildir. Retinoblastom gelişebilmesi için ayrıca diğer normal Rb allelinin de işlevini yitirmesine neden olan ikinci bir somatik mutasyonun ortaya çıkmalıdır. Kalıtsal olmayan retinoblastomda ise hastalığın ortaya çıkabilmesi için sağlam iki allelin de işlevini ortadan kaldıracak birbirinden bağımsız iki ayrı mutasyonun gerçekleşmesi gerekmektedir (Kırdar, 1979; Cooper ve Hausman, 2006).

Aynı zamanda Rb geninin hücre döngüsünde de önemli rolü bulunmaktadır. Aktif ve inaktif formları bulunmaktadır. Aktif formu, hücre döngüsünde G₁ evresinden S evresine geçerken fren görevi üstlenmektedir. Hücreler GF (growth factor, büyüme faktörü) ile fosforile olunca Rb geni inaktif hale geçerek fren vazifesi ortadan kalkmaktadır. S evresine giren hücreler ise bölünmeye başlamaktadır. Rb'nin bu etkilerinde rol oynayan önemli bir faktör de E2F proteindir. E2F ile sıkı bağlantıda iken fosforile olup E2F'yi serbest bırakmakta ve serbest kalan E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücrenin S evresine girmesini sağlamaktadır. Eğer E2F'nin regülasyonu bozulur ya da Rb proteini olmazsa hücre döngüsünün moleküler freni bozulmakta ve bunun sonucunda da hücreler sürekli olarak S evresine girmektedirler. Rb görev yaptığı müddetçe fonksiyonunu düzenleyen siklin, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerindeki mutasyon Rb kaybının neden olduğu etkileri taklit ederek hücreye zarar vermektedir. Hücre döngüsü kontrolünün kaybı, malign transformasyonun merkezi olup hücre döngüsünün en az dört anahtarından (Rb, siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden olan p16) birinin mutasyonu gerekmektedir (Haydaroglu vd., 2007; Çavga, 2013).

4.2.2. p53 geni

Tümör virüslerindeki onkogenlerin retinoblastoma ile olan ilişkilerinin belirlenmesi, p53 (tümör baskılayıcı protein 53) olarak isimlendirilen diğer bir proteinle olan ilişkiyi ortaya çıkarmıştır. 53 kDa moleküler ağırlığa sahip olmasından dolayı p53 ismi verilmiştir. İlk olarak SV40 proteinlerinden T antijeni proteini ile birleşen bir protein olarak keşfedilmiştir. 17. kromozomda yer alan p53 geni 393 aminoasitten meydana gelmektedir. Pro-apoptotik bir protein olan p53 tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. DNA hasarı ve onkogenik transformasyon sonucu aktive olmaktadır. Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozisi uyarmakta ve böylece kanser oluşumunu engellemektedir. *In vivo* ve *in vitro* şartlarda ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkılmaktadır. Ayrıca p53 hücre döngüsünün normal bir biçimde gerçekleşmesine olanak vermektedir. Eğer hücrede anormal bir durum varsa p53 tarafından hücre döngüsü durdurulmaktadır. Hücre stres altındayken p53 geni apoptozisi tetiklemektedir (Lopes vd., 1997; Cooper ve Hausman, 2006; Yerlikaya ve Dokudur, 2009).

Bazı laboratuvar çalışmaları p53 geninin 4T1 hücrelerindeki hassasiyette anahtar rol oynadığını göstermiştir. Bu sonuçlar proteozom inhibisyonunun 4T1 hücrelerinde p53'ten bağımsız bir şekilde apoptozisi uyardığının göstergesidir. p53 ile ilgili bu çalışmaların amacı hastalığın olası seyirini tespit etmek ve tedavi yöntemi seçimine yardım edebilmektir (Yerlikaya ve Erin, 2008; Yerlikaya ve Dokudur, 2009). Kanserli dokularda p53 geninde yaygın şekilde mutasyonlara rastlanılmaktadır. Tüm kanserlerin %50'sinde p53 mutasyonları görülmektedir. Ayrıca kalıtsal p53 mutasyonları kanserin kuşaktan kuşağa iletilmesinden sorumludur. Meme kanserlerinin %20'sinde p53 mutasyonu olduğu belirlenmiştir. Medüller karsinomlarda p53 mutasyonlarının yüksek oranda görülmesi hastalığın seyri ile p53 birikimi arasında önemli bir ilişki olduğunu kanıtlar. Hastalığın seyrinin kötü gitmesinden farklı mutasyonlar sorumludur (Walker vd., 1991; Thor vd., 1992; Alberts vd., 1994). p53 geninin aktivasyonu, hücre döngüsünü durdurmakta ve hücrelerin bölünmeden mevcut genetik maddeyi çoğaltarak aşırı birikime yol açtığı endoreduplikasyonu önlemektedir. Endoreduplikasyon insan hücrelerinde yaşamakta ve ölmektedir. Kimyasal araçlar ile kanser hücrelerinde endoreduplikasyonu kasıtlı olarak tetiklemek kanser hücrelerini öldürmektedir. Ancak kullanılan ilaçlar sadece kanser hücrelerini değil sağlıklı hücreleri de öldürmektedir. Sağlıklı hücrelerde p53 genini aktive eden ve kısa süreli genetik malzemenin çoğalmasını engelleyecek hücreleri tetikleyen bir ilaç ile endoreduplikasyon önlenmektedir. Bu nedenle p53 kopyaları olmayan kanser hücreleri, endoreduplikasyonu tetikleyen ikinci bir ilaca karşı duyarlıdır ve yalnızca tümörü hedef alarak kanser hücrelerini öldürmektedir. p53'ün aktivasyonu geri döndürülebilirdir ve kanser hücreleri ölse bile sağlıklı hücreler yaşamaya devam etmektedir (Cheek vd., 2010).

5. KANSERİN NEDENLERİ

Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğu için çok sayıda değişik faktör kanserin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Radyasyon ve birçok kimyasal karsinojen (kansere yol açan maddeler) hücrede DNA hasarına ve mutasyonlara neden olmaktadır. Mor ötesi ışınlar, aflatoksin ve tütün dumanındaki bir takım kimyasallar insanlarda kanser gelişimine neden olabilen karsinojenler arasındadır (Cooper ve Hausman, 2006). Kanser diğer birçok kötü hastalığın aksine bulaşıcı bir hastalık değildir. İnsanlarda meydana gelen kanserlerin ortaya çıkmasında çevresel, genetik ve kimyasal faktörlerin yanında virüsler, alkol, sigara ve beslenme de önemli rol oynamaktadır. Kanser hastalıklarının %10'a yakınında genetik faktörler etki gösterirken; %90'ında ise çevresel ve kimyasal faktörler etkili olmaktadır (Criss ve Baysal, 1999; Cummings vd., 2006).

5.1. Virüsler

İlk tümör virüsü olan Raus sarcoma virüsü 1911 yılında keşfedilmiş olmasına rağmen uzun yıllar boyunca birçok insan virüslerin kanser nedeni olduğunu reddetmiştir. Bunun sebebi ise birçok tümörde virüslerin görülmemesidir. Fakat yapılan çalışmalarda, birçok durumda virüsün genetik materyalinin konak hücrenin kromozomuna proviral formda virüs partikülleri üretmeksizin entegre olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar herhangi bir virüsün direkt kanser oluşturmadan hücre kromozomuna yerleşerek virüs kökenli kanser meydana getirebileceğini göstermektedir. Çeşitli virüsler farklı kanserlere neden olabilmektedir. Örneğin; Epstein-Barr virüsü (EBV), Burkitt lenfoma ve lenfoepitelyoma denen burun ve boğaz bölgesini etkileyen kanserlere; insan papilloma virüsü (HPV) kadınlarda rahim kanserine ve hepatit B virüsü (HBV) ise karaciğer kanserine neden olabilmektedir. Bu virüsler, kapsüllerinin içerisinde DNA taşımaktadırlar ve hücre içerisine girdikten sonra kendi DNA'larını hücrenin DNA'sına entegre ederek kendilerini kopyalamaktadırlar. Bu entegrasyon hücrenin DNA yapısını etkilediği için normal hücre çoğalmasını da etkilemektedir. Bazı virüsler ise genetik şifre olarak RNA taşımaktadırlar. Bu virüsler hücre içerisine girdikten sonra ters transkriptaz (reverse transkriptaz) adı verilen bir enzim sayesinde konak hücrenin virüs DNA'sı üretmesine neden olmaktadır. Oluşan bu DNA daha sonra hücre DNA'sıyla birleşmektedir. Hücredeki genler arasına entegre olan bu virüs bilgileri, bazen hücrelerin anormal çoğalmasına yol açmaktadır. Onkogen adı verilen bu genlerle enfekte olan hücreler kanserleşmektedir. Virüslerin tümör uyarıcı etkilerinin gösterilmesinde yeni doğan hayvanlar kullanılmıştır. Bunun nedeni ise virüs proteinlerinin virüsler tarafından transforme olan hücrelerin yüzeylerinde bulunmasıdır. Bu durum bu hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından hedef alınıp yok edilmesine sebep olmaktadır.

Yeni doğan hayvanlarda immün sistem bir engel teşkil etmeyecek şekilde virüslerin onkojenik potansiyellerinin gösterilmesini sağlamaktadır. Bazı tümör virüslerinin ise onkojenik potansiyellerini araştırmak için bağışıklık sistemi geçici olarak baskılanabilmektedir. Örneğin iyonize radyasyon ve immün baskılayıcı ilaçlar, virüslerin onkojenik potansiyellerini incelemek için kullanılabilir (Kırdar,1979; Şenel ve Çırakoğlu, 2003)

5.2. Kimyasal Ajanlar

Deney hayvanlarında kanserle ilişkisi tespit edilen birçok kimyasalın insanlarda da kanser nedeni olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bazı kimyasal maddeler, tek bir temastan sonra kanser oluşumunu başlatabilmektedir. Bu tür maddelere initiator yani başlatıcı ismi verilmektedir. Bu maddelere maruz kalma sonucunda kanser meydana gelebilmesi uzun yıllar sürmektedir ve genellikle promotör olarak adlandırılan ve kanser oluşumunu hızlandıran diğer bir ajanın varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Kimyasal karsinogenler, belirgin ortak bir kimyasal yapıları olmayan geniş bir spektruma sahiptir. Direkt işleyenler ve indirekt işleyenler olmak üzere kimyasal karsinogenler ikiye ayrılmaktadırlar. Direkt işleyen karsinogenler, reaktif elektrofilik moleküllerdir. İndirekt işleyen karsinogenler ise elektrofilik gruplar eklenmesiyle direkt karsinogenlere dönüştürülmektedir. İndirekt işleyenlerin aktif karsinogen olabilmesi için metabolik bir aktivasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu metabolik aktivasyon, normal vücut yapısını oluşturan normal enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler özellikle karaciğerde bulunmaktadırlar; çünkü karaciğer vücuda giren zararlı kimyasalları detoksifiye etmektedir. Detoksifikasyon sistemi, yağ hücrelerinde ve lipit mebranlarında biriken yağda çözünen ve suda çözünmeyen tedavi edici ilaçları, polisiklikhidrokarbonları ve böcek öldürücü gibi molekülleri solublüze ederek (çözerek) vücuttan atmaktadırlar (Kırdar, 1979; Şenel ve Çırakoğlu, 2003).

5.3. Genetik Faktörler

Kanser sadece genetik faktörlerin oluşturduğu bir hastalık değildir. Kişilerin yaşam şartlarına, cinsiyetlerine, yaşlarına ve bunun yanında aile öykülerine bağlı olarak kanser risk faktörleri değişiklik göstermektedir. Bu yüzden genetiğe bağlı kanserler tüm kanserlerin sadece %10'una yakın bir kısmını meydana getirmektedir. Bazı kanserlerde ailevi geçişin bir bağlantısı olmadığı halde; mide, bağırsak ve prostat kanseri gibi bazı kanser türlerinde ise ailevi geçişin önemli olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; çocuklarda görülen bir göz kanseri olan retinablastom gibi kanser türlerinde genetik faktörler çok önem arz etmektedir. Meme kanserinin ise sadece %5-10'u ailevi geçişle bağlantılıdır. Ailevi meme kanserlerinin %90'ında BRCA1 ve BRCA2 geninde bozukluk bulunmaktadır. Ailesinde meme kanseri öyküsü olmayan kişilerde de bu iki

gende bulunan bozukluklar meme kanserine yol açabilmektedir (Şenel ve Çırakoğlu, 2003; King ve Mccool, 2004).

5.4. Çevresel Faktörler

Çeşitli kanserlerin çevreye bağlı olarak meydana gelme oranı %80-90 civarındadır. Sağlık açısından çevre; hava, su ve toprağı içeren fiziksel çevre, biyolojik çevre ve sosyal çevre olarak tanımlanabilmektedir. Bunların hepsi birbiri ile etkileşim halinde olup genlerin yapısını etkilemektedir. Çevresel şartlara bağlı olarak elementlerin bazıları bitkiler tarafından bünyelerine alınmakta ve böylece bitkilerden hayvanlara ve insanlara taşınmaktadır. Hava kirliliğı, güneş ve UV ışınları, röntgen ışınları, ısı, mekanik etkiler, atom bombası ve yabancı cisimler kansere neden olan başlıca çevresel etkenler arasında bulunmaktadır. Ayrıca radyasyon, X ışınları ve UV ışınları da DNA'da hasar meydana getirebilmektedir. DNA'da meydana gelen hasarlar bazların değışimine, mutasyona ve onarımda aksaklıklara neden olabilmektedir. UV ışınları DNA'ya ulaştığında pirimidin dimerlerinin oluşumuna sebebiyet verebilmektedir. İki pirimidinin birbirine bağlanması sonucu oluşan dimerler DNA replikasyonunu engelleyerek sentezlenecek olan zincirde boşluklar meydana getirmektedirler. Oluşan bu boşluklarda mRNA transkripsyonu durmakta ve etkilenen genin translasyonu gerçekleşmemektedir (Aksoy, 2002; Demir, 2006). Güneş ışınları ve UV ışınları hassas ciltlerde, derisi açık renk olanlarda ve açık havada çalışanlarda deri kanserlerine neden olabilmektedir. Hava kirliliğı ise akciğer kanserlerinin oluşumunda etkili olmaktadır. 1945 yılında Hiroşima ve Nagazaki'ye atılan atom bombası sonucunda insanlarda myeloma, lösemi, lenfoma ve tiroid kanserlerinde artış meydana geldiğı görülmüştür. Atom bombasının kansere neden olmasında radyasyonun dozu oldukça önem göstermektedir. Atom bombası, atılmasından uzun bir zaman geçmesine rağmen kanser oluşumu açısından etkilerini uzun yıllar devam ettirebilmektedir (örneğin; lösemi) (King ve Mccool, 2004; Yöntem, 2006).

5.5. Sigara, Alkol, Yaşlanma ve Beslenme Faktörleri

Tütün kullanımının başta akciğer, dudak, mide, ağız boşluğu, larinks, özefagus, meme, kolon ve rektum olmak üzere en az on farklı kanserin oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir. Sigara kullanan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre, 1964-1994 yılları arasındaki otuz yıllık süre içinde hastaneye yatan akciğer kanserli hasta sayısının on kat arttığı görülmüştür (Doll ve Hill, 1950; Doll vd., 2004; Tuncer, 2007). Sigaranın yanmasıyla oluşan katranda bulunan kırktan fazla karsinogene tekrarlı olarak maruz kalmanın, normal hücrelerin kanserli hücreye dönüşmesinde ve muhtemelen hücrelerin zarar görmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Tütün katranı gibi karsinojenler

özellikle DNA'ya zarar vermektedirler. Normal hücre bölünmesi ve davranışlarını kontrol için gerekli olan genler DNA'da hasar meydana geldiğinde kansere sebep olabilmektedirler. Tütün katranında bulunan en güçlü iki karsinojen olan benzo(a) piren ve nitrozaminin sigara içenlerin akciğer hücrelerinde DNA'ya bağlı olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Sigara içenlerin akciğer hücrelerinde sigara içmeyenlere oranla moleküler ve kromozomal hasarlar daha fazla görülmektedir (Bozzone, 2007).

Uzun süreli ve çok miktarda alkol kullanımı ağız, yutak, gırtlak ve yemek borusu kanseri riskini artışa neden olmaktadır. Alkol ile birlikte sigara kullanımı ise bu etkiyi daha da fazla arttırmaktadır. Kötü beslenme de kansere neden olan faktörler arasında bulunmaktadır. Örneğin aşırı kilolu insanlarda meme, yumurtalık, prostat, rektum ve kolon gibi bazı kanser türlerinin daha sık ortaya çıktığı belirlenmiştir. Yağ dokusunun obezlerde aşırı artması ve buna bağlı olarak özellikle kadınlarda östrojen metabolitlerinin ortamdan gerektiği gibi uzaklaştırılmaması bu sonuçların ortaya çıkmasında etkilidir. Günlük egzersiz yetersizliğinin ve ergenlik dönemindeki yüksek vücut kütle indeksinin (VKI) ilerleyen yaşlarda meme ve prostat kanserlerinden ölüm riskini arttırdığı tespit edilmiştir (Okasha vd., 2002).

Başlıca enerji kaynağımız olan karbonhidratların dengesiz tüketimi kanser riskini arttırmaktadır. Açlık hiperglisemisinin veya diyabetin en fazla pankreası etkilediği ve bunun sonucunda da karaciğer, safra yolları, serviks, kolon ve rektum kanserlerine sebebiyet verdiği ortaya çıkmıştır. Glikoz, fruktoz ve rafine karbonhidratlar bakımından zengin yiyeceklerin fazla tüketimi sonucunda diyetdeki glisemik yükün artması ile kadınlarda kolon ve rektum; erkeklerde ise pankreas kanseri riskinin arttığı tespit edilmiştir. Diyet posasının su tutumunu, dışkı hacmini ve yabancı madde atımını arttırdığı, bağırsak mikroorganizma yapısını değiştirdiği, dışkının bağırsaktan geçiş zamanını azalttığı ve dışkıyı sulandırarak kısa zincirli yağ asitlerini oluşturduğu bilinmekte olup bu etkilerinin koruyucu olduğu düşünülmektedir (Aksoy, 1984; Byers vd., 2002; Michaud vd., 2005).

Doymuş yağ asitleri bakımından zengin olan yağ tüketiminin kolon, rektum, böbrek, pankreas kanserleri ile postmenapozal kadınlarda meme ve endometrium gibi bazı kanser risklerini arttırdığı belirlenmiştir. Zeytin yağını fazla tüketen ülkelerde ise meme kanseri insidansının düşük olduğu görülmüştür. Yağlar; membran yapısı, immün sistem, sinir sistemi ve beyin işlevi için çok önemli olduğundan dolayı dengeli alınmalıdırlar. Fazla yağ tüketimi erkek ve kadın cinsiyet hormonlarını etkileyerek kanseri tetikleyebilmektedir (Aksoy, 1984, 2005).

Protein açısından zengin yiyeceklerin tüketimi ile pankreas ve böbrek kanseri riski arasında ilişki olduğu görülmüştür. Vitaminlerin ise hastalıklardan koruyucu etkisi olduğu

bilinmektedir. Örneğin, A vitamini ve türevlerinin bazı tümörlerin büyümesini yavaşlattığı; C vitamininin immün sistem ve bağ dokusundaki işlevlerinden dolayı kişinin direncini arttırdığı; E ve C vitaminlerinin birlikte alınmasının ise karsinogenik hastalık riskini %30 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Bjelakovic vd., 2004; Tuncer, 2007).

Besin olarak kullanmadığımız ancak besin gibi yararları olan maddelerden biri de fitokimyasallardır. Fitokimyasalların detoksifikasyonda yer alan enzimleri aktive etmek, immün sistemi uyarmak, oksidan radikalleri tutmak, apoptozis ile ilgili gen ekspresyonunda yer almak ve hormon metabolizmasını düzenlemek gibi işlevleri vardır. Fitokimyasallar çiğ meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır ve bunları bol miktarda tüketen insanlarda akciğer, mide, özefagus, pankreas, kolon ve rektum kanserlerine daha az rastlanıldığı belirlenmiştir (Beliveau ve Gingras, 2004; Tuncer 2007).

2000 yılında Amerika'da 1250000 civarında yeni kanser vakası saptanmış ve tüm kanserlerin yaklaşık %80'inin 55 yaş ve üzerinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Tümörlerin %50'si de 65 yaş üzerindeki kişilerde oluşmuştur ve bu popülasyon tüm nüfusun %15'ini meydana getirmektedir. Yaşlı bireylerde kanser insidansının artışı iki şekilde açıklanabilmektedir. Bunlardan birincisi, yaşlanma ile oluşan moleküler değişikliklerin ve bağışıklık sistemindeki yetersizliklerin yaşlı dokuların karsinojenlere karşı olan duyarlılığını arttırmasıdır. İkincisi ise, karsinogenez çok uzun bir süreç olduğu için kanserin de ileriki yaşlarda ortaya çıkmasının son derece doğal olmasıdır (Özmen, 2005).

6. PROTEİN YIKIM MEKANİZMALARI

Proteoliz ismi de verilen protein yıkımı, hücre içindeki veya dışındaki proteazlar tarafından proteinlerin kısmen veya tamamen yıkılmasıdır. Biyolojik moleküller devamlı sentezlendikleri gibi yıkıma da uğramaktadırlar. Hücre içindeki protein yıkım mekanizmalarının bazı görevleri şunlardır:

1. Proteinlerin besin yetersizliği durumunda aminoasit ve enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağlamaktadırlar.
2. Transkripsiyonel veya translasyonel hatalardan kaynaklanan işlevsiz veya hasarlı proteinleri uzaklaştırırlar.
3. Normal şartlar altında önemli bazı metabolik kontrol noktalarında görev alan enzimlerin yıkılarak değişen çevre şartlarına ve metabolik ihtiyaçlara göre aktiviteleri düzenlerler.

RNA ve protein hücrede denge sağlamak için sürekli sentezlenirken ayrıca nükleotidlere ve aminoasitlere kadar parçalanırlar. Bu moleküllerin yapı taşlarına ayrılması, yıkımı kontrol eden biyokimyasal mekanizmaların varlığının bir kanıtıdır. Hiçbir protein uygun mRNA, tRNA, ribozomlar ve diğer bütün önemli faktörler olmadan sentezlenememektedir. Tek bir aminoasit dahi eksik olsa protein sentezi durmaktadır. Hasarlı bir polipeptit ribozomlardan salındığında, daha sonra yıkılarak yok edilmektedir. Bir proteinin yıkım hızı radyoaktif yaklaşım (pulse-chase yaklaşımı) veya Western blot yöntemi ile belirlenebilmektedir. Radyoaktif aminoasitlerin kaybolması protein yıkımından kaynaklanmaktadır. Western blot yönteminde ise protein sentezi sikloheksamid ile durdurulduktan sonra proteinin hücredeki azalması antikorlar yardımıyla belirlelebilmektedir (Schimke, 1976; Doherty ve Mayer, 1992; Voet ve Voet, 1995; Yerlikaya ve Stanley, 2004; Yerlikaya ve Dokudur, 2009).

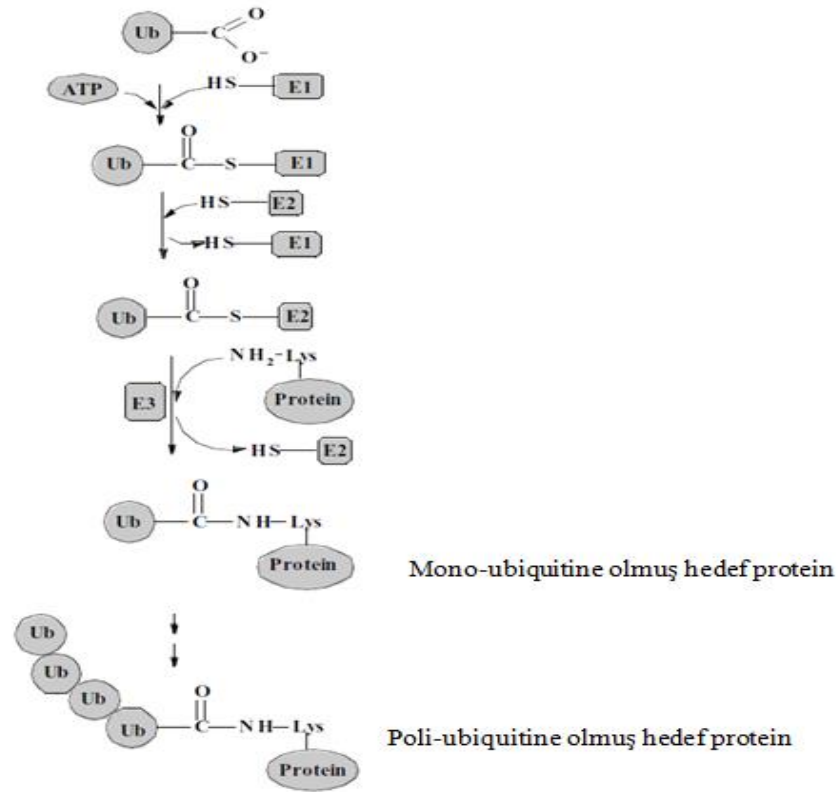
Meprinler, kaspazlar, ATP bağımlı proteozom, katepsinler ve serin proteazlar protein yıkımında hücre içinde ve dışında işlev gören bazı proteazlardır. Anormal ve hasarlı proteinlerin hücre içinde birikmesini engellemek ve aminoasitlerin geri dönüşümünü sağlamak için proteinlerin devamlı olarak yıkılması gerekmektedir. Çeşitli proteinlerin yarı ömürleri yarım dakika, birkaç saat hatta birkaç yıl arasında değişiklik gösterebilmektedir. Sentez esnasında yanlış aminoasidin eklenmesinden dolayı hasarlı (normal üç boyutlu yapısını alamamış) bir yapıya sahip olan veya normal işlevi esnasında bozulan proteinler hızlı bir şekilde yıkılan proteinlerdendir (Voet ve Voet, 1995; Yerlikaya, 2004). Genellikle proteinlerin yarı ömürleri ile N ucunda bulunan aminoasit arasında bir korelasyon bulunmaktadır ve bu olay N-end kuralı olarak isimlendirilmektedir. Örneğin; N-ucunda serin, metionin, treonin, alanin, glisin ve valin

aminoasitleri bulunan proteinlerin yarı ömürleri 20 saatten daha fazladır. N-ucunda lösün, fenil alanin, lizin, arginin ve aspartik asit bulunan aminoasitler ise 3 dakika veya daha az kısa ömre sahip olan proteinlerdir (Varshavsky, 1996). Yapılarında PEST sekansı (prolin, glutamik asit, serin ve treonin) bulunduran proteinler diğer proteinlere göre daha hızlı yıkılmaktadırlar. Hasarlı proteinler hem bakteriler hem de ökaryotik hücrelerde sitozolik ATP-bağımlı sistemler tarafından yıkılan kısa ömre sahip proteinlerdendir (Rogers ve Rechsteiner, 1986; Rechsteiner ve Rogers, 1996; Yerlikaya, 2007).

Hücre içindeki bulunan proteinlerin %80'inden daha fazlasının yıkımı ubiquitin-proteozom yolu tarafından gerçekleştirilmektedir. Ubiquitin-proteozom yolunda hedef protein yıkılmadan önce Ubiquitin (Ub) denilen 76 amino asitlik bir protein tarafından işaretlenmektedir. Ubiquitin ile işaretleme işleminde E1 (ubiquitin aktive edici enzim), E2 (ubiquitin konjuge edici enzim) ve E3 (ubiquitin ligaz) olmak üzere üç farklı enzim görev yapmaktadır. Hedef protein üzerinde genellikle en az dört ubiquitinden oluşan bir poli-ubiquitin zinciri oluşmakta ve daha sonra 26S proteozom tarafından hedef protein 8-25 amino asite kadar yıkılmaktadır (Şekil 6.1) (Yerlikaya ve Yöntem, 2013).

Proteinlerin yıkımında rol oynadığı bilinen bir takım hücre içi sinyalleri şunlardır:

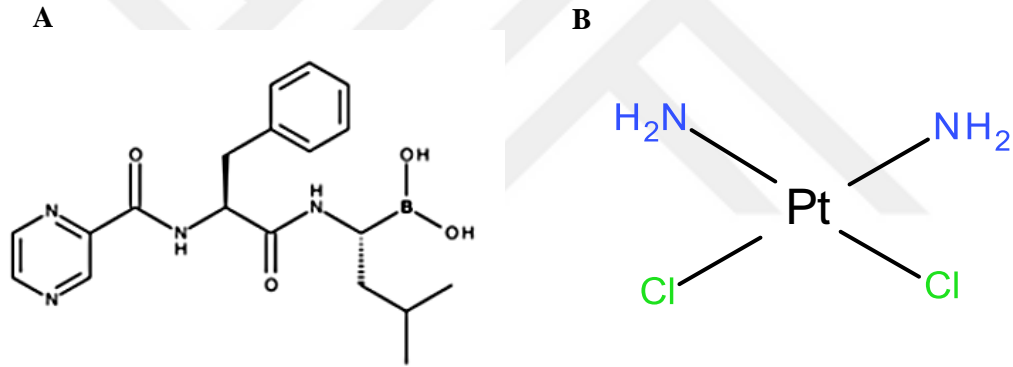
1. Yapısında PEST sekansı bulunan proteinlerin yıkımı daha hızlı gerçekleşmektedir.
2. Moleküler ağırlık arttığında proteinlerin yıkım hızı artmaktadır.
3. Yüzey polaritesi arttıkça yıkım hızı artmaktadır.
4. Proteinin izoelektrik noktası azaldığında yıkım hızı artmaktadır.
5. Hidrofobisite artışı yıkım hızını arttırmaktadır.
6. Fosforilasyon arttığında genellikle protein yıkım hızı azalmaktadır.
7. Termal stabilite azaldığında yıkım hızı artmaktadır.
8. Protein yıkımı için ubiquitin sentezinin artışı bir işaret teşkil etmektedir.
9. Oksidasyon tarafından meydana getirilen inaktivasyon işlemi yıkım için proteini işaretlemektedir.
10. Antizyme proteininin ornitin dekarboksilazı yıkıma sevkettiği gibi bazı yardımcı proteinler, proteinleri yıkıma sevk etmektedirler (Okur, 2010).



Şekil 6.1. Hedef bir protein üzerinde ubiquitinasyon mekanizması (Yerlikaya vd., 2013'den uyarlanmıştır).

7. TEZİN AMACI

Bu tez çalışmasının amacı, yeni bir kombine tedavi geliştirmek için 26S proteozom inhibitörü bortezomib ile kemoterapide kullanılan cisplatinin tek tek ve kombine bir şekilde 4T1 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. 26S proteozomun kimotripsin-benzeri aktivitesini geri dönüşümlü olarak bloke eden bir inhibitör olan bortezomib klinikte ilk olarak denenen ve FDA tarafından multiple miyeloma tedavisi için onaylanan önemli bir proteozom inhibitörüdür (Yerlikaya ve Yöntem, 2013). Cis-diamminedichloroplatinum olarak da bilinen cisplatin ise elli yıldan beri kanser tedavisinde kullanılan ve platinyum içeren bir bileşiktir. Cisplatin DNA'da adenin ve guanin purin bazlarına bağlanarak hasar oluşturmakta ve apoptozisi uyarmaktadır (Agarwal, 1998). Şekil 7.1'de bortezomib ve cisplatinin yapıları kimyasal yapıları verilmiştir.



Şekil 7.1. Bortezomib (A) ve cisplatinin (B) kimyasal yapıları. Bortezomibin kimyasal yapısı Yerlikaya vd., 2013'den alınmıştır. Cisplatinin kimyasal yapısı ise Symyx Draw 4.0 ile çizilmiştir.

8. MATERYAL VE METOT

8.1. Materyal

4T1 meme kanseri hücreleri, Prof. Dr. Nuray Erin (Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Antalya) tarafından gönderilmiştir. RPMI-1640 besiyeri, steril 2 ml ve 10 ml pipetler, 25 cm² flasklar, steril petri dishler, fetal bovine serum (FBS), tripsin, Penicillin/Streptomisin, MG132, SDS-PAGE jel elektroforez için kullanılan kimyasallar ve MTT Sigma-Aldrich Inc.'dan satın alınmıştır. Stericup™ sterile vacuum filtre ünitesi Millipore firmasında alınmıştır. Caspase-3 Colorimetric Activity Assay Kit Chemicon firmasından temin edilmiştir.

8.2. Hücre Kültürü İçin Besiyeri Hazırlanışı

1X RPMI-1640 + %10 FBS (1L) Hazırlanışı:

Dokudur, 2009'da anlatıldığı gibi 1X RPMI-1640 besiyeri hazırlanmıştır. Kısaca, 10,4 gr toz haldeki RPMI-1640 besiyeri, 850 ml otoklavlanmış dH₂O içerisinde çözünür. 1N HCl ile pH 4'e ayarlanarak besiyerinin tamamen çözünmesi sağlanır. Daha sonra içerisine 20 ml NaHCO₃ (stok solüsyon %7,5); 22,5 ml glukoz (%20'lik stok solüsyon); 4 ml HEPES solüsyonu (stok solüsyon 2,5M) ve 1 ml sodyum pirüvat solüsyonu (stok solüsyon 1M) ilave edilir ve 1N NaOH ile pH 7,1'e ayarlanır. Sonra 10 ml Penicillin/Streptomisin antibiyotik karışımı eklenir ve besiyeri hacmi otoklavlanmış dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır. 1 L kapasiteli Disposable Millipore filtrasyon sistemi (0,22 µm por kapasiteli membran) kullanılarak Laminer Flow kabini içinde filtre işlemi gerçekleştirilir. Filtre edilen besiyerinin %90'ının (900 ml) üzerine %10 (100 ml) oranında FBS ilave edilir. Hazırlanan Besiyeri 1X RPMI-1640 +4°C'de muhafaza edilir ve kullanılmadan önce 37°C'de yaklaşık 10 dk süreyle ısıtılır (Dokudur, 2009).

2X RPMI-1640 + %20 FBS (250 ml) Hazırlanışı:

5,2 gr toz halindeki RPMI-1640 besiyeri, 200 ml otoklavlanmış dH₂O'da çözünür. Daha sonra pH 4'e 1N HCl ile ayarlanarak tamamen çözünmesi sağlanır. Bu aşamadan sonra 10 ml NaHCO₃ (stok solüsyon %7,5); 11,25 ml glukoz (%20'lik stok solüsyon); 2 ml HEPES solüsyonu (stok solüsyon 2,5M) ve 0,5 ml sodyum pirüvat solüsyonu (stok solüsyon 1M) ilave edildikten sonra 1N NaOH ile pH 7.1'e ayarlanır. 5 ml Penicillin/Streptomisin antibiyotik karışımı eklenir ve besiyeri hacmi otoklavlanmış dH₂O ile 250 ml'ye tamamlanır. Disposable Millipore filtrasyon sistemi ile filtre edilir. Filtre edilen besiyerinin 200 ml'sinin üzerine 50 ml FBS eklenir. Besiyeri +4°C'de muhafaza edilir ve kullanılacağı zaman 10 dk 37°C'de ısıtılır (Yerlikaya vd., 2013).

8.3. Hücre Kültürü Pasajı

4T1 meme kanseri hücreleri 1X RPMI-1640 besiyeri içerisinde, HF90 inkübatöründe 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarında çoğaltıldılar. 25 cm² steril corning flasklarda stok kültürler; 35 mm x 10 mm steril petri kaplarında ise deney kültürleri çoğaltıldı. Hücreler logaritmik faza geldiklerinde (70-80 yoğunlukta) mikrobiyolojik güvenlik kabini içerisinde hücre pasajı yapıldı. Flask içerisindeki eski besiyeri aspire edildikten sonra 4T1 hücreleri 1 ml PBS ile yıkandılar ve sonrasında 2 ml %0,25'lik tripsin ile 4T1 hücreleri yaklaşık 2 dakika muamele edildiler. Tripsin muamelesi sırasında hücrelerin kalkıp-kalkmadığını görmek için Motic marka inverted mikroskopta hücreler gözlemlendi. Süre sonunda tripsin vakum pompasına bağlı pastör pipet ile aspire edildi. Daha sonra hücreler 1/10 oranında yeni besiyeri ile seyreltilerek yeni flaska ekildiler. Ekilen hücrelerin çoğalıp logaritmik faza gelmesi yaklaşık olarak 3 günde bir gerçekleştiği için, hücre pasaj işlemi periyodik olarak 3 günde bir gerçekleştirildi (Yerlikaya ve Erin, 2008; Okur, 2010).

8.4. Hücre Ekimi

4T1 hücreleri (besiyeri ile 1/10 oranında seyreltilmiş) hemositometrede (thoma lamında) inverted mikroskop altında sayıldı. 0,1 mm³'deki (0,1 µl) hücre sayısı belirlendi ve mililitredeki sayıyı bulmak için 10000 ile çarpıldı. 35 mm x 10 mm'lik bir petride 100000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı (Yerlikaya ve Erin, 2008; Okur, 2010).

8.5. MTT Testi

4T1 meme kanseri hücreleri 35 mm x 10 mm steril kapların içerisinde 37°C ve %5 CO₂ sağlayan HF90 inkübatör içerisinde logaritmik faza gelinceye kadar inkübe edildi. Daha sonra hücreler bortezomib ve cisplatinin farklı konsantrasyonları veya onların kombinasyonları ile 24 saat boyunca muamele edildiler. Süre sonunda besiyerleri 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve 2700 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildiler. Bu esnada her bir petriye 1,5 ml MTT'li besiyeri ilave edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatantlar atıldı, petriden alınan yaklaşık 200 µl MTT'li besiyeri kullanılarak 15 ml'lik tüpteki pelet (çöken hücreler) kaldırılıp çözüldü, ilgili petriye aktratıldı ve petri hafifçe karıştırıldı. Tüm petriler taşıma kabına konuldu, karıştırıldı, etrafları alüminyum folyo ile ışık geçirmeyecek şekilde tamamen kaplandı ve inkübatörde 4 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonrasında petrilerdeki besiyerleri yeni 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve 2700 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu sırada her bir petriye 200 µl %3 SDS ve 1 ml 40 mM HCl/izopropanol ilave edildi ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 15 dk süreyle inkübe edildi. Santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve petriden yaklaşık 200 µl

alınıp 15 ml'lik tüpteki pelletler kaldırılıp çözüldü ve ilgili petriye aktarıldı (bu işlem 15 dk inkübasyon esnasında yapıldı). Bu süre sonrasında 45°'lik açıyla tutulan petri içerisinde pipetleme ile homojenizasyon gerçekleştirilerek örnekler ependorf tüplerine aktarıldı. Ependorf tüpler 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi (sıvının tamamen homojen olup, varsa tortuların dibine çökmesi için santrifüj edilir). Bu işlem sonrasında süpernatant atılmaz, tamamı saklanır, kullanılırken homojen kısımdan kullanıldı. Elde edilen tüm sıvı içerisinde MTT olduğu için çabuk bozulmaktadır ve uzun süreli saklamaya uygun değildir. Dolayısıyla örnekler hemen spektrofotometrede okundu. Spektrofotometre ölçümünde kullanılacak numuneler için yeni ependorflar işaretlendi. Santrifüjden sonra ependorfların süpernatantından 100 µl homojenat alınarak 900 µl HCl/izopropanol/SDS karışımı (%3 SDS + 40 mM HCl/izopropanol) ile seyreltildi (1/10 seyreltme) ve tüpler karıştırıldı. Hazırlanan örnekler spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okundu (Yerlikaya ve Erin, 2008; Çavga, 2013).

8.6. Koloni Oluşumu İçin Yumuşak Agar Testi

60 x 15 mm steril petri kaplarına eşit miktarda (100000) 4T1 meme kanseri hücresi ekildi ve logaritmik faza gelinceye kadar hücreler inkübe edildi. Daha sonra hücreler 10 nM bortezomib, 1 µM cisplatin veya 10 nM bortezomib + 1 µM cisplatin kombinasyonu ile 24 saat süreyle muamele edildiler. 30 x 15 mm'lik steril petri kapları %0,5 agar + 1X RPMI-1640 + %10 FBS (base agar) ile kaplandı ve katılaşmaları beklenildi. İlaç muamelesi sonrasında hücreler kaldırıldı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. Her bir muamele için 5000 hücre içeren 0,75 ml 2X RPMI-1640 + %20 FBS besiyeri bir tüp içerisinde 0,75 ml %0,7 agaroz ile karıştırıldı (top agar). Hazırlanan her bir ilgili muameleye ait top agar 30 x 15 mm'lik petriyerdeki base agarın üzerine ilave edildi ve katılaşması sağlandı. Daha sonra petriyerler üç hafta boyunca 37°C ve %5 CO₂ sağlayan inkübatör içerisinde inkübe edildi ve bu süre içerisinde üç günde bir besiyerleri değiştirildi. Süre sonunda petriyerler %10 ethanol içerisinde hazırlanmış %0,1'lik kristal viyole (0,5 ml) ile 1 saat süreyle boyandılar. Boyama sonrasında, petriyerlerdeki koloniler sayım için belirgin hale gelinceye kadar PBS ile iyice yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında her bir muameleye ait kolonilerin fotoğrafları çekildi (Yerlikaya vd., 2013).

8.7. Kaspaz-3 Aktivite Deneyi

Steril petri kaplarına (35 x 10 mm) eşit sayıda hücre (100000) ekildikten sonra hücreler logaritmik faza geldiklerinde bortezomib, cisplatin veya bortezomib + cisplatin kombinasyonu ile muamele edildiler. İlaç muamelesinden sonra hücreler 1 ml PBS ile yıkandılar. Hücrelerin üzerine BD Pharmingen fluorometric caspase-3 assay kitine ait hücre lizis solüsyonu ile

hücreler lizis edildiler. Elde edilen homogenat 12000 rpm'de 5 dk +4°C'de santrifüj edildi ve kullanılıncaya kadar supernatant -80°C'ye kaldırıldı. Eşit miktarda protein ile kaspaz-3 aktivitesi ölçebilmek için "Bio-Rad Protein Assay" metodu ile protein tayini yapıldı. Kaspaz-3 aktivitesinin ölçülmesi BD Pharmingen firmasının protokolüne göre gerçekleştirildi. Örnekler, tampon solüsyon ve kaspaz-3 substratı (Ac-DEVD-AMC) belirtilen uygun oranlarda karıştırıldı ve tüpler 37°C %5 CO₂ ortam sağlayan inkübatörde 2 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda SmartSpec Versaflour florometre kullanılarak 380 nm eksitasyon ve 460 nm emisyonunda ölçüldüler (Yerlikaya vd., 2012; Çavga, 2013).

8.8. Protein Tayini

Protein miktarları Bio-Rad Protein Assay ile belirlendi. Bio-Rad boyası 1/5 oranında seyreltildi (40 µl boya + 160 ml dH₂O). Hazırlanan boya filtre kağıdıyla filtre edildi. 1 µg/µl'lik 140 µl bovine serum albumin (BSA) hazırlandı. Kör, standartlar ve numuneler Çizelge 8.1.'e göre hazırlandı. Hazırlanan örnekler 5 dakika boyunca oda ısısında bekletildi. Daha sonra UV spektrofotometrede standartların OD₅₉₅ körüne karşı ölçümü gerçekleştirildi. Örneklerin protein miktarları için de aynı şekilde absorbans değerleri ölçüldü (Bradford, 1976; Okur, 2010).

Çizelge 8.1. Bradford Macro-Assay metodunda kullanılan numunelerinin hazırlanışı.

Tüp	dH ₂ O (µl)	Protein (µl)	Bio-Rad Boyası (ml)
1 (Kör)	800	—	2,5
2 (Std 1)	799	1	2,5
3 (Std 5)	795	5	2,5
4 (Std 10)	790	10	2,5
5 (Std 20)	780	20	2,5
6 (Std 40)	760	40	2,5
7 (Numune)	795	5	2,5

8.9. İstatistik Analizler

İstatistik analizler, GraphPad Prism 3.03 programı kullanılarak yapılmıştır. Deney sonuçları ortalama \pm SEM şeklinde sunuldu. Deneylerin istatistik analizleri one-way ANOVA metodu kullanılarak Bonferroni veya Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testleri ile belirlendi. $p < 0,05$ değerler önemli kabul edildi (Yerlikaya ve Dokudur, 2010).

8.10. Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar

PBS; dH₂O içerisinde 4 gr sodyum klorür; 0,1 gr potasyum klorür; 0,72 gr sodyum fosfat ve 0,12 gr potasyum fosfat çözünür. 1 M HCl kullanılarak pH 7,4'e ayarlanır. Solüsyonun son hacmi 500 ml olacak şekilde dH₂O ile ayarlanıp otoklavlanır. + 4 °C'de muhafaza edilir.

1 X tripsin; 5 ml 10 X tripsin + 45 ml PBS.

MTT; 250 µl FBS; 49,750 ml RPMI-1640 besiyeri içerisine ilave edilir. RPMI-1640 + %0,5 FBS besiyeri içerisine 0,025 gr MTT konulur ve çözünmesi için iyive karıştırılır.

%3 SDS; 1,5 gr SDS son hacim 50 ml olacak şekilde dH₂O içerisinde çözülür.

40 mM HCl/izopropanol; 2 ml 1 M stok HCl + üzerine 48 ml izopropanol.

%0,1 Kristal viyole; 0,05 gr toz kristal viole 5 ml ethanol ile çözünür ve daha sonra üzeri son hacim 50 ml olacak şekilde dH₂O ile tamamlanır (Okur, 2010; Çavga, 2013).

8.11. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

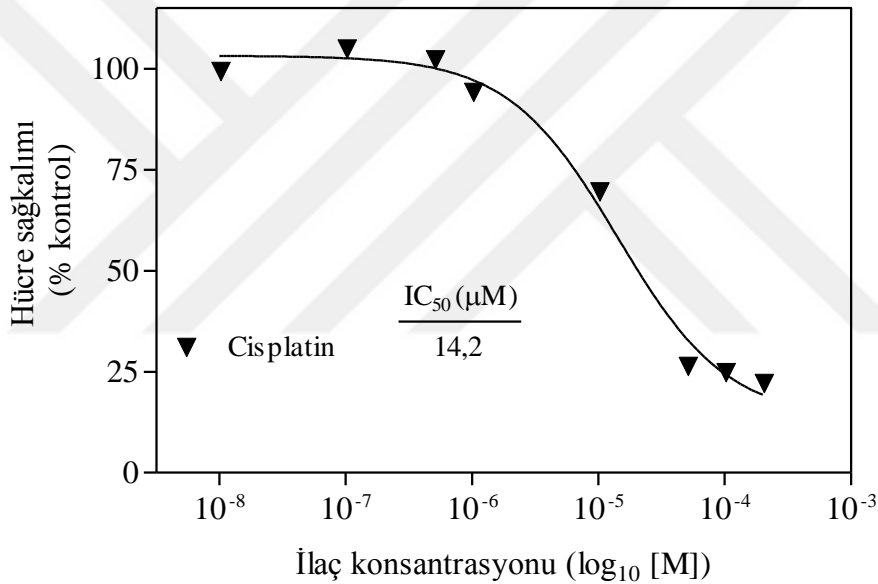
- Mikrobiyolojik (Lamin Air Flow) güvenlik kabini.
- Motic marka inverted (ters) mikroskop.
- Motic marka mikroskop kamerası.
- HF 90 marka karbondioksit (CO₂) inkübatörü.
- BIO-RAD marka Smart SpecPlus model spektrofotometre.
- IKA marka RCT basic model ısıtıcılı manyetik karıştırıcı.
- Jenco marka pH metre.
- GFL marka 2001/4 model saf su cihazı.
- Wisd marka çalkalayıcı.

- Wisd marka çalkalamalı su banyosu.
- ALP marka otoklav cihazı.
- Hettich marka santrifüj.



9. SONUÇLAR

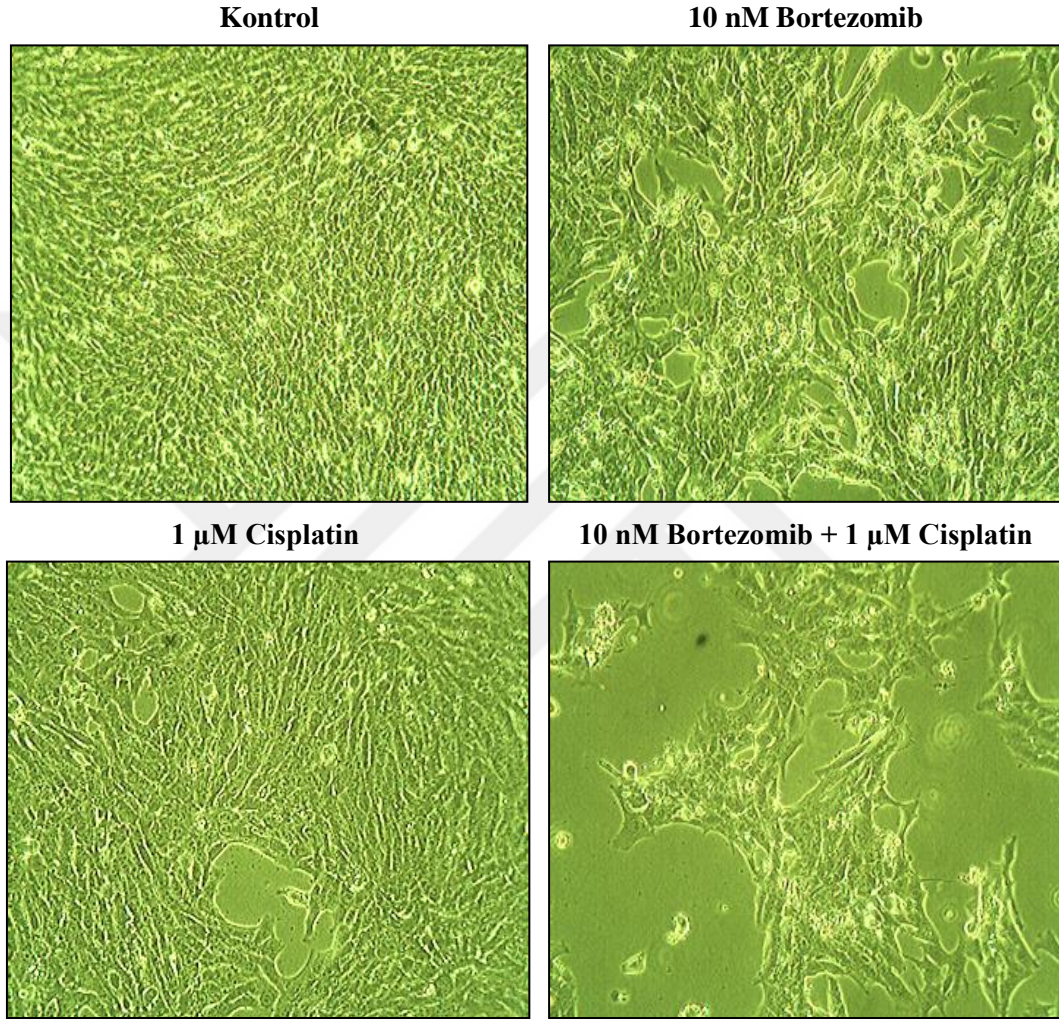
Bu tez çalışmamızın amacı, proteozom inhibitörü bortezomib ve kemoterapötik ajan cisplatinin 4T1 meme kanseri hücrelerindeki etkilerini incelemektir. Cisplatinin 4T1 hücrelerindeki IC_{50} değerini ve sağkalımı hesaplamak için, farklı konsantrasyonlardaki cisplatin ($0,01 \mu\text{M}$; $0,1 \mu\text{M}$; $0,5 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$; $50 \mu\text{M}$; $100 \mu\text{M}$ veya $200 \mu\text{M}$) ile hücreler 24 saat muamele edilerek MTT testi yapıldı. MTT testi ile elde edilen sonuçların GraphPad Prism 3.03 programı ile istatistiki analizi yapıldı. İstatistiki analizin sonucuna göre cisplatinin IC_{50} değeri $14,2 \mu\text{M}$ olarak bulundu (Şekil 9.1). Elde ettiğimiz bu sonuç bize cisplatinin 4T1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 9.1. Cisplatinin 4T1 hücrelerindeki IC_{50} değeri ve % sağkalım grafiği. Farklı konsantrasyonlardaki cisplatin ile 24 saat süre ile muamele edilen hücrelerin IC_{50} değeri MTT testi ile tespit edildi.

Şekil 9.2’de 10 nM bortezomib, $1 \mu\text{M}$ cisplatin veya 10 nM bortezomib + $1 \mu\text{M}$ cisplatin kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 4T1 hücrelerinin morfolojileri inverted mikroskopta $10\times$ ’lik objektif ile incelendiğinde kontrol grubundaki hücrelerin petriyi tamamen doldurduğu ve hücrelerin petri kabının tabanına yapışık olduğu görülmektedir. Bortezomib ve cisplatinin ayrı ayrı muamelelerine bakıldığında hücrelerin kontrol grubuna göre kısmen az olduğu; fakat çok büyük bir fark olmadığı gözlenmiştir. Bortezomib + cisplatin kombinasyonu inverted mikroskopta incelendiğinde ise hücre sayısında önemli miktarda azalma olduğu ve tutunma kaybı meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 9.2). Hücrelerin morfoloji ve sayısında meydana gelen bu değişiklik bize 4T1 meme kanseri hücrelerinin DNA sentezini bloke ederek

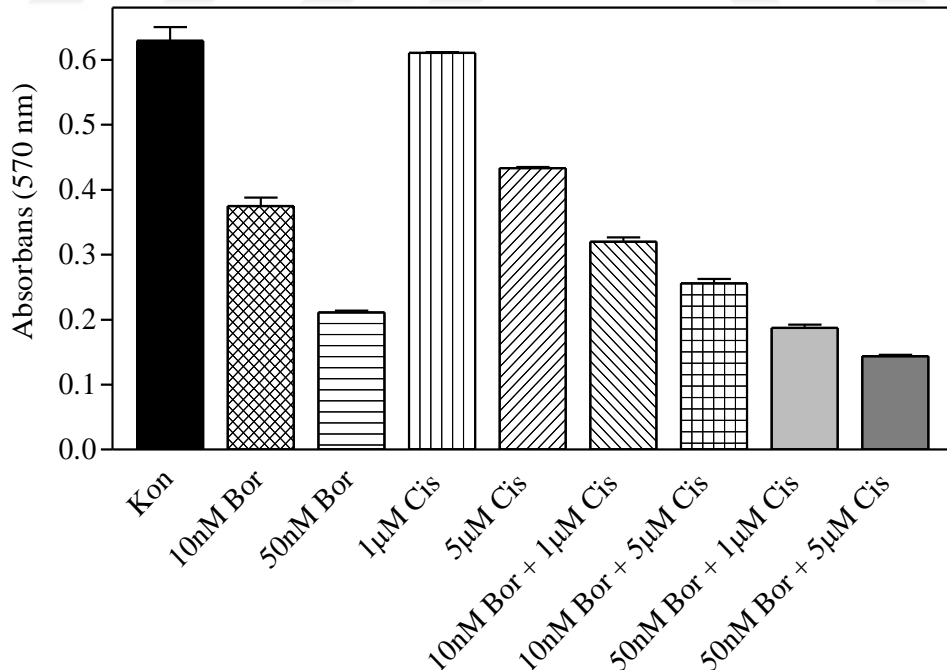
hücre bölünmesini durduran proteozom inhibitörü bortezomib ve cisplatine karşı hassas olduğunu göstermiştir. Bu sonuç bize bortezomib ve cisplatinin birlikte kombinasyonunun 4T1 hücrelerine karşı daha etkili olacağı fikrini vermiştir.



Şekil 9.2. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun 4T1 hücre morfolojisi üzerine etkisi. Hücre morfolojileri Motic marka inverted mikroskop kullanılarak 10X objektif ile incelendi ve kaydedildi.

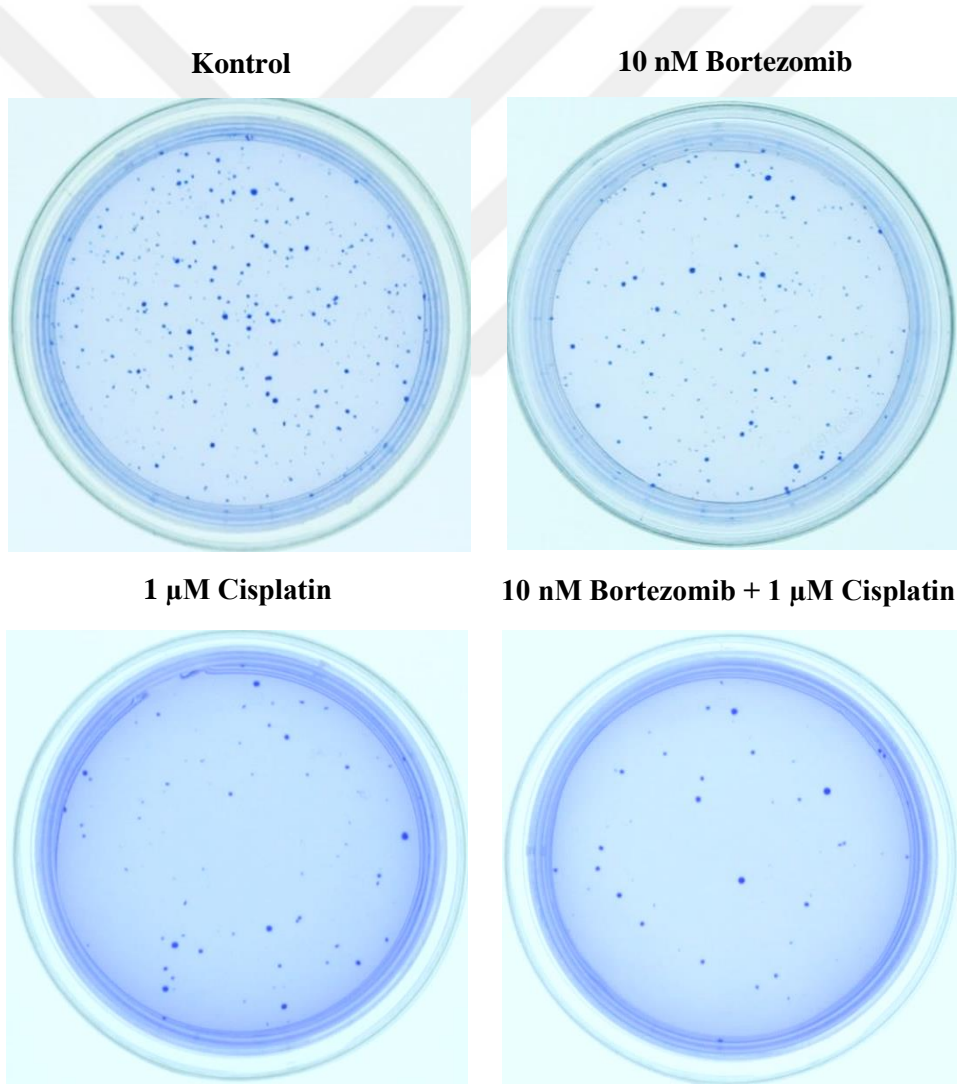
Elde edilen morfoloji sonuçlarını desteklemek ve farklı ilaç konsantrasyonlarının 4T1 hücreleri üzerindeki etkilerini ve % sağkalım oranlarını analiz etmek için 35 x 10 mm!lik petrielerde logaritmik faza gelene kadar çoğaltılan 4T1 hücreleri 10 nM bortezomib, 50 nM bortezomib, 1 μ M cisplatin, 5 μ M cisplatin veya bunların kombinasyonları ile 24 saat süreyle muamele edildiler. Daha sonra MTT testi gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 3.03 programı ile istatistiki olarak değerlendirildi. Şekil 9.3’de görüldüğü üzere, kontrole göre 10 nM bortezomib hücre sayısında %44’lük ($p < 0,001$); 50 nM bortezomib ise %66’lık (p

< 0,001) bir azalma meydana getirmiştir. 1 μ M cisplatinin kontrole göre etkili olmadığı ($p > 0,05$); fakat 5 μ M cisplatinin kontrole göre istatistiki olarak anlamlı sonuç verdiği tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlar bize bortezomibin 4T1 hücrelerinde daha sitotoksik bir ajan olduğunu göstermektedir. 10 nM bortezomib + 1 μ M cisplatin kombinasyonu kontrole göre ve tek tek ilaç muameleleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespi edilmiştir (kontrole göre ve 1 μ M cisplatine göre $p < 0,001$; 10 nM bortezomibe göre $p < 0,05$). 10 nM bortezomib + 5 μ M cisplatin kombinasyonunun ise daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür (kontrole, 10 nM bortezomibe ve 5 μ M cisplatine göre $p < 0,001$). 50 nM bortezomib + 1 μ M cisplatin kombinasyonu, kontrole göre ve tek başına uygulanan 1 μ M cisplatine göre anlamlı sonuç verirken ($p < 0,001$); monoterapi olarak uygulanan 50 nM bortezomib ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark vermemiştir ($p > 0,05$). Kontrole, monoterapilere ve kombinasyon tedavilerine göre istatistiki olarak en etkili ve anlamlı sonucu ise 50 nM bortezomib + 5 μ M cisplatin kombinasyonu vermiştir. Bununla birlikte 50 nM bortezomib + 5 μ M cisplatin kombinasyonu, 50 nM bortezomib + 1 μ M cisplatin kombinasyonuna göre daha etkili olmasına rağmen istatistiki açıdan aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 9.3).



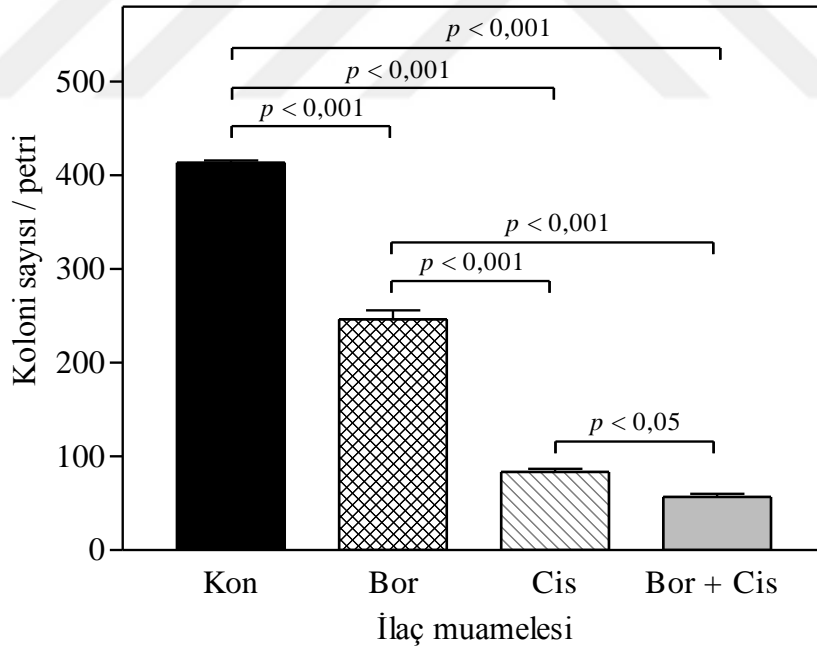
Şekil 9.3. Farklı konsantrasyonlardaki bortezomib ve cisplatin kombinasyonlarının 4T1 hücrelerindeki sitotoksik etkisi. 4T1 hücreleri 10 nM bortezomib, 50 nM bortezomib, 1 μ M cisplatin, 5 μ M cisplatin veya kombinasyonları ile 24 saat muamele edildikten sonra MTT testi gerçekleştirildi ve GraphPad Prism 3.03 programı kullanılarak istatistiki analiz gerçekleştirildi. Kon, kontrol; Bor, bortezomib; Cis, cisplatin.

MTT testi sonuçlarını doğrulamak ve bu sonucu daha iyi anlayıp net fikir yürütmek için bortezomib, cisplatin ve kombinasyonlarının 4T1 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki etkilerini belirlemek için yumuşak agar testi yapılmaya karar verildi. Bu deney için 4T1 hücreleri 10 nM bortezomib, 1 μ M cisplatin veya 10 nM bortezomib + 1 μ M cisplatin kombinasyonu ile 24 saat süreyle muamele edildi. Daha sonra Materyal ve Metot kısmında anlatıldığı şekilde yumuşak agar testi gerçekleştirildi, koloniler kristal viyole ile boyandı ve fotoğrafları çekildi. Elde edilen koloni görüntüleri incelendiğinde, bortezomib ve cisplatin monoterapilerinin kontrole göre koloni oluşumunu azalttığı görülmektedir. Bunun yanında bortezomib + cisplatin kombinasyonunun monoterapilere göre daha da etkili olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 9.4).



Şekil 9.4. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun 4T1 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin yumuşak agar testi ile görüntülenmesi. Üç haftalık ilaç muamelesi sonrasında 4T1 hücreleri kristal viyole ile boyandı ve koloniler görüntülendiler.

Daha sonra her bir muameleye ait kolonlerin sayımı gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların GraphPad Prism 3.03 programı kullanılarak istatistiki analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 9.5'te görüldüğü üzere koloni analiz sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna göre 10 nM bortezomib muamelesinin istatistiki açıdan anlamlı bir etki meydana getirdiği görülmektedir ($p < 0,001$). 1 μM cisplatin muamelesi ise beklediğimiz aksine yumuşak agar deneyinde bortezomibe göre çok daha büyük bir sitotoksik etkiye yol açmıştır (kontrolle göre $p < 0,001$; 10 nM bortezomibe göre $p < 0,001$). 10 nM bortezomib + 1 μM cisplatin kombinasyonunda koloni sayısında 10 nM bortezomib monoterapisine göre istatistiki olarak son derece önemli bir azalma meydana gelirken ($p < 0,001$); 1 μM cisplatin monoterapisine göre ise nispeten daha az etkili olmakla birlikte istatistiki açıdan anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu sonuçlar bize cisplatinin bortezomibin etkisini güçlendirdiğini göstermektedir. Cisplatinin bu deneyde aşırı etkili olmasının muhtemel sebebi ise yumuşak agar deneyinde muhtemelen geri dönüşümsüz etki mekanizmasından dolayı aşırı toksik etki meydana getirmesinden dolayı olabilir.

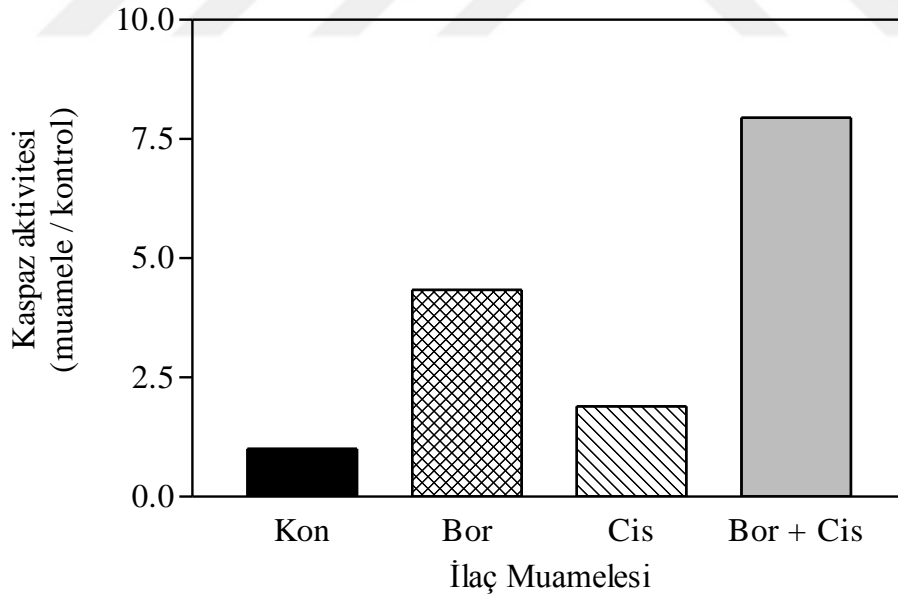


Şekil 9.5. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun etkisinin koloni assay ile belirlenmesi. Her bir petrideki koloni sayısı belirlendi ve GraphPad Prism 3.03 programı yardımıyla istatistiki analizler yapıldı. Kon, kontrol; Bor, 10 nM bortezomib; Cis, 1 μM cisplatin.

Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun sitotoksik etki mekanizmasını aydınlatmak için kaspaz-3 aktivitesi deneyi yapıldı. Kaspaz-3, apoptotik yolda görev alan efektör

kaspazlardan bir tanesidir ve aktivasyonu sonucunda apoptotik kaskat (zincirleme reaksiyon) başlatılmakta ve sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir.

35 x 10 mm steril petri kaplarına 100000 4T1 hücresi ekildikten sonra hücreler logaritmik faza geldiklerinde 10 nM bortezomib, 1 μ M cisplatin veya 10 bortezomib + 1 μ M cisplatin kombinasyonu ile 24 saat muamele edildiler. İlaç muamelesinden sonra Materyal ve Metot kısmında anlatıldığı şekilde hücrelerin lizisi gerçekleştirildi, protein miktar tayini yapıldı, BD Pharmingen kaspaz-3 substratı uygulandı ve sonrasında SmartSpec Versaflour florometre kullanılarak 380 nm eksitasyon ve 460 nm emisyonunda kaspaz-3 aktivitesi ölçüldü. Şekil 9.6'da, 10 nM bortezomib ile yapılan muamele sonucunda kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre 4,3 kat arttığı görülmektedir. 1 μ M cisplatin monoterapisi ise kontrole göre kaspaz-3 aktivitesinde 1,9 kat artışa neden olmuştur. 10 nM bortezomib + 1 μ M cisplatin kombinasyonu ise kontrole göre 7,9 kat artış meydana getirmiştir. Bu sonuçlar bize bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun monoterapilere göre kaspaz-3 aktivitesini önemli bir şekilde arttırdığını ve dolayısıyla apoptozisi daha fazla uyararak 4T1 meme kanseri hücrelerinde hücre ölümünü daha fazla teşvik edebileceğini göstermektedir.



Şekil 9.6. Bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkisi. 10 nM bortezomib, 1 μ M cisplatin veya 10 bortezomib + 1 μ M cisplatin kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerin lizisi yapıldı, protein miktarı belirlendi, BD Pharmingen kaspaz-3 substratı uygulanarak SmartSpec Versaflour florometre üzerinde 380 nm eksitasyon ve 460 nm emisyonunda kaspaz-3 aktivitesi ölçülerek belirlendi. Kon, kontrol; Bor, 10 nM bortezomib; Cis, 1 μ M cisplatin.

10. TARTIŞMA

Hücrelerin kontrolsüz biçimde bölünmeyi sürdürerek çoğalması ve normal doku ve organları sarması hali olan kanser; kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme yol açan hastalıktır. Kanser tarih boyunca canlılarda sık karşılaşılan bir problem olmuştur ve tarihesi M.Ö. 3000 yılına kadar uzanmaktadır. Yüzden fazla türü vardır. Hiçbir canlı DNA'sı birbirine benzemediği için kanser kişisel ve kompleks bir hastalıktır. Bu nedenle aynı tedaviye farklı cevaplar alınması beklenen bir sonuçtur (Baykara, 2016). Endoskopik teşhis için gerekli olan ultrasonografi, fiberoptik cihazlar, anjiyografi ve bilgisayar destekli tomografi tümör teşhisi ve bulunduğu yerin incelenmesi için kullanılan cihazlardan bazılarıdır. Patolog tarafından yapılacak histolojik inceleme teşhis için en kesin sonucu vermektedir. Kanser için en çok kullanılan tedavi yöntemleri ise kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi operasyondur. Kök hücre nakli, hormon tedavileri, aşılar ve gen terapileri gibi yöntemler de kanserin türüne ve hastanın ihtiyacına yönelik olarak tercih edilebilecek yöntemlerdendir (Kırdar, 1979; Baykara, 2016). Bunun dışında da kanser tedavisi için yeni metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, meme kanserinde yeni bir kemoterapik yol geliştirmek için anti-kanserojenik bortezomib ve cisplatin ajanlarının 4T1 meme kanseri hücrelerindeki etkileri incelenmeye karar verilmiştir.

Cisplatin ile ilgili daha önceki çalışmalara bakıldığında MCF-7 hücrelerinde cisplatinin IC_{50} değerinin $43,5 \mu M$ olarak bulunduğu görülmektedir (Basma vd., 2005). Bizim yaptığımız çalışmalarda ise 4T1 hücrelerinde cisplatinin IC_{50} değeri $14,2 \mu M$ olarak tespit edildi. Bu değerler bu çalışmadaki 4T1 meme kanseri hücreleriyle kıyaslanabilir niteliktedir. Daha önceki çalışmalarda 4T1 hücrelerinin, p53-null (p53-yoksun) hücreler olduğunu ortaya konulmuştur (Yerlikaya ve Erin, 2008). Mevcut çalışma verilerimizde ise bu anti-kanser kemoterapotik ajanların, 4T1 hücrelerinde p53-bağımsız bir şekilde hücre ölümünü uyarabileceğini göstermektedir. Yaptığımız çalışmadaki sonuçlar bize bortezomib + cisplatin kombinasyon tedavisinin monoterapilerden daha etkili olduğunu işaret etmektedir. Cisplatin sıklıkla kullanılan anti-kaserojen bir ajan olmasına rağmen elimizdeki veriler, bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun hayvansal tümör modellerinde kullanılan metastatik 4T1 meme kanser hücrelerinde daha önce denenmemiş olduğunu ortaya koymaktadır (Yerlikaya vd., 2013). Ayrıca, bortezomib ve cisplatin kombinasyonunun etkisi diğer kanser hücreleri için de denenmemiştir. Ancak, EMT-6 meme karsinoması ile ilgili Teicher ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bortezomibin ve cisplatinin tümör hücrelerinin ölümünü arttırdığını ortaya koymuştur (Teicher vd., 1999). Başka bir çalışmada ise Richardson ve arkadaşları proteozom inhibisyonunun kanser tedavisi üzerine etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda,

benzer şekilde 20S proteozom inhibisyonu ile 60 tümör hücre hattındaki tümör gelişiminin engellenmiş olması arasında güçlü bir korelasyon ($r^2 = 0,92$) olduğunu ortaya koymuşlardır (Richardson vd., 2005).

MTT testinin sonuçlarıyla kıyaslandığında, yumuşak agar analizinde cisplatin monoterapisinin daha az etki göstermesi bekleniyordu (yani petrielerde daha fazla koloni oluşması). Ancak, Şekil 9.5’de de görüleceği gibi cisplatin ile tedavi edilen petrielerde sadece %24 kolonileşme gözlenmiştir (bu da cisplatinin MTT deneyine göre daha etkili olduğunu göstermektedir). Bunun sebebinin de yumuşak agar deneyinde hücrelerin geri dönüşümsüz bir şekilde hasar görmesi olabileceği düşünülmektedir. 10 nM bortezomib ile muamele edilmiş petrielerde %72 koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Bizden önce yapılan Adams ve Kauffman’ın çalışmasında ise bortezomibin bir çok kanser hücre tipine karşı etkili olduğu, PC-3 prostat kanseri hücrelerinin büyümelerine engel olduğu ve apoptozisi tetiklediği görülmüştür. Aynı çalışmada topoisomerase I inhibitor CPT-11 ile kombinasyonun LoVo kolon kanseri ksenograft modelinde tümör büyümesinin anlamlı derecede durdurduğu tespit edilmiştir (Adams ve Kauffman, 2004). Bu da bizim çalışmamıza benzer şekilde bortezomibin kanser tedavisinde etkin olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuç MTT testi ile elde edilen sonuçlarla tutarlı çıkmıştır. Bortezomibin, 26S proteozomunun yüksek oranda seçici ve tersine çevrilebilir bir inhibitörü olduğu bilinmektedir (Mimnaugh vd., 2004). Bu nedenle, yumuşak agar deneyinde kolonilerin sayısı ile cisplatin için elde edilen MTT sonuçları arasındaki kısmi farklılık ilaçların tersine çevrilebilirliği ile açıklanabilir. Benzer sonuçlar diğer geri dönüşümsüz ilaçlarda da elde edilebilir ve kullanılan testler, ilaçların bu tür etkileri için göz önüne alınabilir niteliktedir.

İlaç direnci ise kanserin kemoterapik tedavisindeki en temel komplikasyondur ve bu direnç tümör hücrelerinin anti-kanser ilaçlara bağlı tedavisine cevap vermemesi halinde ortaya çıkmaktadır (Brabec ve Kasparkova, 2005; Torigoe vd., 2005). Kombine tedaviler yoluyla birden fazla hücresel yolun aynı anda hedeflenmesi durumunda (örneğin bu çalışmada kullanıldığı gibi ubiquitin-proteozomal yol ve DNA replikasyonu) ilaç direnci mekanizmalarının gelişmesi daha efektif bir şekilde engellenebilir.

Bu çalışmada ortaya koyulan sonuçlar, p53-null olan 4T1 hücrelerinin bortezomib ve cisplatin ile apoptozisin p53-bağımsız indüksiyon mekanizmasının açıklanmasında kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma sonuç olarak, bortezomib + cisplatin kombinasyonunun ilgili monoterapilere kıyasla daha etkili olduğunu, meme kanseri tedavisinde yeni bir yaklaşım sunabileceğini ve bu yüzden daha fazla laboratuvar ve klinik çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, J., Kauffman, M. (2004). Development of the proteasome inhibitor velcade (bortezomib). *Cancer invest*, 22: 304-311.
- Agarwal, M., Taylor, W., Chernov, M., Chernova, O., Stark, G. (1998). The p53 network. *J. Biol. Chem*, 273: 23635-23643.
- Akdaş, A., Çevik, İ. (1996). BPH-Bening Prostat Hiperplazisi. Hekimler Yayın Birliği, Ankara, 27-37.
- Aksoy, M. (1984). Beslenme ve Kanser. Çağ Matt. Ankara, 155.
- Aksoy, M. (2002). Beslenme, çevre ve kanser etkileşimine genel bir bakış. Beslenme, Çevre ve Kanser Sempozyumu, 31 Mart-3 Nisan, Ankara, Bildiri Kitabı, 24-25.
- Aksoy, M. (2005). Nutritional genomics veya nutrigenomiks. Uluslar Arası Katılımlı Ulusal Kanser Haftası Toplantı Kitapçığı, Ankara, 31-41.
- A. Koşar, P., Özçelik, N. (1998). Apoptozis üzerine kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçların etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, 5(4): 179-182.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc., New York, 1361.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, R., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th Ed.). Garland Science, New York, 1313-1362.
- Altınbaş, M. (2005). Onkoloji El Kitabı (2.Baskı). MN Medical & Nobel Kitabevi, 77-83.
- Arslan, N. (2001). Histoloji ve Histopatoloji. Çare Tek Bilim Eğitim Ltd., Ankara, **173**.
- Aykan, T. B., Tüzüner, N., Sav, A., İnce, Ü. (1987). Kısa Patoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 282-294.
- Barth, V., Barth, A. (2004). Soru ve Cevaplarla Meme Kanseri, (çev. Özkal, S., Kaya, M. A.). Optimist Yayıncılık, 143.
- Basma, H., El-Refaey, H., Sgagias, M. K., Cowan, K. H., Luo X., Cheng P.W. (2005). BCL-2 antisense and cisplatin combination treatment of MCF-7 breast cancer cells with or without functional p53. *J Biomed Sci*, 12: 999-1011.
- Başaran, N. (1999). Tıbbi Genetik Ders Kitabı (7. Baskı). Güneş & Nobel Tıp Kitap Evi, 465.
- Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Derg. 3(5): 154-165.
- Beliveau, R., Gingras, D. (2004). Green tea prevention and treatment of cancer by nutraceuticals. *Lancet*, 364: 1021-1022.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bellamy, C. O. C. (1996). p53 and apoptosis. *Br Med Bull*, 53(3): 522-538.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonretti, R. G., Gluud, C. (2004). Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 364: 1219-1228.
- Boyle, P., Levin, B. (2008). International Agency for Research on Cancer World Cancer Report, 350-357.
- Bozzone, D. M. (2007). Causes of Cancer. In *The Biology of Cancer*. Infobase Publishing, Inc. 130-135.
- Brabec, V., Kasparkova, J. (2005). Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat*, 8: 131-146.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248- 254.
- Byers, T., Nestle, M., Mc Tierman, A., Doyle, C., Currie-Williams, A., Gansler, T., Thun, M., (2002). American cancer society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J. Clin*, 52: 92-119.
- Canda, Ş. M., Canda T. (1982). Temel patoloji. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, İzmir, A(1): 450.
- Casciato, D. A., Lowitz, B. B. (2004). Klinik Onkoloji El Kitabı, (çev: Manavoğlu, O.), Palme Yayıncılık, Dördüncü Baskıdan çeviri, 750.
- Cheok, C. F., Kua, N., Kaldis, P., Lane, D. P. (2010). Combination of nutlin-3 and VX-680 selectively targets p53 mutant cells with reversible effects on cells expressing wild-type p53. *Cell Death Differ*, 17(9): 1486-1500.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2006). Hücre: Moleküler Yaklaşım, (çev. Sakızlı, M., Atabey, N.), İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, Üçüncü Baskı, 714 s.
- Crane, R. (2001). Breast Cancers. In *Oncology Nursing (4th Ed.)*. Philadelphia, USA: Mosby, 113-167.
- Criss, E., Baysal, A. (1999) *Kanserden Korunma İçin Beslenme Rehberi*. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 7-29.
- Cummings, M., Klug, W., Spencer, C. (2006). *Concepts of Genetics*. Palme Yayınları, 506-677.
- Çalışkan, M. (2000). Apoptosis: Programlanmış hücre ölümleri. *Turk J Zool*, 24, Ek Sayı, 31-35.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Çavga, F. Z. (2013). 5-Fluorouracil ve Proteozom İnhibitörü Bortezomib'in 4T1 Meme Kanseri Hücrelerindeki Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Tez no: 337868, 69s.

Demir, Z. (2006). Genel Mikrobiyoloji. 149.

Denizli, A., Gürzumar, A. (1999). Hücre intiharı. Popüler Bilim, 12-15.

Dilsiz, N. (2004). Moleküler Biyoloji. Palme Yayınları, 279.

Diñer, Y. (2013). Kanser ve Onkogenler Ders Notları, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 39.

Doherty, F. J., Mayer, R. J. (1992). Intracellular Protein Degradation. IRL Press, Oxford, 61.

Dokudur, H. (2009). Proteozom İnhibitörü MG-132'nin Kanser Hücre Dizilerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Tez no: 237916, 50s.

Doll, R., Hill, A. B. (1950). Smoking and carcinoma of the lung:Preliminary report. Brit Med J, 2:739-748.

Doll, R., Peto, R., Boreham, J., Sutherland, I. (2004). Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. BMJ, 328: 1519-1528.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature, 391: 43-50.

Ersoy, E. (2011). Ubiquitin-Proteozom Yolu ve Protein Sentezi ile İlişkisi. Lisans Bitirme Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya.

Guimaras, C. A., Linden, R. (2004). Apoptosis and alternative deastyles. Eur J Biochem, 271: 1638-1650.

Haydaroğlu, A., Bölükbaşı, Y., Özsaran, Z. (2007). Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi. Türk Onkoloji Dergisi, 22(1): 22-28.

Henderson, B. E., Ross, R., Bernstein, L. (1988). Estrogens as a cause of human cancer, the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. Cancer Res, 48: 246.

Holcik, M., LaCasse, E. C., MacKenzie, A. E., Korneluk, R. G. (2005). Apoptosis in Health and Disease, Clinical and Therapeutic Aspects. Cambridge University Press, 249.

<https://www.news-medical.net/health/Cancer-Epidemiology.aspx>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

İncesu, Z., Akalın, G. (2004). Bazı Doğal ve Sentetik Bileşiklerin Kanserli Hücre İçi Protein Aktivasyonuna ve Apoptoz Üzerine Etkileri. TC. Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 030345.

Jones, B. G. (2001). Patoloji, (çev. Dinçtürk, A. A.), Güneş Kitabevi, Ankara, 384.

Karan, A. (2006). Meme Kanseri Hücre soylarında β katenin ve Proliferasyon İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Tez no: 203173, 33s.

Kırdar, Ü. (1979). Kanser Nedir?. Y.Gürsoy Matbaası, İstanbul, 222.

King, T. L., Mccool, W. F. (2004). The definition and assessment of pain. J Midwifery Womens Health, 49: 471-472.

Kirman, H. (2012). Brokoli (*Brassica oleracea*) Bitkisinin 4T1 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisi. Lisans Bitirme Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya.

Lever, W. F. (1975). Histopathology of the Skin (5th Edition). J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1520.

Lopes U. G., Erhardt, P., Yao, R., Cooper, G. M. (1997). p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. J Biol Chem, 272: 12893-12896.

Mermercioğlu, B. (2008). Meme tümörlü dişi köpeklerde tümör nekroz Faktör-alfa (TNF- α), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve vitamin E düzeylerinin değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi 75s.

Michaud, D. S., Fuchs, C. S., Liu, S., Willet, W. C., Colditz, G. A., Giovannucci, E. (2005). Dietary glycemic load carbohydrate sugar and colorectal cancer risk in men and women. Cancer. Epil Biomar Prev, 14: 138-147.

Mimnaugh, E. G., Xu, W., Vos, M., Yuan, X., Isaacs, J. S., Bisht, K. S., Gius, D., Neckers, L. (2004). Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization and enhances antitumor activity. Mol Cancer Ther, 3: 551-566.

Okasha, M., McCarron, P., McEwen, J., Smith, G. D. (2002). Body mass index in young adulthood and cancer mortality; a retrospective cohort study. Jephil Comm Health, 56:780-784.

Okur, E. (2010). Proteozom İnhibisyonunun 4T1 Meme ve B16F10 Melanoma Hücrelerindeki Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Tez no: 292561, 85s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Özensoy, Ö. (2006). Expression and purification of cancer related carbonic anhydrase IX and XII Isozymes (CA-IX, CA-XII) and investigation of in vitro inhibition effects with some compounds (Kanser ilişkili karbonik anhidraz IX ve XII izoenzimlerinin (ca-IX, ca-XII) ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı bileşiklere karşı inhibisyon etkilerinin araştırılması). Balıkesir University, 2006/08 PhD Project.

Özmen, M. (2005). Yaşlılık ve Kanser. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Ankara, 5.

Ö. Kandaş, N. (2004). Apoptosis, programlı hücre ölümü. Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, 5(1): 7-10.

Parikh, S. A., Rabe, K. G., Kay, N. E., Call, T. G., Ding, W., Schwager, S. M., Bowen, D. A., Conte, M., Jelinek, D. F., Slager, S. L., Shanafelt, T. D. (2014). Chronic lymphocytic leukemia in young (≤ 55 years) patients: A comprehensive analysis of prognostic factors and outcomes. *Haematologica*, 99(1): 140-147.

Pınarbaşı, E. (2007). Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü). Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. (Edt.), *Moleküler Biyoloji*. Nobel Yayınevi, Ankara, 685.

Preiss, J., Dornhoff, W., Hagmann, F. G. (2002). *Onkologie 2002/03*. München, Zuckschwerdt Verlag, Onkologische Arbeitsgemeinschaft Saar-Pfalz-Mosel e.V, 155-157.

Rechsteiner, M., Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21: 267-271.

Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157: 1415-1430.

Richardson, P. G., Mitsiades, C., Hideshima, T., Anderson, K. C. (2005). Proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Cell cycle*, 4(2): 290-294.

Rogers, S. W., Rechsteiner, M. C. (1986). Microinjection studies on selective protein degradation: Relationships between stability, structure, and location. *Biomed Biochim Acta*, 45: 1611-1618.

Schimke, R. T. (1976). Protein degradation in vivo and its regulation. *Circ Res*, 38: I131-I137.

Soyak, G. (2006). Lenfoid Löykozlu Etçi Anaç Tavuklarda Karaciğer Enzim (alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz, alkali fosfataz) Düzeyleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Tez no: 2165, 45s.

Şeker, S. (2010). Proteozom İnhibitörü PS-341 ve HSP70 İnhibitörü Quercetin'in B16F10 Hücre Kültürlerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Tez no: 259737, 64s.

Şenel, F., Çırakoğlu, B. (2003). Kanserle savaş. TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Bilim ve Teknik Dergisi, Kanserle Savaş Özel Eki.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tavil, A. (1996). Kanserli Hastalarda Psikiyatri Morbidite. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı, İstanbul.

Teicher, B. A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V. J., Adams, J. (1999). The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 5: 2638-2645.

Terwilliger, T., Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7: e577.

Thor, A. D., Moore, D. H., Edgerton, S. M., Kawasaki, E. S., Reihnsaus, E., Lynch, H. T., Marcus, J. N., Schwartz, L., Chen, L. C., Mayall, B. H., Smith, H. S. (1992). Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst*, 84(11): 845-855.

Torigoe, T., Izumi, H., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Yoshida, T., Igarashi, T., Niina, I., Wakasugi, T., Imaizumi, T., Momii, Y., Kuwano, M., Kohno, K. (2005). Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 5: 15-27.

Tuncer, A. M. (2007). Türkiye’de Kanser Kontrolü. T. C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Eylül/Ankara, Bakanlık Yayın No:707, 172-211.

Ulukaya, E. (2003). Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Yayınları, 195.

Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: Functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 12142-12149.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36: 131-149.

Voet, D. D., Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 69-104.

Walker, R. A., Dearing, S. J., Lane, D. P., Varley, J. M. (1991). Expression of p53 protein in infiltrating and in-situ breast carcinomas. *J Pathol*, 165(3): 203-211.

Warner, T. F. (1972). Apoptozis. *Lancet*, 2:1252-1258.

Yan, L., John, M., Qiaohong, L. (2008). Chemoprotective effects of curcuma aromatica on esophageal carcinogenesis. *Ann Surg Oncol*, 515-523.

Yerlikaya, A. (2004). Cellular functions of the 26S proteasome. *Turk J Biol*, 28: 31-38.

Yerlikaya, A., Stanley, B. A. (2004). S-adenosylmethionine decarboxylase degradation by the 26S proteasome is accelerated by substrate-mediated transamination. *J Biol Chem*, 279: 12469-12478.

Yerlikaya, A. (2007). Protein Sentezi ve Yıkımı. Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. (Edt.). *Moleküler Biyoloji, Nobel Yayınevi, Ankara*, 613.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yerlikaya, A., Erin, N. (2008). Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor velcade. *Int J Mol Med*, 22: 817-823.

Yerlikaya, A. (2009). Proteoliz Ders Notları. Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya.

Yerlikaya, A., Dokudur, H. (2009). Protein yıkımının önemi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 35(2): 93-99.

Yerlikaya, A., Dokudur, H. (2010). Investigation of The eIF2 α phosphorylation mechanism in response to proteasome inhibition in melanoma and breast cancer cells. *Molecular Biology*, 44(5): 760-768.

Yerlikaya, A., Okur, E., Ulukaya, E. (2012). The p53-independent induction of apoptosis in breast cancer cells in response to proteasome inhibitor bortezomib. *Tumor Biol*, 33(5): 1385-1392.

Yerlikaya, A., Yöntem, M. (2013). The Significance of ubiquitin proteasome pathway in cancer development. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8(3): 298-309.

Yerlikaya, A., Altıkat, S., Irmak, R., Cavga, Z., Kocacan, S. A., Boyacı, İ. (2013). Effect of bortezomib in combination with cisplatin and 5-fluorouracil on 4T1 breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 8: 227-281.

Yöntem, M. (2006). *Pratik Biyokimya*. Palme Yayıncılık, 262-270.

Zong, W. X., Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 20: 1-15.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : UZUN, Reyhan
Doğum tarihi ve yeri : 15/11/1987 - GÖYNÜK
e-mail : reyhanirmakuzunmk@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Tezli Yüksek Lisans	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi / Moleküler Biyoloji	2018
Tezsiz Yüksek Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi / Eğitim Bilimleri	2010
Lisans	Niğde Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Eskişehir Atatürk Lisesi / Sayısal Alan	2004

Yabancı Dil

İngilizce - Orta Seviye

Yayınlar

Yerlikaya, A., Altıkat, S., **Irmak, R.**, Cavga, Z., Kocacan, S. A., Boyacı, İ. (2013). Effect of bortezomib in combination with cisplatin and 5-fluorouracil on 4T1 breast cancer cells. Molecular Medicine Reports, 8: 227-281.